

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa* İZOLATLARINDA β -LAKTAMAZ
DİRENÇ GENLERİNİN TARANMASI VE YENİ BİR METALLO- β -
LAKTAMAZIN (VIM-38) KARAKTERİZASYONU**

AZER ÖZAD DÜZGÜN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. CEMAL SANDALLI

JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. ALİ OSMAN BELDÜZ

DOÇ. DR. ELİF SEVİM

DOÇ. DR. AYŞEGÜL ÇOPUR ÇİÇEK

YRD. DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

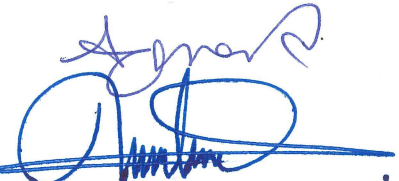
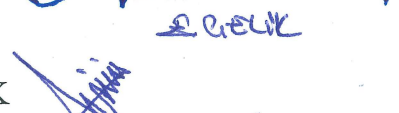



RİZE-2015

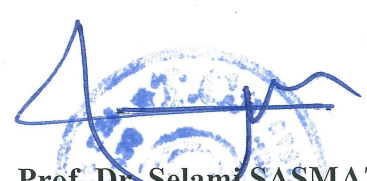
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa* İZOLATLARINDA β -LAKTAMAZ DİRENÇ
GENLERİNİN TARANMASI VE YENİ BİR METALLO- β -LAKTAMAZIN
(VIM-38) KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Cemal SANDALLI danışmanlığında, Azer ÖZAD DÜZGÜN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/08/2015 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ	
Üye :	Doç. Dr. Cemal SANDALLI	
Üye :	Doç. Dr. Elif SEVİM	
Üye :	Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	


Prof. Dr. Selami SAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, TÜBİTAK 2214-A - Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ve RTEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 2013.102.03.13 nolu sağlanan destek ile Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında ‘Doktora Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Doktora öğrenciliğimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, ilgisini ve her konuda yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Cemal SANDALLI ’ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmalarında ve hayatımın her noktasında her türlü desteği benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Araş. Gör. Ayşegül SARAL ’a teşekkürü bir borç bilirim. Klinik örneklerin elde edilmesinde yardımcı olan Doç.Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK’e, laboratuvarda yardımlarını esirgemeyen Emine Esra BUDAK’a, Fatma ÇALIK’a, Ahmet MİDİLLİ’ye, tüm R.T.E.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tez Çalışmamın enzim moleküler karakterizasyonunun yapılabilmesi için her türlü desteği sağlayan Oxford Üniversitesi, Kimya Araştırma Laboratuvarı’ndan Prof. Dr. Chris J. SCHOFIELD’e, MBL grubundan Dr. Jurgen BREM’e ve Anne MAKENA’ya teşekkürü bir borç bilirim.

Üzerimdeki emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, benim bugünlere gelmemi sağlayan anneme ve babama, tezimin tamamlanmasına kadar olan süreçte benimle birlikte tüm sıkıntılara katlanan ve bana büyük bir manevi destek sağlayan sevgili kardeşlerime ve Ayşe DÜZGÜN’e çok teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntıda her zaman yanımda olan, tezim tamamlanana kadar bana hep moral kaynağı olan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Yrd. Doç. İbrahim DÜZGÜN’e sonsuz teşekkür ederim.

Azer ÖZAD DÜZGÜN

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan ‘Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında β -Laktamaz Direnç Genlerinin Taranması ve Yeni Bir Metallo- β -Laktamazın (VIM-38) Karakterizasyonu’ başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 12/08/2015

Azer ÖZAD DÜZGÜN

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

KLİNİK *Pseudomonas aeruginosa* İZOLATLARINDA β -LAKTAMAZ DİRENÇ GENLERİNİN TARANMASI VE YENİ BİR METALLO- β -LAKTAMAZIN (VIM-38) KARAKTERİZASYONU

Azer ÖZAD DÜZGÜN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi
Danışmanı: Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Bu doktora tezinde, 104 *P. aeruginosa* suşu çalışılmıştır. Antibiyogram sonucuna göre izolatlardan 24 tanesinin çoklu ilaç-dirençli olduğu belirlendi. Tüm izolatlarda beta-laktam direnç genlerinin varlığı PZR yöntemiyle değerlendirildi ve 104 örnekten birinin GES değerinin ise VIM pozitif olduğu tespit edildi. DNA dizi analizine göre, GES'in %100 GES-5'e, VIM tipi MBL'in ise bir aminoasit farkla (Ala265Val) %99 VIM-5'e benzediği belirlendi. Bu yeni varyant VIM-38 olarak adlandırıldı ve nükleotid sırası GenBank'a giriş yapılarak kayıt numarası alındı (Kayıt No: KC469971). *bla*_{VIM-38} pET-28a ekspresyon vektörüne klonlanarak Ni-afinite ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kütle spektrometresi kullanılarak VIM-5 ve VIM-38'in kütleleri belirlendi ve proteinlerin bir veya iki çinko iyonu içerdikleri doğrulandı. Aynı deneysel koşullar altında VIM-1, VIM-2 ve VIM-5 enzimleri ile karşılaştırmalı olarak VIM-38 enziminin detaylı kinetik ve biyokimyasal karakterizasyonu yapıldı. Genel olarak, VIM varyantları test edilen β -laktam substratlara karşı katalitik etkinliklerinde çok az farklılıklar görüldü. Sefalotin ve nitrosefin tüm VIM varyantları tarafından eşit hidroliz edildi. Sefoksitin için VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 ile VIM-1 karşılaştırıldığı zaman VIM-1 çok düşük k_{cat}/K_m değerine sahiptir ve aralarında yaklaşık 6 kat fark vardır. VIM-38 VIM-5 enzimi ile karşılaştırıldığı zaman seftazidim için yaklaşık 10 kat düşük k_{cat}/K_m değerine sahip olduğu belirlendi. VIM varyantları üzerine triptofan türevleri ile yapılan inhibisyon araştırmasında özellikle VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin en düşük %KA sahip olduğu görüldü. Test edilen inhibitörler tarafından VIM-1 hiç inhibe olmazken VIM-2'nin zayıf bir şekilde inhibe edildi. Enzimlerin çok yakın CD spektrasına ve sekonder yapıya sahip oldukları belirlendi. VIM-5 ve VIM-38 enzimleri VIM-1 ve VIM-2 ile karşılatıldıkları zaman çok daha kararlı oldukları tespit edildi.

2015, 138 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kinetik, Metallo-beta-laktamaz, MİK, VIM.

ABSTRACT

SCREENING OF β -LACTAMASE RESISTANCE GENES CLINICAL ISOLATES OF *Pseudomonas aeruginosa* AND CHARACTERIZATION OF A NEW METALLO- β - LACTAMASE (VIM-38)

Azer ÖZAD DÜZGÜN

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Ph.D. Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Cemal SANDALLI

In this dissertation, 104 *P. aeruginosa* clinical isolates were investigated. According to antibiotic resistance profile, 24 isolates were considered as a multidrug resistant. The presence of beta-lactam resistance gene in all strains evaluated using the PCR method and one of the 104 samples was determined that while the GES other VIM positive. According to DNA sequence analysis revealed that GES is the closest 100% to GES-5, VIM type MBL's is exhibiting one amino acid substitution (Ala265Val) in comparison to the closest 99%, VIM-5. This novel blaVIM variant, named VIM-38 and the nucleotide sequences of the new VIM allele was submitted to the GenBank database and can be found under accession number KC469971. bla_{VIM-38} cloned into the expression vector pET-28a, protein is purified by Ni-affinity and gel filtration chromatography. Mass spectrometric analysis validated the identities of VIM-5, VIM-38 and confirmed the binding of two or one metal ions for each of the proteins. Under the same experimental conditions, VIM-38 enzyme were performed with detailed kinetic and biochemical characterization of as compared to VIM-1, VIM-2 and VIM-5. Overall, the VIM variants tested showed minimal differences in their catalytic efficiencies towards the tested β -lactam substrates. Cephalothin and nitrocefin were equally hydrolysed by all the tested VIM variants. For cefoxitin VIM-2, VIM-5 and VIM-38 compared to VIM-1 had the lowest k_{cat}/K_m values; >6 fold higher. VIM-38 had a ~10 times lower k_{cat}/K_m value for ceftazidime compared to VIM-5. The tryptophan derivatives were shown to have the lowest RA% particularly for VIM-5 and VIM-38. VIM-1 was not inhibited by any of the tested compounds while VIM-2 was only weakly inhibited. The enzymes had very similar CD spectra and secondary structures. VIM-38 and VIM-5 were the most stable variants compared to VIM-1 and to VIM-2.

2015, 138 pages

Keywords: Kinetic, Metallo-beta-lactamase, MIC, VIM.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. GİRİŞ.....	1
1.2. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları.....	1
1.2.1. Geçirgenliğin Azalması ve Aktif Dışa Atım	3
1.3. β -laktam Antibiyotikler	4
1.3.1. Penisilinler	5
1.3.2. Sefalosporinler.....	6
1.3.3. Karbapenemler.....	6
1.3.4. Monobaktamlar.....	6
1.4. β -Laktamazlar	7
1.5. β -Laktamazların Mekanizması	8
1.6. β -laktamazların Sınıflandırılması	8
1.7. Metallo- β -Laktamazlar (MBL'ler)	9
1.7.1. Kromozomal Olarak Kodlanan MBL'ler	10
1.7.2. Kazanılmış MBL'ler.....	11
1.7.3. Kazanılmış MBL'lerin Küresel Epidemiyolojisi.....	11
1.8. MBL'lerin Sub-Sınıflandırılması	12
1.8.1. B1 MBL'ler	13
1.8.1.1. VIM-Tipi Metallo-Beta-Laktamaz	13
1.8.1.2. NDM-1 Tip Metallo-Beta-Laktamaz.....	14
1.8.2. B2 MBL'ler	16
1.8.3. B3 MBL'ler	16
1.9. MBL'ler Üç Boyutlu Yapısı	17
1.9.1. Aktif Bölge ve Zn-bağlanan Aminoasitler	19

1.10.	MBL'lerin Biyokimyası	21
1.11.	MBL'lerin Katalitik Mekanizması	26
1.12.	MBL İnhibitörleri	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Kitler ve Vektörler.....	29
2.2.	Çözeltiler ve Tamponlar	29
2.3.	<i>P. aeruginosa</i> İzolatların Temini ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması.....	29
2.4.	<i>P. aeruginosa</i> İzolatlarından DNA İzolasyonu	30
2.5.	Çoklu İlaç Dirençli <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının 16S rRNA Dizi Analizi.....	30
2.6.	Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişki	30
2.7.	Beta Laktamaz Genlerinin PZR Yöntemiyle Belirlenmesi	31
2.8.	İntegronların PZR Yöntemiyle Belirlenmesi.....	32
2.9.	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	33
2.10.	PZR sonrası pozitif olan örneklerin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ..	33
2.11.	Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	34
2.12.	Filogenetik Analiz	34
2.13.	Yeni <i>bla_{VIM}</i> Alelinin Champion™ pET100 TOPO® Vektörüne Klonlanması	34
2.14.	Yeni <i>bla_{VIM}</i> Alelinin pET-28a Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	35
2.15.	VIM-5 Nokta Mutasyonu	36
2.16.	pET-28a/ <i>bla_{VIM-5}</i> ve pET-28a/ <i>bla_{VIM}</i> -Yeni Alele HRV 3C Proteazın İnsersiyonu	37
2.17.	<i>bla_{VIM-5}</i> ve <i>bla_{VIM}</i> -Yeni Alelin Ekspresyon Şartlarının Belirlenmesi	38
2.18.	<i>bla_{VIM-5}</i> ve Yeni <i>bla_{VIM}</i> Genlerinin Ekspresyonu	39
2.19.	VIM-5 ve Yeni VIM Proteinlerinin Saflaştırılması.....	39
2.19.1.	Ni-Afiniti Kromatografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması.....	40
2.19.2.	Ultrafiltrasyon ile Proteinlerin Konsantre Edilmesi	42
2.19.3.	HRV 3C Proteaz Enzimi ile 6 Histidinin Uzaklaştırılması	42
2.19.4.	Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması	42
2.19.5.	Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	44
2.19.6.	Kütle Spektrometresi ile VIM-5 ve Yeni VIM Proteinlerin Kütlelerinin Belirlenmesi.....	44
2.20.	VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve Yeni VIM Enzimi ile Aktivite Deneyleri	45
2.20.1.	Steady-State Kinetik	45
2.20.2.	Doripenem ile İnhibisyon Deneyi.....	47
2.20.3.	İnhibisyon Deneyleri	48

2.21.	Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi	53
3.	BULGULAR	54
3.1.	<i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Temini ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi.....	54
3.2.	Disk Difüzyon ve E-test Sonuçları	55
3.3.	24 Çoklu İlaç Dirençli <i>P. aeruginosa</i> Suşlarının 16S rRNA Gen DNA Dizi Analizi	58
3.4.	Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişki.....	58
3.5.	Beta-laktamaz Genlerinin ve İntegronların Belirlenmesi.....	60
3.6.	Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	61
3.7.	Yeni <i>bla</i> _{VIM} -tipi Metallo Beta-laktamaz Varyantının Belirlenmesi	61
3.8.	VIM-38'in Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	65
3.9.	<i>bla</i> _{VIM-38} Genin pET-28a Vektörüne Klonlanması	67
3.10.	Nokta Mutasyonu ile VIM-38' den VIM-5 Elde Edilmesi.....	68
3.11.	İnserisyon ile 3C Proteazi Kodlayan Genin pET-28a/ <i>bla</i> _{VIM-5} ve pET-28a/ <i>bla</i> _{VIM-38} ' e Eklenmesi	68
3.12.	<i>bla</i> _{VIM-5} ve <i>bla</i> _{VIM-8} Genlerinin Ekspresyon Şartlarının Belirlenmesi.....	69
3.13.	Ni-Afinite Kromatografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması.....	69
3.14.	Jel filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması.....	71
3.15.	Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	73
3.16.	Histag Kuyruğunun Uzaklaştırılması	73
3.17.	VIM-5 ve VIM-38 Proteinlerinin Kütlelerinin Belirlenmesi	74
3.18.	VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 Enzim Aktivite Deneyleri.....	76
3.18.1.	Steady-State Kinetik	76
3.18.2.	Doripenem Antibiyotiği ile İnhibisyon Deneyi	83
3.18.3.	İnhibisyon Deneyleri	83
3.18.4.	Enzimlerin IC ₅₀ Sonuçları	85
3.19.	CD Sonuçları	92
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	94
5.	ÖNERİLER	101
	KAYNAKLAR	102
	EKLER	115
	ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Bakteriyal direnç mekanizmasının şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.	β -laktamların çekirdek yapısı.....	5
Şekil 3.	MBL'lerin üç boyutlu yapısı.....	18
Şekil 4.	HRV 3C proteazın (L E V L F Q G P) insersiyonu.....	38
Şekil 5.	Ni-Afiniti kromotografisi ile proteinlerin saflaştırılma basamakları.....	41
Şekil 6.	Jel filtrasyon kromotografisi ile proteinlerin saflaştırılma basamakları.....	43
Şekil 7.	Primer 29 kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	59
Şekil 8.	Primer 34 kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	59
Şekil 9.	Primer 29 ile RAPD-PZR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan ve <i>P. aeruginosa</i> örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram .	60
Şekil 10.	<i>bla</i> _{VIM-38} genine ait nükleotit sırası.....	62
Şekil 11.	VIM-38 enziminin aminoasit sırası.....	62
Şekil 12.	<i>bla</i> _{VIM} alellerinin benzerlik diyagramı.....	64
Şekil 13.	VIM-38'in VIM-1-2-5 enzimleri ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması..	65
Şekil 14.	VIM-38 SignalP 4.1 programı kullanılarak VIM-38'in sinyal sırasının tespiti.....	67
Şekil 15.	<i>bla</i> _{VIM-38} geninin %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	67
Şekil 16.	HRV 3C proteaz amino asit sırasını içeren pET-28a/ <i>bla</i> _{VIM-5} sekans sonucu .	68
Şekil 17.	HRV 3C proteaz amino asit sırasını içeren pET-28a/ <i>bla</i> _{VIM-38} sekans sonucu	68
Şekil 18.	Ekpresyon şartları SDS-PAGE jel görüntüsü.....	69
Şekil 19.	VIM-5'in afinite kromotografisi saflaştırma sonucu.....	70
Şekil 20.	VIM-38'in afinite kromotografisi saflaştırma sonucu.....	70
Şekil 21.	VIM-5 ve VIM-38'in afinite kromotografisi sonrası SDS-PAGE görüntüsü	71
Şekil 22.	VIM-5'in jel filtrasyon kromotografisi saflaştırma sonuç grafiği.....	72
Şekil 23.	VIM-38'in jel filtrasyon kromotografisi saflaştırma sonuç grafiği.....	72
Şekil 24.	VIM-5 ve VIM-38'in jel filtrasyon kromotografisi sonrası SDS-PAGE görüntüsü.....	73
Şekil 25.	VIM-5'in kütle spektrometre sonuç grafiği.....	75
Şekil 26.	VIM-38'in kütle spektrometre sonuç grafiği.....	75
Şekil 27.	VIM-5'in doripenem ile inhibisyon grafiği.....	83

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.	Hedef bölgelerine göre antimikrobiallerin sınıflandırılması.....	1
Tablo 2.	β -laktam sınıfları ve antibakteriyel spektrumları.....	7
Tablo 3.	Fonksiyonel, moleküler sınıflandırma ve β -laktamazların özelliği.....	9
Tablo 4.	Bakteriyel konak ve orjinleriyle kazanılmış MBL'ler.....	12
Tablo 5.	B1, B2 ve B3 alt sınıf MBLlerin erişilebilir üç boyutlu yapıları ve PDB kodları.....	17
Tablo 6.	B1 alt sınıf MBL'ler Steady state kinetik sonuçları.....	22
Tablo 7.	B2 alt sınıf MBL'ler Steady state kinetik sonuçları.....	23
Tablo 8.	MBL inhibitörleri.....	28
Tablo 9.	Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tamponlar.....	29
Tablo 10.	RAPD analizlerinde kullanılan primerler.....	31
Tablo 11.	Çalışma da kullanılan spesifik primerler ve T_m 'ler.....	32
Tablo 12.	Ligasyon ve restriksiyon endonukleaz kesim şartları.....	36
Tablo 13.	Proteinlerin ekspresyon şartları.....	39
Tablo 14.	VIM-5 ve Yeni VIM proteinin moleküler ağırlıkları ve extinction coefficient değerleri.....	44
Tablo 15.	Her substrat için enzim konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	46
Tablo 16.	Deneylerde kullanılan substratların dalga boyları ve coefficient değerleri ..	46
Tablo 17.	Aktivite deneylerinde kullanılan substrat konsantrasyonları.....	47
Tablo 18.	Kinetik deneylerde kullanılan substrat konsantrasyonları.....	47
Tablo 19.	Doripenem inhibisyon deney koşulları.....	48
Tablo 20.	İnhibisyon deneyinde kullanılan inhibitörler.....	49
Tablo 21.	İnhibitörlerin enzimlerin üzerine inhibisyon oranlarının belirlenmesi	52
Tablo 22.	İnhibitörlerin IC_{50} değerlerinin belirlenmesi.....	52
Tablo 23.	Farklı numunelerden izole edilen 104 <i>P. aeruginosa</i> suşunun antimikrobiyal direnç oranları.....	55
Tablo 24.	Çoklu ilaç dirençli suş kodları ve bu örneklerin direnç gösterdikleri antibiyotikler.....	57
Tablo 25.	MİK sonuçları.....	66
Tablo 26.	Yedi Antibiyotiğe karşı VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enziminin kinetik parametreleri.....	78
Tablo 27.	Michaelis–Menten grafikleri.....	79
Tablo 28.	VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin karşılaştırmalı Michaelis–Menten grafikleri.....	82

Tablo 29. Ellialtı farklı inhibitöre karşı VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38'in % residual aktiviteleri.....	84
Tablo 30. Seçilen İnhibitörler tarafından VIM-varyantlarının inhibisyon grafikleri ...	86
Tablo 31. Enzimlerin karşılaştırmalı IC ₅₀ grafikleri	89
Tablo 32. Enzimlerin sekonder yapısı ve erime sıcaklıkları grafikleri	93

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AK	Amikasin
Ala	Alanin
Arg	Arjinin
Asp	Aspartik asit
Asn	Asparajin
BcII	<i>Bacillus cereus</i> II
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Baz çifti
Bp	Bezmialem Pseudo 2
BSA	Sığır serum albumin
C	Derece
CA	Klavulanik asit
CaCl	Kalsiyum klörür
CAZ	Seftazidim
CD	Circular Dichroism
CFP	Sefoperazon/sulbaktam
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu
CN	Gentamisin
CTX-M	Sefotaksim hidroliz eden beta laktamaz
Cys	Sistein
d H ₂ O	Distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dntp	Deoksinükleozit trifosfat
DOR	Doripenem
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMB	Eosin Methylen-blue
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FEB	Sefepim

FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSB	Frozen storage buffer
GES	Guiana Geniş spektrum
Gln	Glutamin
Gly	Glisin
Glu	Glutamik asit
GSBL	Genişlemiş spekturum beta laktamaz
His	Histidin
HRV 3C	3C proteaz insan rhinovirus
IC ₅₀	İnhibitör konsantrasyonunun yarısı
IMP	İmipenem
IMP	İmipenem hidroliz eden metallo beta laktamaz
IPTG	İzopropiltiyo-beta-D-thiogalactopyranoside
ISCR	Ekleme sırası ortak bölge
%KA	Kalan Aktivite
Kb	kilo baz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilo dalton
Km	Michaelis-Menten sabiti
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
L	Litre
LB	Lauria-Bertani
Leu	Lösin
LEV	Levofloksasin
Lys	Lizin
M	Molar
MBL'ler	Metallo-beta-laktamazlar
ME	Meropenem
MET	Metiyonin
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
Mg	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre

mM	Milimolar
MRSA	Metisilin dirençli <i>S. aureus</i>
NaCl	Sodyum klörür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDM	New Delhi Metallo beta laktamaz
Ng	Nanogram
NET	Netilmisin
Nm	Nanomolar
Nm	Nanometre
OXA	Oksilinaz grup β -laktamaz
PAGE	Poli akrilamid jel elektroforezi
PER	<i>Pseudomonas</i> geniş direnç beta laktamaz
PBP	Penisilin bağlayan protein
PDB	Protein data base
PIP	Piperasilin
Phe	Fenilalanin
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
Pro	Prolin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Direnç
RAPD	Rastgele artırılmış polimorfik DNA
Rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
rRN	Ribonükleik asit
SAM	Ampisilin sulbaktam
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
SHV	Sulfhydryl tip beta-laktamaz
SXT	Trimetoprim-sulfametoksazol
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TEM	Temoniera beta laktamaz
TET	Tetrasiklin
Tm	Erime sıcaklığı

Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
TYG	Tigesiklin
Tyr	Tirozin
TZP	Piperasilin tazobaktam
Val	Valin
VEB	Vietnam geniş spektrumlu beta-laktamaz
VIM	Verona-İmipenemaz Metallo-beta laktamaz
Vmaks	Maksimum hız
Zn	Çinko
ZnSO ₄	Çinko sülfat
X-Gal	5-Bromo-4-kloro-3-indol-b-D-galaktozid
M	Mikro
Mg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ

Antibiyotik terimi, bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe eden maddeler olarak Selman Waksman tarafından 1942 yılında tanımlanmıştır (Waksman ve Flynn, 1973). Ancak günümüzde antibiyotik terimi, bakteri ile infekte olmuş ökaryotik kaynağa zarar vermeden spesifik interaksiyonlar ile mikropların büyümesini inhibeden/öldüren doğal veya sentetik kaynaklardan elde edilen maddeler veya antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır (Davies ve Davies, 2010; Walsh, 2000). Hedef olarak bakterileri öldüren veya büyümeyi inhibe etmelerine göre antibiyotikler Tablo 1’de gösterilen 5 ana gruba ayrılmaktadırlar (Ternover, 2006).

Tablo 1. Hedef bölgelerine göre antimikrobiyallerin sınıflandırılması (Ternover, 2006)

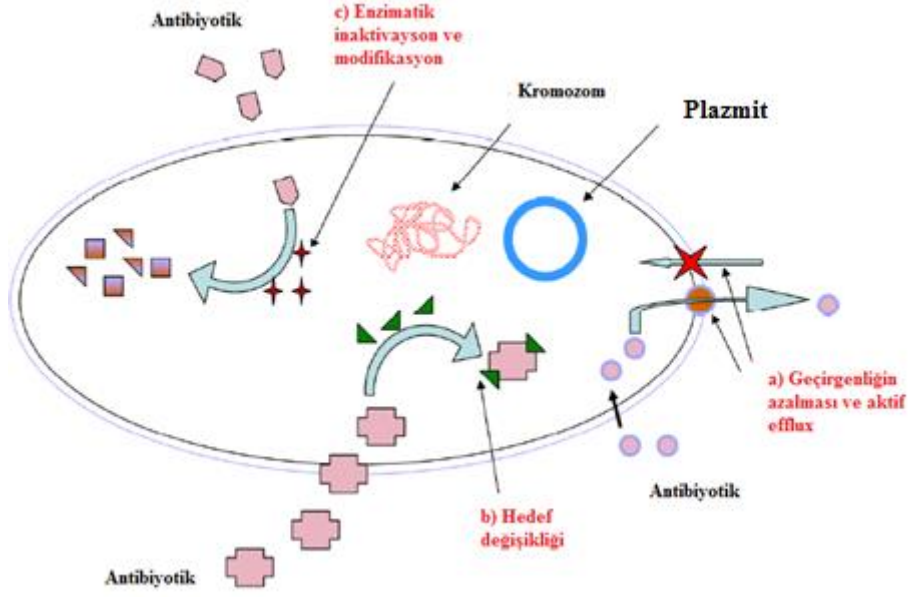
Hedef bölge	Hedef	Antibiyotik
Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu	Penisilin bağlama proteinleri, D-alanyl-D-alanin, Muropeptit taşınması	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler, Monobaktamlar, Daptomisin, Glikopeptidler
Protein sentezi inhibisyonu	30S ve 50S ribozom alt üniteleri	Tetrasiklinler, Kloromfenikol, Makrolidler, Aminoglikozidler, Linkosamidler, Oksazolidinonlar, Streptograminler
Nükleik asit sentezi engelleme	DNA giraz, DNA yapısının tamamı, RNA polimeraz	Kinolonlar, Nitroimidazoller, Rifampisin
Bakteri membranının bozulması	Fosfolipit yapısı	Polimiksinler
Folik asit yolunun inhibisyonu	Dihidrofolat redüktaz, Dihidropteroat sentetaz	Sulfonamidler, Trimethoprim

1.2. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları

Antibiyotik direnci mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç, hayatta kalma çabasıdır ve bu durumda duyarlı bakteriler elimine olurlar (Walsh, 2000). Antibiyotiklerin etkisi antibiyotik konsantrasyonu ve amacına göre bakterisidal veya

bakteriyostatik olabilir. Duyarlı bakteriler direnç mekanizması olmayan sub-populasyona aittirler. Böyle duyarlı bakteriler antibiyotik direnç genlerini veya mutasyonları kazanarak direnç geliştirebilirler ve bundan dolayı antibiyotik basıncında canlı kalırlar ve dirençli olurlar. Klinikte ise bakteri antibiyotik tedavisine cevap verirse duyarlı cevap vermez ise dirençli olarak katagorize edilmektedir. Bu yüzden klinikte, bakteriler duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak sınıflandırılırlar (EUCAST, 2000). Bakterilerde direnç mekanizması ya doğal olarak ya da sonradan kazanılmış olarak bulunmaktadır. Doğal direnç, bakteri populasyonları genomunda doğal olarak direnç genlerinin var olma durumudur (Davies ve Davies, 2010). Örneğin, Gram negatif bakteriler geçirgen olmayan dış zarlarından dolayı glikopeptidlere ve makrolidlere karşı doğal direnç gösterirler (Allen vd., 2010). Diğer bir örnek, *Mycoplasma*'lar hücre duvarına sahip olmadıklarından dolayı β -laktam gibi hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı doğal direnç gösterirler (Allen vd., 2010). Kazanılmış direnç mekanizması ise transformasyon, konjugasyon ve transdüksiyon gibi horizontal gen transfer mekanizmaları veya mutasyonlar ile bakteriler tarafından kazanılmış mekanizmalardır (Sykes, 2010). Örneğin, pek çok β -laktamaz genleri plazmitler, transposonlar ve insersiyon sırası ortak bölgesi (ISCR) gibi mobil genetik elementler yoluyla bakteriler tarafından kazanılmıştır (Toleman vd., 2006). Plazmitler bakteri içerisinde bağımsız olarak replike olabilir ve ayrıca bakteri hücreleri ve türler arasında taşınabilirler ve böylece direnç genlerinin yayılmasına neden olurlar (Walsh, 2000).

Genel olarak bakteriler üç farklı direnç mekanizması ile biyokimyasal direnç gösterirler (Şekil 1); a) hücre içinde geçirgenliğin azalması ve aktif efflux mekanizması, b) yapısal olarak antibiyotik hedefinin değişmesi, c) hedefe ulaşmadan önce antibiyotiklerin inaktivasyonu veya enzimatik modifikasyonu. Bakteriler antibiyotiklere karşı direnç oluşturmak için bu mekanizmaları birlikte bulundurabilirler (Fisher vd., 2005; Stein, 2005).



Şekil 1. Bakteriyal direnç mekanizmasının şematik gösterimi (Levy ve Marshall, 2004).

1.2.1. Geçirgenliğin Azalması ve Aktif Dışa Atım

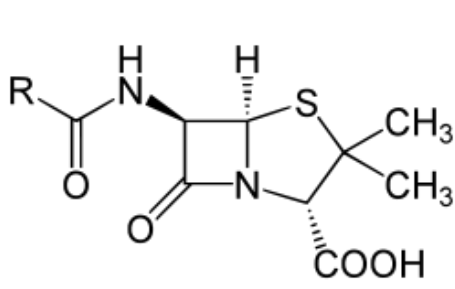
Gram negatif bakterilerin dış membranı protein kanalları içerir. Antibiyotik girişini engellemek için bakteriler dış membran (Gram negatif bakterilerde) ve hücre duvarı (Gram pozitif) tarafından çoğunlukla antibiyotik girişini azaltırlar. *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* gibi Gram negatif bakteriler porin kaybı veya porinlerin değişmesi ile β -laktam gibi antibiyotiklere direnç gösterirler (Hancock, 2005). Örneğin, dış mebran delesyon kombinasyonları ile üretilen plazmit-aracılı AmpC β -laktamazın varlığıyla *K. pneumoniae* imipeneme karşı direnç gösterir (Cao vd., 2000).

Bakteriler antibiyotiklerin hedefini yapısal olarak afiniteyi azaltarak değiştirebilirler. Örneğin, penisilin bağlayan proteinlerin (PBPs) modifikasyonu. En iyi bilinen örnek ise *mecA* geni tarafından PBP (PBP2a veya PBP2) değişikliği kazanmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'dır (de Lencastre vd., 2007). Ayrıca *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilerde değişmiş PBP'lerin β -laktamlara karşı dirençle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Zamorano vd., 2010).

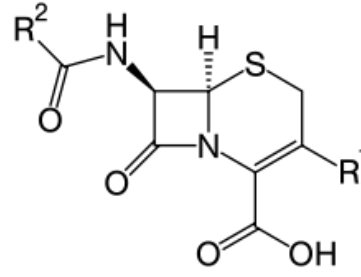
Antibiyotiklerin çoğu hidrolitik duyarlılığı olan ester ve amid bağları ile karakterize edilmektedirler ki bunların hedefi bazı bakteri enzimleridir ve bu enzimleri inaktif duruma getirmektir (Wright, 2005). Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler tarafından aminoglikozid antibiyotiklerin modifiyesi Gram negatif bakterilerde ana direnç mekanizmasıdır (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

1.3. β -laktam Antibiyotikler

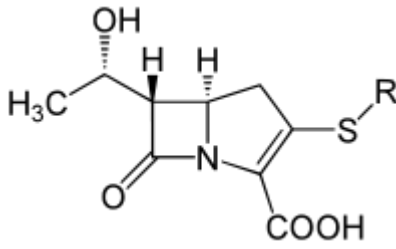
İlk antibiyotik *Staphylococci*'i öldüren *Penicillium notatum* kültüründen 1928 yılında Alexander Fleming tarafından elde edilmiştir. Bu aktif maddeye Penisilin adı verilmiştir (Fleming, 1929). Howard Florey ve Ernst Chain ikinci dünya savaşı boyunca bakterilerle enfekte olmuş çok sayıda insanı tedavi etmek için penisilini ilk kez kullanmışlardır (Chain vd., 1940). Fleming, Florey ve Chain 1945 yılında penisilin keşfi ve uygulanmasıyla Tıp ve Fizyoloji dalında Nobel ödülü almışlardır. 1949 da X-ray kristalografisi ile penisilin yapısı çözülmüş ve anahtar fonksiyonel özellik olarak penisilin β -laktam halkası tanımlanmıştır (Hodgkin, 1949). Penisilin keşfinden beri β -laktam antibiyotikler en önemli antibiyotik grubu olmuştur ve Gram negatif ve Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarında kullanılmaktadırlar (Siu, 2002). β -laktamlar penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olmak üzere 4 ana gruba ayrılırlar (Şekil 2).



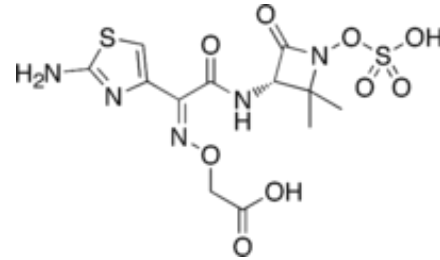
Penisilin



Sefalosporin



Karbapenem



Monobaktam

Şekil 2. β -laktamların çekirdek yapısı (Saradhi, 2012).

β -laktamlar ya doğal ya da yarı-sentetik moleküllerdir. Üç karbon ve bir nitrojen atomu içeren dört-üyelü laktam halkası temel nükleusu ile karakterize edilmektedirler. Dahası β -laktam halkası bir bi-siklik halkası içerisinde biyolojik aktiviteyi, β -laktam kararlılığını ve toksisiteyi geliştirmek için 5 veya 6 üyelü halka ile kaynaştırmaktadır. β -laktam halkası penisilinler için beş-üyelü thiazolidine halkası ile sefalosporinler için altı-üyelü dihydrothiazine halkası ile kaynaşmaktadır (Demain ve Elander, 1999).

1.3.1. Penisilinler

Penisilinler genel olarak Gram-pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösterirler ve konakta çok düşük toksik etkiye sahiptirler. Genel olarak, penisilinlerin temel yapısı β -laktam halkasına eklenmiş bir thiazolidine ve C6 pozisyonunda bir yan zinciri içerir (Hodgkin, 1949). Yan zincirler penisilinlerin farklı gruplarını temsil eder; penisilin G (grup 1), penisilin M (grup 2), penisilin A (grup 3), 6- α -yer değiştirmiş penisilinler (grup 4), α -karboksi-ve α -sulfopenisilinler (grup 5), amidinpenisilinler (grup 6) ve oksiminopenisilinler (grup 7) (Bryskier, 2005).

1.3.2. Sefalosporinler

İlk sefalosporin 1945 yılında fungal *Cephalosporium acremonium*'un kültüründen elde edilmiştir (Saradhi, 2012). Kimyasal olarak modifiye edilmiş sefalosporin-C olan sefhalotin parental kullanım için ilk sefalosporindir (Bryskier, 2005). Sefalosporin çekirdek yapısı pozisyon bir de sülfür atomu ile altı-елеmanlı dihidrothiazin halkasına birleşmiş β -laktam halkası içerir (Bryskier, 2005; Saradhi, 2012). Sefalosporinler antibiyotik aktivitelerine göre ve tarihsel gelişimlerine göre dört ana sınıfa ayrılırlar. Her bir yeni sınıf eski sınıfa göre Gram-negatifler üzerinde daha fazla aktiviteye sahiptirler. 1. sınıf sefalosporinler (sefazolin, sefaloridin ve sefhalotin) Gram-pozitif bakteriler üzerinde daha fazla etkiye sahiptirler. 2. sınıf sefalosporinler (sefoksitin, sefuroksim ve seftriakson) Gram-negatif bakteriler üzerinde ki etkileri artmıştır. 3. sınıf sefalosporinler (seftazidim, sefotaksim ve sefiksim) Gram-negatiflere karşı çok daha iyi aktivite gösterirler ve Gram-pozitifler üzerindeki etkileri daha azdır. 4. sınıf sefalosporinler (sefepim, sefpirom ve sefzopran) hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteriler üzerinde çok yüksek aktivite gösterirler. Dahası 4. sınıf sefalosporinler β -laktamlara göre çok daha kararlıdır (Bryskier, 2005).

1.3.3. Karbapenemler

İlk karbapenem olan thienamycin *Streptomyces cattleya*' dan elde edilmiştir ve pH>8 de kararlı olmadığı için klinik kullanım için uygun görülmemiştir (Albersschonberg vd., 1978). Karbapenemler thienamycin gibi doğal veya imipenem gibi sentetik orjinli olarak ayrılabilirler. İmipenem klinik olarak kullanılabilen ilk karbapenemdir (Kesado vd., 1980). Karbapenemler, β -laktamların en güçlü sınıfıdır ve Gram-pozitif, Gram-negatif ve anaerobik bakteriler üzerinde yüksek aktivite gösterirler (Zhanel vd., 2007).

1.3.4. Monobaktamlar

Aztreonam klinikte kullanılan tek monobaktamdır. *Enterobacteriaceae*'ye ve *P. aeruginosa*'a karşı yüksek aktivite gösterir (Sykes vd., 1981). β -laktamların antibakteriyel spektrumları Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2. β -laktam sınıfları ve antibakteriyel spektrumları (Todar, 2012).

β -laktam	Kimyasal Sınıf	Örnekler	Aktivite spektrumu	
			Gram-pozitif	Gram-negatif
Penisilinler	Penisilinler	Penisilin-G Penisilin-M	+	-
	Yarı-sentetik β -laktamlar	Amoksilin, Ampisilin	+	-
Sefalosporinl	1. sınıf	Sefhalotin, Sefazolir	+	\pm
	2. sınıf	Sefoksitin, Sefuroksim	\pm	+
	3. sınıf	Seftazidim, Sefotaksim	\pm	+
	4. sınıf	Sefepim, Sefpirome	+	+
Penemler	Karbapenemler	İmipenem, Meropenem	+	+
Monobaktam	Monobaktamlar	Aztreonam	+	+

+: iyi aktivite, \pm azalmış aktivite

1.4. β -Laktamazlar

β -laktamların etkinliği, inhibe etme kabiliyetlerine ve hedeflerine girebilme özelliklerine bağlıdır. Bakterilerin β -laktamlara karşı direnç oluşturmalarının temel mekanizması hidrolitik enzimler üretmeleridir. Bu hidrolitik enzimler, β -laktamazlar olarak adlandırılırlar ve β -laktam halkasındaki amid bağlarını kırarak β -laktamları inhibe ederler (Essack, 2001; Siu, 2002). Gram-pozitif bakterilerde β -laktamazlar, ya ekstraselüler yüzeye atılırlar ya da sitoplazmik membrana giderler. Gram negatiflerde ise periplazmik yüzeye yerleşmişlerdir (Fisher vd., 2005). β -laktamazlar yapısal olarak penisilin bağlayan proteinlerle (PBP) ile ilişkilidirler. İlk β -laktamazlar daha penisilinlerin klinik kullanımı olmadan önce 1940 (Abraham, 1940) yılında *Escherichia coli* de rapor edilmiştir. Daha sonra β -laktamazlar Gram-pozitif, Gram-negatif ve Mycobacteria'da rapor edilmiştir (Livermore, 1995; Majiduddin vd., 2002). Şimdiye kadar 1000' den fazla β -laktamaz rapor edilmiştir (Davies ve Davies, 2010). Bu enzimler ya kromozomal olarak kodlanırlar ya da genler, transpozonlar ve plazmitler gibi mobil genetik elementler üzerinde bulunmaktadırlar. Sonuç olarak, bakteriler β -laktamlara direnç gösterme ve β -laktamaz genlerini elde etme kabiliyetindedirler.

1.5. β -Laktamazların Mekanizması

Temel olarak β -laktamazlar bakterilerin hücre duvarı biyosentezi üzerinde bakterisidal aktivite gösterirler. 1960'larda, bakteri hücre duvarının yapısı ve biyosentezinin mekanizması tanımlanmıştır. Hücre duvarı bakteriler için koruyucu bir bariyerdir, osmotik basınca karşı direnç gösterir ve hücre bölünmesine katılır (Nanninga, 1998). Bakteri hücre duvarı, hücre duvarın şekil ve bütünlüğünden sorumlu peptit zincirleri ve şekerler ile iç içe bağlanmış linear glikanlardan oluşan peptidoglikan birleşenlerinden meydana gelir. Glikan zincirleri N-asetilmuramik asitten oluşmuşlardır ve N-asetilglukozamin β -1-4 glikosidik bağları tarafından şekerlere bağlanmışlardır (van Heijenoort, 2001).

Hücre duvarı biyosentezi transpeptidaz enzimleri ve PBP tarafından yapılmaktadır. Genel olarak β -laktam PBP'leri inhibe ederek ve bağlanarak hücre duvarı biyosentezini hedeflerler (Tipper ve Strominger, 1965).

1.6. β -laktamazların Sınıflandırılması

β -laktamazlar fonksiyonel, biyokimyasal ve amino asit sıralarının benzerliklerine göre çok fazla farklılık gösterirler. Ambler moleküler sınıflandırmasında amino asit sıralarına göre, β -laktamazlar sınıf A, B, C ve D olmak üzere dört farklı sınıfa ayrılırlar (Tablo 3) (Ambler, 1980). Ambler moleküler sınıflandırmasına göre, yapısal olarak β -laktamazlar serin (Sınıf A, C ve D) ve metallo- β -laktamazlar (sınıf B) olarak iki süper familyaya ayrılabilirler. Serin β -laktamazlar ve metallo- β -laktamazların ikisi de β -laktamaları hidroliz etse de katalitik mekanizmaları farklıdır. Serin β -laktamazlar, aktif bölgelerinde serin içerirken metallo- β -laktamazlar katalitik aktivite de önemli olan Zn^{+2} iyonu içerirler. Bush and Jacoby β -laktamaz sınıflandırılması substrat/inhibitör üzerine yapılmıştır (Bush vd., 1995; Bush ve Jacoby, 2010) (Tablo 3).

Tablo 3. Fonksiyonel, moleküler sınıflandırma ve β -laktamazların özelliği (Bush vd., 1995; Bush ve Fisher, 2011)

Bush-Jacoby grup	Moleküler sınıf	Tercih edilen substrat	İnhibisyon		Enzimler
			CA	EDTA	
1	C	Penisilinler, Sefamisinler, Sefalosporinler, Aztreonam	-	-	MIR-1, CMY-2, FOX-1, P99
1e	C	Penisilinler, Sefamisinler, Sefalosporinler, Aztreonam, G-S	-	-	GC1, MY-37
2a	A	Penisilinler	+	-	PC1
2b	A	Penisilinler, ilk Sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1, TLE-1
2be	A	Penisilinler, Sefalosporinler Monobaktamlar, G-S	+	-	TEM-10, TEM-26, SHV-2'den-SHV-6'ya, CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, VEB-1, GSBL'ler
2br	A	Penisilinler, ilk Sefalosporinler	±	-	TEM-30, TME-76, EM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	A	Penisilinler, Sefalosporinler Monobaktamlar, G-S	+	-	TEM-50, TEM-68, TEM-89
2c	A	Karbencilinler	+	-	PSE-1, CARB-3
2d	D	Cloxacilin veya Oxasilin	±	-	OXA-1, OXA-10, PSE-2
2de	D	Penisilinler, Sefalosporinler, G-S	±	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemler, Cloxacilin	±	-	OXA-23, OXA48
2e	A	Sefalosporinler	+	-	CepA
2f	A	Penisilinler, Sefamisinler, Karbapenemler Sefalosporinler	+	-	IMI-1, KPC-2, KPC-3, NMC-A, SME-1, GES-2
3a	B	Penisilinler, Sefamisinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	-	+	IMP, VIM, NDM, BcII, CcrA, L1, AIM-1, FEZ-1
3b	B	Karbapenemler	-	+	CphA, Sfh-1

CA: klavulanik asit; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic asit; G-S: Genişlemiş-Spektrum; +:pozitif; -:negatif; ±: kısmen inhibe ediliyor.

1.7. Metallo- β -Laktamazlar (MBL'ler)

Metallo- β -laktamazlar, metallo-hidrolaz süper familyasına aittirler. İlk MBL enzimi, 1966 da *Bacillus cereus* (BcII) de tanımlanmıştır ve EDTA ile inhibe olması ve sefolasporinaz aktivitesine sahip olması gibi ilginç özellikler göstermiştir (Abraham, 1940). İlk başlarda MBL'ler çevresel ve fırsatçı Gram-negatif bakterilerde bulunmuştur. Ancak, yaklaşık 20 yıl kadar sonra MBL'ler klinik olarak önemli pek çok patojen bakterilerde görülmüştür. MBL genleri bazı çevresel inhabitant bakterilerde sıklıkla

bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar MBL genlerinin ya horizontal gen transferi tarafından kazanılmış (kazanılmış MBL'ler) olarak ya da kromozomlar üzerinde doğal olarak bulunduğunu göstermiştir (Cornaglia vd., 2011).

MBL'ler son 50 yılda β -laktamlara karşı direncin en önemli faktörü olmuştur. Dahası, MBL'ler monobaktam olan aztreonam hariç tüm β -laktam sınıf antibiyotikleri hidroliz edebilirler ve geniş-spektrum aktivite gösterirler (Walsh, 2010). MBL'ler aktif bölgelerinde β -laktamları hidroliz etmek için polarize olmuş su molekülü ve korunmuş amino asitler ile koordine olmuş bir veya iki Zn^{+2} iyonu bulundurlar (Ganta vd., 2009). Bütün MBL'ler metal bağımlı katalitik mekanizmalarından dolayı, EDTA ve diğer metal şelatörleri ile inhibe olurlar. MBL'ler'in hidroliz mekanizması, diğer β -laktamazlarla karşılaştırıldığında farklıdır (Walsh, 2010). Bundan dolayı MBL'ler klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi klasik serin β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmazlar ve MBL'ler aktivitesini inhibe eden klinikte kullanılabilecek inhibitör yoktur (Saradhi, 2012). Genel olarak, tüm MBL'ler de, Zn^{+2} iyon(lar)lu merkezde "ββ"-sandwich ve diğer tarafında iki α -heliksli "αβ/βα" motifli dört tabaka ortak olarak bulunur (Fabiane vd., 1998) ve bu yüzden ortak bir atadan geldikleri ileri sürülmektedir (Daiyasu vd., 2001).

1.7.1. Kromozomal Olarak Kodlanan MBL'ler

Kromozomal olarak kodlanan MBL'ler: *Bacillus cereus* (BcII), *Bacteroides fragilis* (CcrA), *Bacillus anthracis* (bla₂), *Chryseobacterium indologenes* (INDs), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaBs), *Chryseobacterium gleum* (CGB-1), *Myroides odoratus* (TUS-1), *Myroides odoratimimus* (MUS-1), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1), *Aeromonas hydrophila* (CphA), *Aeromonas veronii* (ImiS ve AsbM1), *Serratia marcescens*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mb11b ve CAU-1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *C. meningosepticum* (GOB-1) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) örnek olarak verilebilir. İlk silent MBL geni *B. anthracis*' de keşfedildi ve daha sonra bir diğer silent MBL gen olan *bla*_{CifA} *B. fragilis* de görülmüştür. Kromozomal MBL'ler genellikle buldukları cinse veya türe bakılmaksızın kendi aralarında çok az değişiklik gösterirler (Saradhi, 2012).

1.7.2. Kazanılmış MBL'ler

Kazanılmış MBL'ler'in *P.aeruginosa*, *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* gibi türleri bulunduran *Enterobacteriaceae* gibi kilinikte çok önemli olan Gram-negatif patojenler arasında yayılması çok ciddi problemdir (Cornaglia vd., 2011). Daha önemlisi MBL'ler diğer direnç genleri ile birlikte taşınarak çoklu ilaç dirençli suşlar oluştururlar (Walsh vd., 2005). MBL'ler hızlı yayılımı, plazmidler, transpozonlar ve ISCR elementleri gibi mobil genetik elementler ile MBL genleri arasındaki ilişkiden dolayıdır (Walsh vd., 2005; Cornaglia vd., 2011). Kazanılmış MBL'ler'in orjini hala bilinmemektedir fakat çevresel bakteriler ve Gram-negatif fermenterlerden orjin aldıklarına inanılmaktadır (Cornaglia vd., 2011). Kazanılmış MBL'ler yayılımının önlenmesi hastaların tedavisi ve enfeksiyon kontrolünde çok önemli yer tutmaktadır (Cornaglia vd., 2011). Yunanistan da çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerinde transfer olabilen MBLlerin tanımlanması MBL'ler yayılım oranının standart bir örneğidir. Daha önemlisi aztreonam hariç tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz edebilen New Delhi Metallo-beta-laktamaz-1 (NDM-1)'in 2009 yılında ilk raporundan bu yana pek çok ülkede rapor edilmeye başlanmıştır (Walsh vd., 2011; Wilson ve Chen, 2012).

1.7.3. Kazanılmış MBL'lerin Küresel Epidemiyolojisi

İlk kazanılmış MBL'ler olan *bla_{IMP}*, *P. aeruginosa* suşunda Japonya' da tanımlanmıştır (Watanabe vd., 1991). Diğer kazanılmış MBL'ler: VIM, NDM, SPM-1, GIM-1, SIM-1, DIM-1, TMB-1, KHM-1, AIM-1 ve SMB-1' dir (Tablo 4) (Walsh vd., 2005; Cornaglia vd., 2011). Küresel skalada IMP, VIM, NDM ve bazı SPM-1 en sık bulunan MBL'ler'lerdir. Diğer MBL'ler sınırlı jeografikal bölgede veya tek bir vakada görülmüştür. IMP, VIM ve NDM'nin pek çok varyantı tanımlanmıştır. Şimdiye kadar IMP'nin 51, VIM'ın 46 ve NDM'nin 16 aleli tanımlanmıştır (<http://www.lahey.org/Studies>). Sırasıyla IMP, VIM ve NDM'nin farklı varyantları arasında amino asit benzerlikleri %87.1-%99.7, %74.3-%99.6 ve %98.6-%99.6'dır.

Tablo 4. Bakteriyel konak ve orjinleriyle kazanılmış MBL'ler

MBL-tipi	Konak	Orjin	Kaynak
IMP	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>A. lwoffii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>A. xylosoxidans</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>A. caviae</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>A. faecalis</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. vulgaris</i> ,	Japonya, Kore, Brazilya, Singapur, İngiltere, İtalya, Hong Kong, Çin, Avusturalya, Portekiz, Kanada, Malezya, Tayvan, Amerika, Norveç	Walsh vd., 2005; Cornaglia vd., 2011; Iyobe vd.,2002; Jeannot vd., 2012
VIM	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P.putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P.stutzeri</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>A. xylosoxidans</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>E. aerogenes</i> ,	İtalya, Kore, Singapur, Yunanistan, Fransa, İspanya, Şile, Hırvatistan, Cezayir, Kolumbia, Venezuela, Arjantin, Portekiz, İsveç, Polonya, Amerika, Norveç, Hindistan, Tayvan, Türkiye, Meksika, Japonya	Walsh vd., 2005; Cornaglia vd., 2011; Papagiannitsis vd., 2011
NDM	<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Hindistan, İsveç, Fransa, Norveç, Danimarka, İngiltere, Hollanda, Cezair, Afganistan, Çin, Güney Afrika, Mısır, İsrail, Kore Almanya, İtalya, Türkiye	Wilson ve Chen, 2012; Yong vd., 2009; Poirel vd., 2012a.
Diğerleri (GIM-1, DIM-1, SPM-1, KHM-1, SIM-1 TMB-1, AIM-1, SMB-1)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>A. xylosoxidans</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>C. freundii</i>	Almanya, Libya, Hollanda, Brazilya, Avusturalya, Kore, Japonya	Walsh vd., 2005; Rieber vd., 2012; Wachino vd., 2011

1.8. MBL'lerin Sub-Sınıflandırılması

β -laktamazların Ambler sınıflandırılmasına göre, MBL'ler sınıf B'ye aittirler (Ambler, 1980). Aminoasit sırası farklılıkları ve yapısal farklılıklarına göre MBL'ler B1, B2 ve B3 olmak üzere üç alt sınıfa ayrılır (Garau vd., 2004; Galleni vd., 2001). Her bir alt grup pek çok varyant ve çeşitli MBL'ler'leri içerir. MBL'ler üç boyutlu yapısı, bu alt

sınıfların aktif bölgedeki aminoasit Zn^{+2} iyon koordinasyonu, aktif bölgedeki Zn^{+2} iyonunun miktarı ve loop bölgelerinde önemli farklılıklara sahip olduğunu göstermiştir (Galleni vd., 2001).

1.8.1. B1 MBL'ler

B1 alt sınıf enzimleri BcII enzimi hariç aktif bölgelerinde iki Zn^{+2} iyonu bulduran monomerik enzimlerdir. B1 alt sınıfına ait MBL'ler amino asit seviyesinde yaklaşık %23 benzerlik gösterirler ve çok sayıda farklı MBL'leri içerirler. Bu enzimler karbapenemler dahil çoğu beta-laktamlara karşı geniş-spektrum aktivite gösterirler (Felici vd., 1993). İstisna olarak *Shewanella frigidii*'de tanımlanmış SFB-1 enzimi benzil-penisilin, tigarçilin, meropenem ve 3. sınıf sefalosporinlere karşı düşük aktivite gösterir (Poirel vd., 2005). B1 alt sınıfının çok fazla üç boyutlu yapısı çözüldüğünden dolayı B1 alt sınıfına göre daha iyi karakterize edilmiştir. B1 alt sınıfı BcII, CcrA, BlaB gibi kromozomal kodlanan MBL'ler ve IMP, VIM, NDM, GIM-1, DIM-1, TMB-1, KHM-1, SPM-1 ve SIM-1 gibi kazanılmış MBL'ler içerir (Cornaglia vd., 2011). İyi bilinen çoğu MBL'ler B1 alt sınıfına aittir.

1.8.1.1. VIM-Tipi Metallo-Beta-Laktamaz

Kazanılan MBL'lerin dominant grublarından biri VIM-tipi metallo-beta-laktamazlardır. VIM-1 ilk olarak 1999 yılında Verona İtalya'da bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. *bla_{IMP}*'de olduğu gibi, *bla_{VIM-1}* geni sınıf 1 integron gen kasetleri ile birlikte bulunmaktadır. Bu integron *bla_{VIM-1}* gen kasetine ek olarak, sınıf 1 integronlarda tipik olan integraz geni ve aminoglikozidlere direnci kodlayan *aacA4* gen kasetini taşır (Lauretto vd., 1998). *bla_{VIM-2}*, ilk olarak Güney Fransa'da 2000 yılında *P. aeruginosa* izolatında görülmüştür (Poirel vd., 2000). Tayvan'da *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-3 görülmüştür. VIM-3'ün aminoasit yapısı VIM-2'den 2 aminoasit oynamayla değişir. Yunanistan Larissa'dan bir *P. aeruginosa* izolatında VIM-4 rapor edilmiştir. VIM-4, VIM-2 ve VIM-3 te olduğu gibi, VIM-1'den sadece bir amino asit değişikliğiyle (Ser175Arg) ayrılır.

VIM-1'den 5 aminoasit değişikliği ile ayrılan VIM-5 ise, 2004 yılında ilk olarak Türkiye- Ankara'da *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında izole edilmiştir (Bahar vd., 2004). Singapur'dan iki *P. putida* izolatında β -laktamaz VIM-6 izole edilmiştir. VIM-6 VIM-2'den iki aminoasit değişikliği (59. pozisyonda glutamin/arjinin ve 165. pozisyonda asparajin/serin) ve VIM-3'den sadece bir aminoasit değişikliği ile ayrılır. VIM-7, Houston Teksas'tan bir karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. VIM-1 ile %77 ve VIM-2 ile %74 benzerliği olup, VIM-tipi β -laktamazlar arasında yeni bir üçüncü alt grup oluşturur. Raporlar, VIM-tipi β -laktamazların farklı coğrafî alanlardan görüldüğünü işaret etse de, bu gibi enzimlerin belirli bölgelerde yayılımını değerlendirmek üzere bazı çalışmalar yapılmıştır. VIM-1 ve VIM-2 birkaç değişik Enterobakter türlerinden tanımlanmış olsa da, bu enzimlerin bilinen en önemli rezervuarı *P. aeruginosa*'dır (Pagniez vd., 2004).

1.8.1.2. NDM-1 Tip Metallo-Beta-Laktamaz

NDM-1 (NewDelhi metallo- β -laktamaz-1) en son keşfedilen moleküler sınıf B (çinko-metallo) beta-laktamaz enzimidir. İlk kez 2008 yılında İsviçre'de yaşayan Hintli bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında tanımlanmış (Yong vd., 2009; Nordmann vd., 2011) olup yapılan çalışmada her iki izolatın fenotipik testleri metallo-beta-laktamaz üretiminden dolayı karbapenem direncinin olduğunu ileri sürmüş fakat PZR analizi bilinen metallo-beta-laktamaz genlerini tespit etmek için başarısız olmuştur. Klonlama ve sekanslama çalışmaları sonucu yeni bir MBL enziminin olduğunu göstermiş (Yong vd., 2009) ve bu yeni MBL geni NDM-1 olarak belirlenmiştir (Yong vd., 2009). 2011 yılında NDM-2 tanımlanmış ve tek bir aminoasit değişimi ile NDM-1'den farklı olduğu tespit edilmiştir (Kaase vd., 2011). NDM-1'in ilk keşfinden sonra, NDM-1 pek çok bakteri türü olmak üzere dünya genelinde görülmeye başlamıştır. 2008-2009 yılları arasında İngiltere, Hindistan, Pakistan ve Bangladesh' de geniş bir araştırma çalışması başlatılmış ve toplam 37 NDM-1 pozitif izolatın 29'u İngiliz hastalarında bulunmuştur. İngiltere' deki raporlarda NDM-1 taşıyan 29 hastanın yarısından fazlasının Hindistan'a ve Pakistan'a seyahat geçmişlerinin olduğunu göstermiştir (Bogaerts vd., 2010). 2010 yılında Pune de bir hastane de NDM-1 pozitif *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. suşları tespit edilmiştir (Bharadwaj vd., 2012).

Yine aynı yıl içinde NDM-1 pozitif *Acinetobacter* spp. Chennai de bir hastane de görülmüştür (Karthikeyan vd., 2010).

NDM-1 genel olarak Enterobacteriaceae familyası üyelerinde tanımlanmış ve epidemiyolojik olarak Hindistanla bağlantılı oldukları tespit edilmiştir. Son bulgular Balkanların ve Orta Doğunun NDM-1'in ikinci bir rezervuarı olabileceğini ileri sürmektedir (Nordmann vd., 2011).

NDM-1 şimdiye kadar Almanya, Hindistan, İngiltere, Kanada, Amerika, Kenya, İsrail, Güney Africa, Güney Kore, Tayland, pek çok Avrupa ülkelerinde ve Çin gibi Uzak Doğu Ülkelerinde tespit edilmiştir (Karthikeyan vd., 2010; Nordmann vd., 2011; Chen vd., 2011a; Chen vd., 2011b; Kus vd., 2011; Espinal vd., 2011; Poirel vd., 2011; Brink vd., 2012; Kim vd., 2012; Rimrang vd., 2012). Türkiye' de 2011 yılında *K. pneumoniae* suşunda tanımlanmıştır (Poirel vd., 2012b). *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları dışında pek çok ülke de *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Providencia* spp. gibi klinik Enterobacteriaceae üyelerinin yanı sıra klinik *A. baumannii* izolatlarında da tanımlanmıştır (Chen vd., 2011a; Chen vd., 2011b).

NDM-1 Hindistan da çevresel izolatlarda da görülmeye başlanmış ve yapılan bir çalışmada kanalizasyon örnekleri ve New Delhi musluk suyu incelendiğinde, NDM-1 Enterobacteriaceae üyeleri de dahil olmak üzere, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Aeromonas* spp. ve *Vibrio cholerae* da bulunmuştur. Bu dağılım, konak ayrımı gözetmeyen plazmit ile *bla_{NDM-1}* arasındaki ilişkiyi göstermektedir (Walsh vd., 2011). *bla_{NDM-1}* geni, IncA/C, IncF, IncL/M gibi farklı plazmitler tarafından taşınabilir ve çok nadir olarak kromozomal olarak entegre olur (Walsh vd., 2011). *bla_{NDM-1}* kodlayan çoğu plazmitler çeşitli direnç determinantları içinde ortak sığınak olabilirler. *bla_{TEM-1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-10}* ve *bla_{CMY}* gibi beta-laktamazları kodlayan genler dâhil olmak üzere, kinolan direnci oluşturan *qnrA6* ve *qnrB1*, 16S RNA metilasyonuna neden olan *armA*, *rmtA*, ve *rmtC* (54-56), rifampisin ribosil transferazı kodlayan *arr-2*, sulfonamid direncine neden olan *sul-2*, kloromfenikol asetiltransferazı kodlayan *ereC* geni bu direnç determinantlarına örnek olarak verilebilir. VIM ve IMP gibi çoğu metallo-beta-laktamaz genleri sınıf 1 integronlar

içinde gömülü halde olan mobil gen kasetleri üzerinde bulunurlar ki bu durum NDM-1 geni için geçerli değildir. Böyle bir ayrımın olması NDM-1 geninin kökeninin VIM ve IMP tipi beta-laktamaz enzimlerinden farklı olduğundan kaynaklanmaktadır (Walsh vd., 2005).

1.8.2. B2 MBL'ler

B2 alt sınıfı MBL'ler karbapenem hidrolizine karşı yüksek spesifikite gösterdiklerinden dolayı 'doğru' karbapenemazlar olarak kabul edilirler fakat B2 MBL'ler B1 ve B3 ile karşılaştırıldığı zaman penisilinlere ve sefalosporinlere karşı zayıf hidrolitik aktiviteye sahiptirler (Felici vd., 1993). B2 alt sınıfı B1 alt sınıfı ile aminoasit seviyesinde benzerlik gösterir (Hall vd., 2003; Hall vd., 2004) ve ortak atadan geldikleri ileri sürülmektedir (Garau vd., 2005). Ancak, B2 alt sınıfı enzimleri aktif bölgelerinde 1 Zn^{+2} iyonu taşımalarıyla karakterize olmuşlardır ki bu β -laktam hidrolizi yapabilmeleri için gereklidir. Çok az miktarda B2 alt sınıfı enzimi vardır ve kendi aralarında aminoasit seviyesinde %51 farklılık gösterirler. Şimdiye kadar rapor edilen B2 enzimleri monomeriktir ve tanımlanan B2 enzimleri CphA, ImiS ve SFH-1 kromozomal olarak kodlanmaktadır (Saavedra vd., 2003).

1.8.3. B3 MBL'ler

Alt sınıf B3 enzimleri, kromozom veya plazmit üzerinde bulunan *bla_{L1}* geni ve sonradan kazanılmış olan AIM ve SMB-1 enzimleri hariç doğal olarak kromozom üzerinde bulunmaktadırlar (Wachino vd., 2011). Alt sınıf B3 MBL'lere başka örnek olarak FEZ-1, THIN-B, Mb11b, BJP-1 ve CAU-1 verilebilir (Stoczko vd., 2006). B3 MBL'ler üreten bakterilerin çoğu çevresel inhabitantırlar ve non-patojenlerdir. B3 enzimleri aktif bölgelerinde iki Zn^{+2} iyonu taşırlar ve L1 enzimi (tetramer) hariç hepsi monomerdir.

1.9. MBL'ler Üç Boyutlu Yapısı

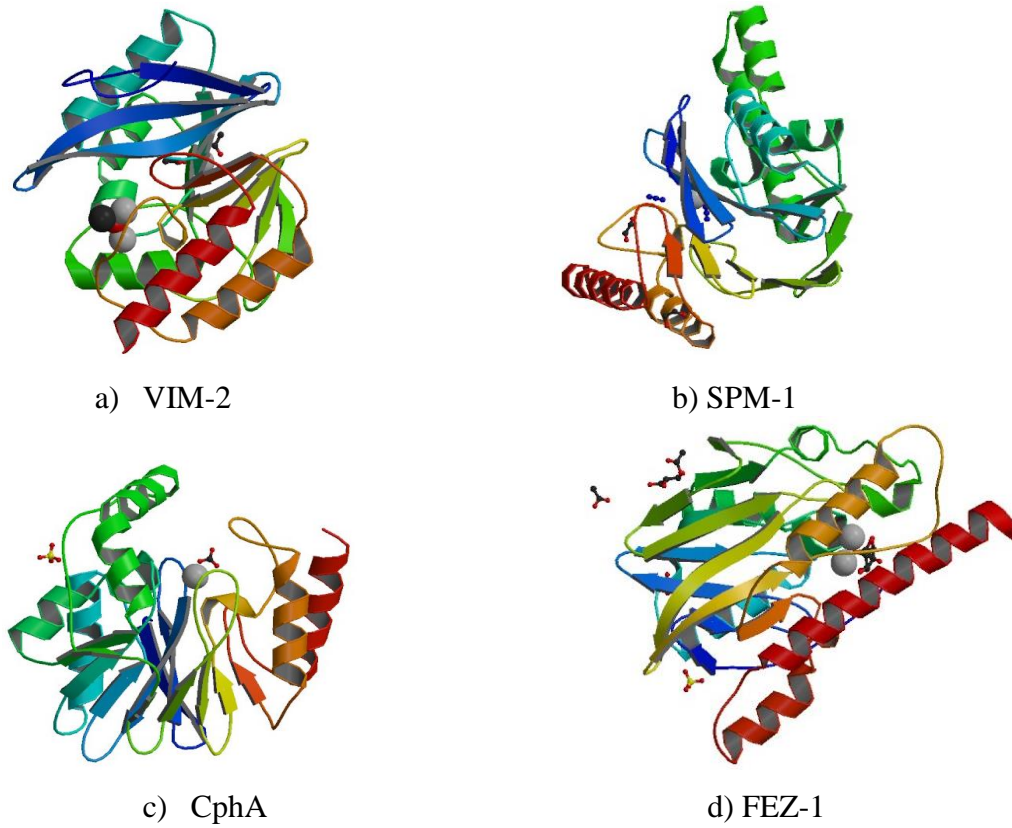
BcII mono-çinko şekli ilk çözülen MBL'dir ve MBL'ler'lerin $\alpha\beta/\beta\alpha$ protein yapısı ortaya çıkmıştır. Şimdiye kadar üç alt sınıftan pek çok MBL'ler yapısı çözülmüştür (Tablo 5).

Tablo 5. B1, B2 ve B3 alt sınıf MBL'lerin erişilebilir üç boyutlu yapıları ve PDB kodları (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Alt sınıf	Enzimler	PDB kodları	Kaynaklar
B1	BcII	1BMC, 1BVT, 1BC2, 2BC2, 3BC2, 1DXK, 2NZE, 2NYP, 2NXA, 3I11-3I15, 3KNS, 3I0V	Fabiane vd., 1998; Carfi vd., Chantalat vd., 2000
	CcrA	1ZNB, 2ZNB, 3ZNB, 4ZNB, 2BMI, 1A7T, 1A8T, 1HLK, 1KR3,	Concha vd., 1996; Murphy vd., 2003)
	SPM-1	2FHX	(Murphy vd., 2003
	IMP-1	1DDK, 1JJE, 1JIT, 1DD6, 2DOO	Toney vd., 2001; Kurosaki vd., 2006
	VIM-2	1KO2, 1KO3, 2YZ3	Garcia-Saez vd., 2008; Yamaguchi vd., 2007
	VIM-4	2WRS	Lassaux vd., 2011
	IND-7	3L6N	Yamaguchi vd., 2010
	NDM-1	3Q6X, 3RKJ, 3RKK, 3SBL, 3SFP, 3ZR9, 3SRX, 3SPU, 3PG4	Kim vd., 2011; Zhang vd., 2011; Green vd., 2011; King vd., 2011
CphA	1X8I, 1X8H, 1X8G, 2GKL, 2QDS	Garau vd., 2005	
B2	SFH-1	3Q6V	Fonseca vd., 2011
	L1	1SML, 2AIO, 2FM6, 2FU6-2FU9,	Nauton vd., 2008; Spencer vd.,
B3		2GFJ, 2GFK, 2H6A, 2HB9, 2QIN, 2QJS, 2QDT	2005; Crisp vd., 2007; Lienard vd., 2008
	FEZ-1	1JT1, 1KO7, 1L9Y	Garcia-Saez vd., 2003
	BJP-1	3M8T, 3LVZ, 2GMN, 1ERO	Docquier vd., 2010

Tüm MBL'ler'lerin karakteristik tabakaya sahip olması ($\alpha\beta/\beta\alpha$) ve katalitik mekanizma veya fonksiyona sahip olmasıyla hepsinin ortak bir atadan geldiği ileri sürülmektedir (Daiyasu vd., 2001). Tüm MBL'ler bütün yapısı çekirdekte 2 β -tabakası iç kısımda 5 α -heliks ile β -tabakası ve α -heliks içeren çeşitli looplardan oluşur (Şekil 3). Aktif bölge olukları substratla en iyi etkileşim olacak şekilde β -tabakaları tarafından

şekillendirilerek iç yüzeye yerleşmiştir (Wang vd., 1999). Üç boyutlu tabakada korunmuş motifler ve ortak bir tabaka olmasına rağmen, her bir alt sınıf arasında aktif bölgede Zn^{+2} iyon koordine kalıntıları, Zn^{+2} iyonu sayısı ve gözlenmiş loop bölgeleri gibi dikkate değer farklılıklar vardır (Bush vd., 2010). Dahası, intramoleküler disülfüt köprüleri B3 alt sınıfının tek özelliği olarak gözlemlenmiştir ve bu özelliğin protein katlanmasında önemli bir rolünün olduğu ileri sürülmektedir. FEZ-1 ve L1 de Cys256-Cys290 arasında ve BJP de Cys200-Cys220 arasında bir intramoleküler köprü gözlenmiştir (Garcia-Saez vd., 2003; Docquier vd., 2010).



Şekil 3. MBL'lerin üç boyutlu yapısı a) VIM-2 (PDB kodu: 1KO3, B1 alt sınıfı), b) SPM-1 (PDB: 2FHX, B1 alt sınıfı), c) CphA (PDB:1X8G, B2 alt sınıfı), d) FEZ-1 (PDB: 1K07, B3 alt sınıfı). Zn^{+2} iyonları turuncu renk, loop bölgeleri mavi renk ve VIM-2 için loop 2 yeşil renkte gösterilmiştir (Saradhi, 2012).

Çeşitli looplar açısından, B1 alt sınıfı SPM-1 hariç N-terminal domainden 60-66 residuslar tarafından şekillendirilmiş olan ve loop1 olarak anılan önemli esnek veya hareketli loop içerir (Murphy vd., 2006). Loop1'in substrat ve inhibitör ile interaksiyonun olduğu gösterilmiştir (Moali vd., 2003; Huntley vd., 2003). Elde edilebilir B1 MBL'ler yapılarına göre, hem doğal hem de inhibitör ile kompleks yapılar loop1'in doğal enzimlerde esnek olduğunu göstermektedir (Moali vd., 2003). Ancak, bir

inhibitör enzime bağlandığı zaman loop1 stabilize veya hareketsiz olabilir. Böylelikle loop1 substratı aktif bölgede yakalar (Moali vd., 2003). Bu yüzden loop1'in delesyonu enzim aktivitesi üzerinde ciddi azalmaya neden olur (Moali vd., 2003). Ayrıca 223-242 residus bileşeni olan loop2 bölgesinin substrat veya inhibitör interaksiyonlarıyla etkileştiği ileri sürülmektedir (Murphy vd., 2006). Uzatılmış loopların delesyonu substratlara karşı aktivitede ve enzim afinitesi üzerinde ciddi etkiler gösterir (Murphy vd., 2006). SPM-1'in yapısal özelliklerinin ve sekans sırasının aydınlatılması ile B1 ve B2 alt gruplarının bir hibridi olduğu ileri sürülmektedir (Bebrone, 2007).

Alt sınıf B2 ve B3 MBL'lerde loop1 bölgesi yoktur (Bebrone, 2007). B2 alt sınıfı aktif bölgeye yakın uzamış $\alpha 3$ heliksi taşır (residues 140-161). CphA da bu loop enzim yüzeyinde kavisli bir yapı oluşturmuştur ve bu yüzden özellikle karbapenemler başta olmak üzere substratlara bağlanma özelliği artmıştır (Garau vd., 2005). B3 alt sınıfı β -7 β -iplikçığı ve $\alpha 3$ (residus 156-166) heliksi arasındaki residuslar tarafından şekillendirilmiş loop2 ile karakterize olmuştur. Bu loop bölgesi B3 alt sınıfında aktif bölgeye yakın olarak yerleşmiştir (Garcia-Saez vd., 2003). Mutasyonel çalışmalar B3 alt sınıfında loop2 residuslarının substratla etkileşeceğini afinite ve katalitik etkide çeşitlilik göstereceğini ileri sürmektedir (Carenbauer vd., 2002).

1.9.1. Aktif Bölge ve Zn-bağlanan Aminoasitler

MBL'ler aktif bölgeleri iyi tanımlanmıştır ve katalitik çinko iyonları ile etkileşen özel rezidüsler taşırlar (Bebrone, 2007). Ancak, bu Zn^{+2} iyonunun koordinasyonu ve miktarı alt sınıflarda farklılık gösterir. B1 ve B3 aktif bölgede iki Zn^{+2} iyonu taşırken (mono-çinkolu B1 MBL'ler hariç), B2 MBL'ler aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu bulundurlar.

B1 alt sınıfının yapısı çok iyi organize olmuştur ve her iki bölgesi (enzimin ortadan ikiye bölündüğü düşünülürse) katalitik Zn^{+2} iyonları ile bağlantılı kurabilir. Aktif bölgede, bir Zn^{+2} iyonu (Zn1) His116-His118-His196 (histidin bölgesi) aminoasitleri ve su molekülünden oluşan tetrahedral düzenleme tarafından koordine edilmektedir. Diğer Zn^{+2} iyonu (Zn2) Asp120-Cys221-His263 (sistein bölgesi) ve iki su molekülünden oluşan köşeli bipiramidal düzenleme tarafından koordine edilmektedir. Aynı su molekülü (genellikle W1 veya Wx) her iki Zn^{+2} iyonları tarafından paylaşılır ve

hidroliz boyunca bir nukleofil olarak iş görür (Concha vd., 1996 ve Saradhi, 2012). Bahsedilen B1 alt sınıfı (BcII'nin ilk başlarda çözülmüş yapısı hariç) aktif bölgede 2 potansiyel Zn^{+2} iyonu bulundurur (Carfi vd., 1995). Ancak, BcII'nin diğer çözülmüş yapıları ve spektroskopik çalışmalar BcII'nin aktif bölgesinde iki çinko iyonunu bulunduğunu göstermiştir (Orellona v., 1998).

B2 alt sınıfı aktif bölgesinde bir Zn^{+2} iyonu bulundurmasıyla B1 ve B3 'den farklıdır. CphA'nin aktif bölge yapısı katalitik Zn^{+2} iyonunun sistein bölgesinde olduğunu göstermektedir (Garau vd., 2005). Zn^{+2} bölgesi ise hala aydınlatılmamıştır. B2 alt sınıfında histidin bölgesinde His116, Asn116 ile yer değiştirmiştir ve bu böylece Asp120, Cys221 ve His263 ile mono-çinko iyonunun koordinasyonu için bir ortam oluşturmuştur (Garau vd., 2005).

B1 alt sınıfı gibi, B3 alt sınıfı da aktif bölgede 2 katalitik Zn^{+2} iyonuna sahiptir (GOB-I mono-çinko hariç) (Hall vd., 2003; Bebrone, 2007). Ancak, B1 alt sınıfı ile karşılaştırıldığı zaman B3 alt sınıfının Zn^{+2} iyonunun koordinasyonu veya bölgesi farklıdır. B3 alt sınıfın da histidin bölgesi B1 alt sınıfıyla aynıdır fakat Zn^{+2} bölgesi farklıdır. B3 alt sınıfının Zn^{+2} bölgesi His121 ile Cys221 yer değiştirmiştir. İkinci Zn^{+2} iyonu Asp120-His121-His263 ve iki su molekülü ile oluşan köşeli bipiramidal yapı ile koordine edilmektedir (Garcia-Saez vd., 2003). Ancak önemli bir istisna olan GOP enziminde metal ligandlar His116 ve Ser221 ile Gln116 ve Met221 yer değiştirmiştir (Moran-Barrio vd., 2007). Aynı su molekülü hem Zn1 hem de Zn2 tarafından paylaşılır ve bu su molekülü B1 alt sınıfında olduğu gibi nukleofili olarak iş görür.

B1 alt sınıf enzimleri mono ve di-çinko formları ile aktiftir fakat BcII de gözleendiği üzere ikinci çinko iyonunun bağlanması aktiviteyi artırır (Davies ve Abraham, 1974). CphA ve ImiS, gibi B2 alt sınıfı enzimleri sadece mono-çinko formuyla aktiftirler ve ikinci Zn^{+2} iyonunun bağlanması CphA'nin katalitik etkinliğini azaltmaktadır (Hernandez Valladares vd., 1997). B3 alt sınıf enzimleri di-çinko iyonu formuyla aktiftir (sadece L1 için gözlenmiştir) (Felici vd., 1993). Arg121'in Zn^{+2} iyonu afinitesinin çeşitliliğinden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. Arg121 (pozitif yüklü amino asit) Arg121 ile Ser121 ve Cys121'in (nötr amino asitler) CcrA ve IMP-1 de yer değiştirmesi hariç B1 ve B2 alt sınıflarında korunmuştur. Bu yüzden CcrA ve

IMP-1 diğerleri ile karşılaştırıldığı zaman her iki çinko bölgesi için yüksek afinite gösterirler. B3 alt sınıfında bu pozisyonda His121 vardır bu yüzden her iki çinko iyonuna karşı yüksek afinite gösterirler (Bebrone, 2007).

1.10. MBL'lerin Biyokimyası

MBL'ler iyi tanımlanmış aktif bölge taşırlar ve aztreonam hariç tüm β -laktam antibiyotikleri hidroliz edebilirler (Felici vd., 1993). Tüm MBL'ler, a) iyi karbapenem aktivitesi, b) EDTA veya metal şerlatrleri ile inhibisyon, c) monobaktamlara karşı aktivitenin görülmemesi gibi ortak özelliklere sahiptirler (Saradhi, 2012). Genelde, B1 alt sınıfı MBL'ler penisilinler, karbapenemler (etkili hidroliz) ve sefalosporinler (penisilinler ve karbapenemler ile karşılaştırıldığında daha az hidroliz olurlar) dahil olmak üzere geniş substrat profili gösterirler (Bush, 1998). B2 alt sınıf MBL'ler ise karbapenemleri etkili bir şekilde hidroliz ederler fakat penisilin ve sefalosporinlere karşı düşük katalitik etkinlik gösterirler. B3 alt sınıfı da penisilin ve karbapenemler ile karşılaştırıldığında sefalosporinleri hidrolizleri daha iyidir (Bush, 1998).

Bir enzimin substrata karşı olan ilgisi K_m , enzim tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına turnover sayısı denir ve kısaca k_{cat} sembolü ile gösterilir, enzimin katalitik etkinliği k_{cat}/K_m olarak ölçülebilir. Bu kinetik parametreler; hidroliz için substratlar, aktif bölge yapısı, Zn^{+2} iyonları ve rezidslerin aktif bölgeye yakınlığı tarafından etkilenmektedir.

Afinite (K_m), turnover (k_{cat}) ve katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) farklı substratlar için MBL'ler alt sınıflarına ait sonuçlar Tablo 6 ve Tablo 7 de gösterilmektedir.

Tablo 6. B1 alt sınıf MBL'lerin Steady state kinetik sonuçları (GIM-1, IMP-1, VIM-7 VE VIM-2)
(Castanheira vd., 2004; Samuelsen vd., 2008).

Substrat	GIM-1			IMP-1			VIM-7			VIM-2		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Ampisilin	3.3	20	0.16	950	200	4.8	190	15	1.3	125	90	1.4
Piperasilin	6.9	69	0.10	ND	ND	ND	140	26	5.4	300	125	2.4
Nitrosefin	5.8	12	0.47	63	27	2.3	1500	58	26	770	18	42.8
Sefhalotin	1.6	22	0.72	48	21	2.4	180	45	4	130	11	12
Sefuroksim	5.9	7	0.80	8	37	0.22	16	29	0.55	8	20	0.4
Sefoksitin	8.3	206	0.04	16	8	2	10	68	0.15	15	13	12
Seftazidim	18	31	0.58	8	44	0.18	1.4	120	0.012	3.6	72	0.05
Sefotaksim	1.1	4	0.24	1.3	4	0.35	56	22	2.6	70	12	5.8
Sefepim	17	431	0.04	7	11	0.66	5.3	580	0.0091	40	400	0.1
Imipenem	27	287	0.09	46	39	1.2	100	27	3.7	34	9	3.8
Meropenem	2.7	25	0.11	50	10	0.12	42	38	1.1	5	2	2.5
Moxalactam	14	1.035	0.01	88	10	8.8	ND	ND	ND	90	55	1.6

Tablo 7. B2 alt sınıf MBL'lerin Steady state kinetik sonuçları (AIM-1, BJP-1, FEZ- VE L-1)
(Stoczko vd., 2006; Docquier vd., 2010)

Substrat	AIM-1			BJP-1			FEZ-1			L-1		
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	(μM)	(s^{-1})	(s^{-1}/M)	(μM)	(s^{-1})	(s^{-1}/M)	(μM)	(s^{-1})	(s^{-1}/M)	(μM)	(s^{-1})	(s^{-1}/M)
Penisilin G	110±21	590±31	5.4X10	130	18	1.3X10 ⁵	590	70	1.1X10 ⁵	50	1110	2.2X10 ⁷
Ampisilin	24±3	150±5	6.3X10	670	13	1.3X10 ⁴	>500	>5.5	1.1X10 ⁴	40	175	4.4X10 ⁶
Sefoksitin	22±2	52±1	2.4X10	140	10	7.1X10 ⁴	11	3	2.7X10 ⁵	2	1.1	5.5X10 ⁵
Sefuroksim	35±4	170±5	4.8X10	115	58	5.0X10 ⁵	50	320	6.4X10 ⁵	30	80	2.7X10 ⁶
Seftazidim	730±180	46±7	6.3X10	>700	>3	4.3X10 ³	>100	>4	4.0X10 ³	145	27	0.2X10 ⁶
Sefepim	440±60	37±1	8.4X10	>400	>0.08	2.0X10 ²	>100	>6	6.0X10 ³	130	0.33	2.5X10 ⁴
İmipenem	410±16	2200±50	5.4X10	260	15	6.0X10 ⁴	>100	>200	2.0X10 ⁵	90	65	7.3X10 ⁵
Meropenem	41±4	760±16	1.8X10	190	156	8.3X10 ⁵	85	45	5.0X10 ⁵	13	77	5.9X10 ⁶
Ertapenem	45±4	340±9	7.5X10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Substratlara karşı afinite (K_m) MBL'ler arasında çeşitlilik gösterir. Örneğin SPM-1 ve L-1 substratların çoğuna karşı yüksek afinite gösterse de IMP-1 ve FEZ-1 diğer MBL'lerle karşılaştırıldığında sefalosporinler ve meropeneme karşı daha yüksek afinite gösterirler. Benzer şekilde, MBL'lerin turnover oranı da değişkenlik gösterir. Örneğin, BcII ve FEZ-1 daha düşük afinite ve yüksek turnover oranı gösterirken VIM-1 karbapenemlere karşı yüksek afinite ve daha düşük turnover sayısına sahiptir. Genelde IMP-1, VIM-2 ve SPM-1 gibi bazı MBL'ler BcII, FEZ-1 ve GIM-1 gibi diğer MBL'ler karşılaştırıldıklarında substratların çoğuna karşı yüksek katalitik etki gösterirler.

İki enzim arasında kinetik parametrelerinin karşılaştırılabilmesi için aynı deneysel koşullarda kinetik parametre verilerinin elde edilmesi gerekmektedir (Docquier vd., 2003). Bu yüzden, kinetik veriler yapısal farklılıklara nazaran fonksiyonel farklılıkları temsil edebilir (Docquier vd., 2003). Örneğin, VIM-1 ve VIM-2 VIM-familyasının iki varyantıdır ve amino asit seviyesinde %93 benzerlik gösterirler. Farklı substratlar için VIM-2 enzim kinetik verileri (penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler) VIM-1 kinetik verileri ile aynı koşullar altında elde edilerek yapılmıştır (Docquier vd., 2003).

VIM-2 düşük turnover oranından (k_{cat}) dolayı VIM-1 (50-100 kat) ile karşılaştırıldığı zaman temosillin hariç penisilinlere karşı hidrolizi etkindir (Docquier vd., 2003). Yine VIM-1 ile karşılaştırıldığında VIM-2'nin benzilpenisilin ve ampisilin hidrolizi oldukça etkilidir. VIM-1 VIM-2'den azosilini daha iyi hidroliz eder. VIM-1 ve VIM-2'nin karbanisilin ve mezosilin kinetik parametreleri aynıdır. Ek olarak, piperasilin, tigersilin ve temosillin hidrolitik etkinlikleri iki enzimde karşılaştırılabilir seviyededir. VIM-1 ve VIM-2 arasında tigersilin ve temosillin afinitelerinin farklılıkları önemlidir. Temosillinde 6- α -methoxy grubunun olması VIM-1 ve VIM-2 arasındaki afinite farkının ortaya çıkmasına neden olduğu ileri sürülmektedir. Sefepim (40-kat daha yüksektir) hariç sefalosporinlere karşı VIM-2, VIM-1' den daha düşük k_{cat} ve K_m değerlerine sahiptir. Sefoksitin, sefuroksim, sefotaksim ve moksalaktam gibi substratlar için k_{cat}/K_m (hidrolitik etkinlik) değerleri VIM-1 ve VIM-2'nin birbirinden farklıdır. Dahası, VIM-2 seftazidime karşı daha yüksek afinite (K_m) gösterir.

Karbapenemlere karşı VIM-1 ve VIM-2'nin hidrolitik etkinliği dikkate degecek oranda farklıdır. İmipenem ve meropenem yüksek turnover ve daha düşük K_m değerlerinden dolayı VIM-2 tarafından çok etkili bir şekilde hidroliz edilmişlerdir. Benzilpenisilinle yapılan çalışmalar VIM-1 ve VIM-2'nin aktif bölgesindeki 224 ve 228. pozisyonda olan aminoasit değişikliklerinin bu enzimlerin kinetik parametrelerindeki değişikliklerinden sorumlu olduğunu göstermiştir. VIM-1 daha kısa ve çoğunluk nötral His224'e sahipken VIM-2 daha uzun ve yüklü Tyr224 amino asitlerine sahiptir. Bu yüzden VIM-1'in His224 ile VIM-2'nin Tyr224'u karşılaştırıldığında Tyr224 ile seftazidimin pozitif olarak yüklü C3 grubunun stabilizasyonu daha etkili bir şekilde olmaktadır. Dahası, VIM-2'nin aktif bölgesinde dışarı çıkmış olan uzun pozitif yüklü Arg228 VIM-1 de bulunan kısa Ser228 ile karşılaştırıldığı zaman substratın afinitesini etkileyebilir. Sınırlı veriler VIM-2 Arg228 guanidium grup benzilpenisilin karboksilat ile etkileşebileceğini ama VIM-1 Ser228 böyle bir etkileşimi yapamayacağını ileri sürmüştür (Docquier vd., 2003). Bundan dolayı kinetik parametrelerin enzimler arasında farklılık göstermesi aminoasitlerin yerleşimlerine ve ayrıca substrat tipine bağlıdır.

Ayrıca pek çok çalışma, kinetik parametreleri etkileyen çeşitli faktörlerin olduğunu da göstermiştir. Zn^{+2} iyonlarının aminoasitler ile koordinasyonu MBL'lerin katalitik etkinliğin de önemli bir rol oynar. Örneğin, CphA (B2 alt sınıfı) Asn116 ve Cys ile koordine olmuştur ve CphA üzerine yapılan mutasyonel çalışmalar Cys221Ser ve Cys221Ala değişiminin enzimin inaktive olacağı şekilde Zn^{+2} iyonun koordinasyonunu zayıflatmıştır. Fakat Asn116Cys ve Asn116His yer değişimi yabanıl tip ile (mutasyon yapılmadan önceki hali) karşılaştırıldığı zaman penisilinlere ve sefalosporinlere karşı katalitik etkinliği arttırdığı gözlemlenmiştir (Vanhove vd., 2003). Aktif bölgeye yakın loopların ve loop bölgesinden aminoasitlerin MBL'lerin kinetik parametrelerini etkilediği ileri sürülmektedir. B1 alt sınıfındaki loop1 ve loop2 farklı substratlara karşı kinetik parametreleri etkilemekte önemli bir rol oynar. B3 alt sınıfında loop bölgeleri 156-162 ve 223-230 amino asitleri ile şekillenmiştir ve bu bölgeler aktif bölgede bulunanlar ile benzer fonksiyon ve benzer substrat etkileşimi göstermektedirler. VIM-1, VIM-2 ve VIM-7'nin katalitik etkinliklerinin karşılaştırılması yapıldığı zaman, penisilinler için: VIM-7>VIM-2>VIM-1, sefalosporinler için: VIM-1=VIM-2>VIM-7 ve karbapenemler için VIM-7=VIM-2>VIM-1 sonucu elde edilmektedir.

1.11. MBL'lerin Katalitik Mekanizması

Genelde β -laktamların MBL'ler ile hidrolizi ilk olarak karboksil grubu üzerine nukleofilik bir atak ile ve laktam halkasının C-N bağının kırılması ile olur. Bunları takiben azot köprülerinin tetiklenen protonasyonu ile olmaktadır (Bounaga vd., 1998). Hidroliz boyunca β -laktam karboksil grubu katalitik Zn^{+2} iyonları veya substratın Zn^{+2} iyonları ile etkileşimiyle doğrudan koordine edilmektedir. İlk elde edilen BcII yapısı mono-çinko formundadır ve hidrolizin mononükleer enzim tarafından yürütüldüğü ileri sürülmektedir (Carfi vd., 1995). Ancak sonraki BcII enzim çalışmaları maksimum katalitik aktivite için sadece di-çinko formunun aktif olduğunu göstermiştir (Fast vd., 2001). Farklı bir araştırmada ise BcII enzimi için hem mono-çinko hem de di-çinko forumlarında aktif olduğu gösterilmiş ve böylece her iki durumda muhtemel iki mekanizmanın olabileceği ileri sürülmüştür (Paul-Soto vd., 1999). Ancak hidroliz için Zn^{+2} iyonuna ihtiyacı olduğu hala tartışmalı bir konudur. Ek olarak MBL'ler hidroliz mekanizması çeşitli substratlar üzerine temellendirildiği ileri sürülmektedir (Bush ve Fisher, 2011). Üç boyutlu yapıya göre MBL'lerin katalitik mekanizması mono ve di-çinko mekanizması olarak ikiye bölünebilir (Murphy vd., 2006).

1.12. MBL İnhibitörleri

MBL'ler klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi klasik serin β -laktamaz inhibitörleri ile inhiye olmazlar (Miller vd., 2001; Toney, 2003). Şimdiye kadar rapor edilen MBL inhibitörleri Tablo 8 de gösterilmektedir fakat toksisitelerinden dolayı klinik kullanım için uygun değildir. MBL ile alakalı ilk inhibitör çalışmaları klinik olmayan araştırmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak VIM-2, IMP-1 ve FEZ-1'in kristal yapısı ile merkaptokarboksilat inhibitör kompleksi inhibitörlerin MBL'lere nasıl bağlandığı gibi bazı bilgiler sağladı (Yamaguchi vd., 2007; Garcia-Saez vd., 2003). Yine BlaB ile D-captopril kompleksi MBL'lerin inhibitör etkileşimi hakkında bilgi vermiştir. Ancak çeşitli MBL'ler olması ve aktif bölge katmanlarının memeli enzimleri ile benzerlik göstermesi başarılı inhibitör geliştirilmesi için ana engeldir. Bu yüzden şimdiye kadar MBL'ler klinikte kullanılabilecek inhibitörleri yoktur. Ayrıca MBL'ler kendi içindeki çeşitliliğinden dolayı tüm MBL'lerin aktivitesine karşı tek bir inhibitör yeterli olmayacaktır (Daiyasu vd., 2001)

Tablo 8. MBL inhibitörleri

Inhibitörün Tipi	Bileşen	Test edilen Enzimler	Kaynaklar
Thiol	Mercaptoacetic acid	IMP-1	Walsh vd., 2005
	Mercaptopropionic acid	IMP-1	
	2'-Mercaptoethyl derivative	BcII	
	Thiobenzoate derivative	IMP-1, CcrA	
	2-para-Thiomandelic acid	BcII	
	Quinoline C45H	IMP-1, VIM-2	
Thioester	Morpholinoethanesulfonic acid	CcrA	
	SB217782/8018/9158, SB214752	L1	
	Biphenylmethyl derivatives	IMP-1, CcrA	
Tricyclic ürünler	SB238569	BcII, IMP-1, CcrA	
	2S-3S disubstitute	IMP-1	
1-β-Methyl carbapenem	J-110, 441	IMP-1, CcrA, L1, BcII	
	J-111, 225	IMP-1	
Penicillin derivatives	Penicillinate sulfone	L1, BcII	
	Penamaldic derivatives	BcII	
N-Arylsulfonyl hydrazone	2-Naphthyl derivatives	IMP-1	
Biphenyl tetrazole	L161, 189	CcrA	
Cysteinyll peptide	D-Phenylalanine derivative	BcII	
Trifluoromethyl Alcohol ve ketones	D-Alanine derivative	BcII, L1	
Thiocephalosporin	Thioacid	BcII	
Pthalic acid	Pthalic acid derivatives (12f)	IMP-1	Hiraiwa vd., 2009
Maleic acid derivatives	ME1071	IMP-1	Ishii vd., 2010
Benzohydroxamic acid	2,5-substituted benzophenone hydroxamic acid	FEZ-1	Lienard vd., 2007
Mercaptophosphatederivatives	Compound 10a, 18	VIM-4, CphA, FEZ-1	Lassaux vd., 2010
Triazoles	3-Mercapto-1, 2, 4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides	IMP-1	Faridoon vd., 2012
Peptides	Peptide derivatives	L1, FEZ-1	Bounaga vd., 2001; Sanschagrın vd., 2005; Sun vd., 2006

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Kitler ve Vektörler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar: bovine serum albumin (BSA) (Sigma), agaroz (Sigma), gliserol (Sigma), dNTP (Promega), MgCl₂ (Promega), etidyum bromür (BioRad), ampisilin (USB), kanamisin (USB), etanol (Sigma), SDS (Merck), NaCl (Fluka), KCl (Merck), EMB (Sigma), Tris (Merck), EDTA (Merck), Agar (Merck), DNA ladder (New England Biolabs, Evry, France), CaCl₂.2H₂O (Sigma), KCO₂CH₃ (Sigma), IPTG (Sigma), X-gal (Sigma), Tween 20 (Merck), PMSF (Sigma), Triton X-100 (Sigma), HEPES (Sigma), nitrosefin (Thermo Scientific), imipenem (Sigma), meropenem (Sigma), doripenem (Sigma), seftazidim (Sigma), sefhalotin (Sigma), sekositin (Sigma).

Çalışma kapsamında kullanılan enzimler: lizozim (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (GoTaq, Promega), Q5® High-Fidelity DNA Polimeraz (Biolabs), HRV 3C proteaz (UK), *EcoRI* (Fermentas), *XhoI* (Fermentas), *DpnI* (Roche), T4 DNA ligaz (Fermentas), Dnaz (Life Technologies).

Çalışmada kullanılan kitler ve vektörler: Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), pGEM-T Easy Vector TA Cloning Kit (Promega), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), pET-28a (Novagen), Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (USA) ve pET100 TOPO® (Life Technologies).

2.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler ve bileşenleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve tamponlar.

Tampon Adı	Tampon Bileşenleri
FSB	100 mM KCl, 50 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, %10 gliserol, 1 M KCO ₂ CH ₃
50X TAE	242 g Tris Base, 57.1 mL glacial asetik Acid, 100 mL 0.5 M EDTA
Kütle spektrometre tamponu	15 mM amonyum asetat
Histrap-Ni-Binding tamponu	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM imidazol pH; 7.5
Elusyon tamponu	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 500 mM imidazol, pH; 7.5
Jel filtrasyon tamponu	200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH; 7.5
Aktivite deney Tamponu	1 mg/mL BSA, 1 mM ZnSO ₄ , ve 0.01% Triton X-100 50 mM HEPES (pH 7.2)
CD Spektroskopisi tamponu	10 mM fosfat tamponu

2.3. *P. aeruginosa* İzolatlarının Temini ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması

Çalışma kapsamında β -laktamaz direnç genleri taşıyıcılığı araştırılacak tüm *P. aeruginosa* izolatları Kasım 2011 ve Ağustos 2012 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesinde izole edilmiştir. Örnekler -20 °C' de %20 gliserol içerecek şekilde stoklanmıştır. Bu tarihler arasında toplam 104 izolat elde edilmiştir. Tüm klinik izolatlar, API 32GN sistemi (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) (CLSI, 2012) kullanılarak tanımlanmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri, VITEK cihazı kullanılarak belirlenmiştir. VITEK kartları üretici firmanın belirlediği şekilde kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle karbapenem üreten suşlar belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi için; piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefoperazone/sulbaktam, sefepim, amikasin, gentamisin, netilmisin, tobramisin, siprofloksasin, levofloksasin, kolistin, doripenem, imipenem, meropenem antibiyotikleri kullanılmış ve CLSI 2013' e göre değerlendirilmiştir. Çoklu ilaç dirençli olan suşlar, E-test yöntemiyle Bezmialem Vakıf Üniversite Hastanesi tarafından belirlenmiştir. Sonuçlar CLSI'e göre değerlendirilmiş ve 24 çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* suşu tespit edilmiştir.

2.4. *P. aeruginosa* İzolatlarından DNA İzolasyonu

Gliserol stok yapılmış olan *P. aeruginosa* izolatlarından tek koloni düşecek şekilde öze ile EMB agar'ayayma ekimi yapılmış ve 37 °C etüv de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası izolatlardan tek koloni alınarak 3 mL sıvı LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de gece boyu inkübe edildikten sonra 1.5 ml gece kültürü 13000 rpm' de 1 dakika çöktürülmüştür. Total DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle elde edilmiş ve pellet 500 µL deiyonize suda çözülerek hücreler 95°C' de 10 dk ısıtılarak lizise uğrattılmıştır. Debris, 14.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek çöktürüldükten sonra süpernatantlar PZR reaksiyonlarında kullanılmıştır.

2.5. Çoklu İlaç Dirençli *P. aeruginosa* İzolatlarının 16S rRNA Dizi Analizi

27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') Forward ve 1492L (5'-GGYTACCTTGTTACGA CTT-3') reverse (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands) oligonukleotidleri kullanılarak her çoklu ilaç dirençli izolatlar için 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildi. PZR reaksiyonu; 50 µL son hacim olacak şekilde; 1,5 ünite DNA polimeraz I (GoTaq, Promega), 5 µl DNA, 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 4 mM her bir dNTP ve 2 µL her bir primer stoku (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. PZR amplikasyonu 2 dk 94°C, 45 sn 94°C, 60 sn 55°C, 60 sn 72°C (35 döngü), ve son sentez 10 dk 72°C de gerçekleştirildi. PZR ürünleri, %1' lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. PZR ürünleri DNA dizi analizi için Macrogen'e (Amsterdam, Hollanda) gönderilmiş ve sekans sonuçları BLAST programı (NCBI GenBank database) kullanılarak değerlendirildi (Altschul et al., 1990; Benson et al., 2012).

2.6. Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişki

İzolatlar arasındaki genetik benzerlik RAPD (rastgele artırılmış polimorfik DNA) tekniğiyle araştırıldı. RAPD reaksiyonu, 50 µL son reaksiyon hacminde, 1X polimeraz tamponu, 5 ng DNA, 4 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 10 µM primer, 1,5 U Taq polimeraz (Promega, Madison, USA) eklenerek hazırlandı. İzole edilen DNA ilk olarak 8 farklı primer (Tablo 10) kullanılarak değerlendirildi ve daha sonra en iyi sonuç veren

2 farklı primer RAPD-29 (5'-GGGTGTGCAG-3') ve RAPD-34 (5'-CACAGCGACA-3') seçilerek DNA'lar çoğaltıldı. RAPD amplikasyonu, 94°C de 1 dk, 40 döngü 94°C de 1 dk, 32°C de 1 dk ve 72°C de 3 dk; son uzama 72°C de 10 dk da gerçekleştirildi. Ürünler ethidium bromide (10 µg/ml) içeren 1,4% agaroz jelde (1X TAE), 1 kb DNA ladder (moleküler marker, New England Biolabs, Evry, France) yürütüldü ve UV ile görüntülendi.

Tablo 10. RAPD analizlerinde kullanılan primerler

Primer İsmi	Primer Sırası
RAPD24	GGATGCCATC
RAPD25	GGTGAACGCT
RAPD29	GGGTGTGCAG
RAPD31	ACGGGCCAGT
RAPD33	AGGCCCGATA
RAPD34	CACAGCGACA
RAPD35	CAAAGCGCTC
RAPD37	GGCTGCAATG

2.7. Beta Laktamaz Genlerinin PZR Yöntemiyle Belirlenmesi

P. aeruginosa suşunun antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonu PZR metoduyla yapıldı. PZR ile karakterizasyonlarında kullanılan oligonükleotidler ve amplifiye edilecek beta-laktamaz direnç genleri Tablo 11' de gösterilmektedir. Standart PZR' ler 50 µL son hacim olacak şekilde; 1,5 ünite DNA polimeraz I (GoTaq, Promega), 5 µl DNA, 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 4 mM her bir dNTP ve 2 µL her bir primer stoku (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplikasyon 5 dk 94°C, 30 sn 94°C, 45 sn 72°C (25 döngü) ve son sentez 7 dk 72°C de gerçekleştirildi. PZR amplikasyon için kullanılan Tm'ler Tablo 10 da verilmiştir. Amplifikasyon ürünleri, %1' lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

2.8. İntegronların PZR Yöntemiyle Belirlenmesi

P. aeruginosa suşlarında sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığının karakterizasyonu, PZR metoduyla araştırıldı. İntegronların varlığının araştırılmasında kullanılan primerler Tablo 11’ de gösterilmektedir. PZR’ ler 50 µL son hacim olacak şekilde; 1,5 ünite DNA polimeraz I (GoTaq, Promega), 5 µl DNA, 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 4 mM her bir dNTP ve 1,5 µL her bir primer stoku (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl’ye tamamlanarak hazırlandı. İntegronlar için amplifikasyon 3 dk 94°C, 45 sn 94°C, 3 dk 72°C (34 döngü) ve son sentez 5 dk 72°C de gerçekleştirildi. İntegronlar PZR amplifikasyon için kullanılan Tm’ler Tablo 11’ de verilmiştir. Amplifikasyon ürünleri %1’ lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Tablo 11. Çalışmada kullanılan spesifik primerler ve Tm’ler (Çiçek vd., 2014).

Primer	5’-3’	Amplicon büyüklüğü	Tm	Kaynaklar
OXA-51	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	353		
OXA-23	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTCTGACCGCATTTCAT	501		
OXA-24	F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	52	Woodford vd., 2006
OXA-58	F: AAGTATTGGGGCTTGTGCTG R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599		
GES	F:ATGCGCTTCATTACGCAC R:CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	863	56	Moubareck vd., 2009
VEB	F:ATTTCCCGATGCAAAGCGT R:TTATTCCGGAAGTCCCTGT	542	55	
PER-2	F:ATGAATGTCATCACAAAATG R:TCAATCCGACTCACT	927	50	Celenza vd., 2006
IMP	F:CATGGTTTGGTGGTCTTGT R:ATAATTTGGCGGACTTTGGC	488	56	
VIM	F:ATTGGTCTATTTGACCGCGTC R:TGCTACTCAACGACTGAGCG	780	58	Jeon vd., 2005
CTXM1 grup	F:GCGTGATACCACTTCACCTC R:TGAAGTAAGTGACCAGAATC	260	50	
CTXM2 grup	F:TGATACCACCACGCCGCTC R:TATTGCATCAGAAAACCGTGGG	341	50	Xu vd., 2005
TEM	F:AGTATTCAACATTTYCGTGT R:TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	860	49	Bu çalışma da

NDM	F: GAGATTGCCGAGCGACTTG R: CGAATGTCTGGCAGCACACTT	457	54	Chihara vd., 2011
Smif 1 integron	5'CS:5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' 3'CS:5'-AAGCAGACTT ACCTGA-3'	Değişken	55	Çiçek vd., 2013
Smif 2 integron	hep51:5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3' hep74:5'-CGGGATCCCGACGGCATGCACGA- 3'	Değişken	55	Çiçek vd., 2013

2.9. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

E.coli'nin DH5 α , XL-1 Blue, BL21 (DE3) ve BL21(DE3)pLysS soylarını kompetent hale getirmek için ekildiği LB-Agar üzerinden tek bir koloni alınarak 3 ml LB ortamına ekilerek 37 °C' de bir gece boyunca üretildi. Üretilen örnekten 500 μ l alınarak 50 mL LB besi yerine tekrar ekim yapıldı. 37 °C' de yaklaşık 2-3 saat OD₆₀₀=0,4'e ulaşınca kadar büyütüldü. Büyütüldükten sonra kültür 5 dakika buzda bekletildi ve falkonlara alınarak +4 °C' de 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Pellet 7,5 ml soğuk FSB (Frozen storage buffer: 100 mM KCl, 50 mM CaCl₂.2H₂O, %10 gliserol, 1 M KCO₂CH₃) tamponunda çözüldükten sonra 2 saat buzda bekletildi ve 10 dk 6000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılıp tekrar 2 ml soğuk FSB tamponunda pellet çözüldü. Hazırlanan hücreler -80 °C de saklandı.

2.10. PZR Sonrası Pozitif Olan Örneklerin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

Elde edilen PZR ürünleri, pGEM-T Easy vektörüne (Promega) ligasyonu sağlandı. Ligasyon reaksiyonu toplam 4 μ l hacimde 0,2 μ l pGEM-T easy (10 ng), 2 μ l ligasyon tamponu (2X), 0,2 μ l T4 DNA ligaz (0,6 ünite/ μ l) ve 1,6 μ l PZR ürünü kullanılarak 16 °C'de 16 saat olarak gerçekleştirildi. PZR ürününü taşıyan pGEM-T easy vektörü, *E. coli* DH5 α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Daha sonra hücreler IPTG ve X-Gal içeren ampisilinli petrielerde mavi-beyaz renk oluşumuna bakılarak ayrıldı. Belli sayıda beyaz hücreden plazmit izole edildi ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi, PZR ürünü ile yan yana %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve pozitif olanlar belirlendi. Pozitif olduğu doğrulanan plazmitleri içeren rekombinant hücreler, 3 ml LB besiyerine ekimi yapılarak 37 °C de gece kültürü yapıldı ve kültürler 14000 rpm' de 2 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü.

Elde edilen pelletler ile Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (ABD) kullanılarak plazmit DNA purifikasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidler DNA dizi analizine gönderildi.

2.11. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

PZR ile tespit edilen örneklerin pGEM-T Easy vektörüne klonlandıktan sonra DNA baz dizin analizi için Macrogene gönderilen örneklerin sonuçları Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) ve Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programları kullanılarak değerlendirildi. Sekans sonucuna göre yeni alel olduğu düşünülen örnekler tekrar çoğaltıldı ve sekans analizine gönderilerek doğrulandı. BP2 (Bezmialem Pseudomonas) izolatında tanımlanan VIM-tipi metalla beta laktamaza ait aminoasit dizilimi bilinen tüm VIM-tipi betalaktamaz varyantlarından bir aminoasit farklılık gösterdiği belirlendi ve resmi internet sitesine (<http://www.lahey.org/Studies/>) girilerek yeni alelin adlandırılması yapıp kayıt numarası alındı. Yeni enzimin özelliklerinin belirlenebilmesi için gerekli çalışmalar başlatıldı.

2.12. Filogenetik Analiz

Filogenetik analizler, MEGA5 programı kullanılarak değerlendirildi. MEGA5 programında yeni *bla*_{VIM}- geninin sekans sırası tüm *bla*_{VIM}-varyantlarının sekans sıralarıyla karşılaştırılarak filogenetik ağaç çizildi (Tamura et al., 2011)

2.13. Yeni *bla*_{VIM} alelinin Champion™ pET100 TOPO® Vektörüne Klonlanması

Yeni *bla*_{VIM} geni, pET100 TOPO® vektörüne klonlandı. Geni içeren vektör *E. coli* DH5a hücrelerine transform edilerek MİK değerlerinin belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, klonlamayı etkinleştirmek için Forwad primer 5' ucunda 'CACC' sırası eklendi. Revers primer dizayn ederken yüksek verimlilikte klonlamadan emin olmak için, PZR reverse primeri vektörün 5' ucundaki GTGG sekansına komplementer olmamasına dikkat edildi.

VIM-TOPO-Fw:5'-CACCATGTTMAAASSTTWTKAGTARTTTATTG-3' VIM-TOPO-Rw: 5'-CTACTCAACGACTGAGCGATTTTTG-3' primerleri dizayn edilerek

PZR yapıldı. Amplifikasyon, 2 dk 94 °C, 45 sn 94 °C, 1 dk 56 °C, 3 dk 72 °C (30 döngü) ve son sentez 5 dk 72 °C de gerçekleştirildi. PZR sonrası pozitif olan örneklerin pET100 TOPO^R vektörüne ligasyonu yapıldı. Ligasyon reaksiyonu toplam 6 µl hacimde 1 µl pET100 TOPO^R, 1 µl tuz solusyonu, 1 µl saf su ve 3 µl PZR ürünü kullanılarak 25 °C’de 7 dk olarak gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü, *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Oluşan belli sayıda hücreden plazmit izole edildi. Pozitif olduğu düşünülen plazmitler için yeni *bla*_{VIM} aleline yönelik PZR yapıldı ve *bla*_{VIM} alelini taşıyan vektörün ait olduğu hücreler tekrar büyütülerek plazmit DNA purifikasyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep) kullanılarak DNA dizi analizi için tekrar izole edildi. Daha sonra *bla*_{VIM} alelini taşıyan rekombinant vektör ve karbapenemaz üreten *P. aeruginosa* (BP2) suşunun MİK değerleri belirlendi.

2.14. Yeni *bla*_{VIM} alelinin pET-28a Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Yeni *bla*_{VIM} alelinin pET-28a vektörünün *EcoRI* ve *XhoI* bölgesine klonlanması için primerler dizayn edildi. Primerler dizayn edilirken gene ait sinyal peptid sırasının var olup olmadığı SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) program kullanılarak araştırıldı. Sinyal sırasının varlığı belirlendikten sonra sinyal dizisi dışarıda bırakılacak şekilde primerler dizayn edildi.

Yeni *bla*_{VIM} aleli PZR da çoğaltmak için *EcoRI* ileri (VIM-NoSig-EcoRI:5’-GAATTCAGTCCGTTAGCCCATTCG) ve *XhoI* geri (VIM-R_XhoI-5’-CTCGAGCTACTCAACGACTGAGCGATTTTGT) primerleri kullanıldı. Amplifikasyon ürünü %1’ lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Örnek pGEM-T Easy klonlama vektörüne (Promega) aktarıldı. Ligasyon reaksiyonu toplam 4 µl hacimde 0,2 µl pGEM-T Easy, 2 µl ligasyon tamponu, 0,2 µl T4 DNA ligaz ve 1,6 µl PZR ürünü kullanılarak 16 °C’de 16 saat olarak gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Pozitif olduğunu doğrulamak için plazmitleri içeren rekombinant hücrelerden plazmit izole edilerek DNA dizi analizine gönderildi. DNA sekans analizi sonucu yeni *bla*_{VIM} alelinin pGEM-T Easy vektörüne klonlandığı tespit edilen örneklerden tekrar plazmit izole edildi. 40 µL plazmit DNA, 100 µL hacimde *EcoRI* ve *XhoI* tamponu kullanılarak plazmit kesildi. Kesim için 4 µL *EcoRI* (40 ünite) ve 2 µL (20 ünite) *XhoI* kullanıldı ve kesim

reaksiyonu 37°C’de 4 saat boyunca gerçekleştirildi. Kesim sonrası plazmitler %1 lik jelde yürütülerek, jelden QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) kullanılarak temizlendi. Her iki enzimle kesilmiş yeni alel fragmenti ve pET-28a vektörü ligasyonu, toplam 10 µl hacimde yapıldı. Ligasyon reaksiyonu 1 µl T4 DNA ligaz tamponu (10X’den), 1µl T4 DNA ligaz (10 unite/µl), 3 µl ekspresyon vektörü (*EcoRI* ve *XhoI* ile kesilmiş pET-28a) ve 5 µl jelden izole edilen *bla_{VIM}* fragmenti ürünü kullanılarak 16°C’de 16 saat olarak gerçekleştirildi (Tablo 12). Ligasyon sonrası plazmit, *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edildi. Belli sayıda koloniden tekrar plazmit izole edildi, *EcoRI* ve *XhoI* kesimi ve PZR ile doğrulanan örnekler tekrar DNA dizi analizine gönderildi. Pozitif olduğu doğrulanan örneklerden bir tanesi seçilerek ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine aktarıldı (Maniatis vd.,1989).

Tablo 12. Ligasyon ve restriksiyon endonukleaz kesim şartları

pGEM-T Easy Ligasyonu	Restriksiyon endonukleazlar ile Kesim	T4 DNA ligaz ile Ligasyon
0,2 µl pGEM-T	40 µl plazmid DNA	1 µl T4 DNA ligaz
2 µl Ligasyon Tamponu	4 µl <i>EcoRI</i>	3 µl pET-28a
1,6 PZR ürünü	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl PZR ürünü
-	54 µl Tampon	1 µl Tampon
16°C’de 16 saat	37°C’de 4 saat	16°C’de 16 saat

2.15. VIM-5 Nokta Mutasyonu

Yeni alel, 265. pozisyon da bir aminoasit değişikliği ile VIM-5 den farklıdır. 265. pozisyonda VIM-5 alanin aminoasiti bulundururken yeni alel valin aminoasiti bulundurmaktadır. Bu farklılığın enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olup olmadığını araştırmak için yeni alel üzerinden nokta mutasyonu yapılarak VIM-5 elde edilmek istenmiştir. VIM-5 nokta mutasyonu için: yeni alelin 265.

Valini aminoasiti kodlayan GTT, VIM-5’ de Alanini kodlayan GCC nükleotitlerine çevirmek için İleri-5’-CACAAAATCGCTCAGTCGCCGAG-‘3 ve Geri-5’-CTCGGCGACTGAGCGATTTTTGTG-‘3 primerler dizayn edildi. PZR: 1,5 ünite Q5® High-Fidelity DNA Polimeraz (Biolabs), 20 µg plazmid DNA, 5 µl 5X DNA polimeraz tamponu, 5 µl Q5® High GC Enhancer tamponu, 2,5 µl dNTP mix (10 mM) ve 1 µL her bir primer stoku (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su ile 25 µl’ye tamamlanarak hazırlandı. Mutasyon amplikasyonu için döngü şartları: 2 dk 94°C, 45 sn 94°C, 1 dk 55°C, 12 dk 68°C (19 döngü), ve son sentez 20 dk 68°C’ de gerçekleştirildi. PZR ürünleri 1,25 µl *DpnI* enzimi ile 37°C de 16 saat süre ile restiriksiyon endonükleaz

kesimi yapıldı. Kesim sonrası örnekler *E. coli* XL-10 Gold hücrelerine transforme edilerek kanamisinli petrilere hücreler ekildi. Oluşan kolonilerden plazmitler izole edilerek DNA dizi analizine gönderildi. Hedeflenen mutant klonlar ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine aktarıldı.

2.16. pET-28a/*bla*_{VIM-5} ve pET-28a/*bla*_{VIM}-Yeni Alel Genlerine HRV 3C Proteazın İnsersiyonu

Ekspresyon için kullanılan pET-28a vektörü N-terminalinde 6 Histidin ve trombin kesim bölgesi içermektedir. 6 Histag bölgesinin enzim aktivitesi üzerine etkisinin olabileceği varsayılmaktadır. Bundan dolayı Ni-afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra 6 Histag bölgesi enzimden uzaklaştırılmak istenmektedir. Trombinden daha az maliyetli ve kullanışlı olan HRV 3C proteaz Histag uzaklaştırılmasında kullanabilmek için *bla*_{VIM-5} ve *bla*_{VIM}-yeni alel genlerini içeren pET-28a vektörüne HRV 3C proteaz aminoasit sırası 143. ve 144. nukleotitler (Şekil 4) arasına PZR ile eklenmesi için QuikChange Primer Design programı kullanılarak primerler dizaynedilmiştir

İleri-5' GAATGGGCTAACGGACTCGGGCCCTGAAACAGCACTTCCAGGA ATTCAGTCATGCTAGCC-3' ve geri-5'GGCTAGCATGACTGAATTCCTGGAAGT GCTGTTTCAGGGCCCCGAGTCCGTTAGCCCATTC-3' primerleri kullanılarak HRV 3C proteazi kodlayan Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-↓-Gly-Pro sekiz aminoasitin vektöre insersiyonu için PZR: 1,5 ünite Q5® High-Fidelity DNA Polimeraz (Biolabs), 20 µg plazmid DNA, 5 µl DNA polimeraz tamponu (5X), 5 µl Q5® High GC Enhancer buffer, 2,5 µl dNTP mix (10 mM) ve 1 µL her bir primer (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su ile 25 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Mutasyon amplikasyonu için döngü şartları: 2 dk 94°C, 45 sn 94°C, 1 dk 55°C, 12 dk 68°C (19 döngü), ve son sentez 20 dk 68°C' de gerçekleştirildi. PZR ürünleri 1.25 µl *DpnI* enzimi ile 37°C de 16 saat süre ile kesim yapıldı. Kesim sonrası örnekler *E. coli* XL-10 Gold hücrelerine transforme edilerek kanamisinli petrilere hücreler ekildi. Oluşan kolonilerden plazmitler izole edilerek DNA sekans analizine gönderildi. Pozitif olduğu doğrulanan örnekler ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine aktarıldı.

```

atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccat
M G S S H H H H H S S G L V P R G S H
143.N 144.N
atggctagcatgactgaattc insersiyon bölgesi agtccgtagccattcc
M A S M T E F L E V L F Q G P S P L A H S

```

Şekil 4. HRV 3C proteazinin (L E V L F Q G P) İnsersiyonu (143. nükleotit ve yukarı sekans sırası *bla*_{VIM-5}'in klonlandığı pET-28a vektörüne ait nükleotit sırası, 144. nükleotit ve sonrası sekans sırası ise *bla*_{VIM-5} genine ait nükleotit sırası. 143. ve 144. Nükleotit arası HRV 3C proteazi kodlayan 8 aminoasit sırasının eklendiği bölge).

2.17. *bla*_{VIM-5} ve *bla*_{VIM}-Yeni Aelin Ekspresyon Şartlarının Belirlenmesi

Yeni alel ve *bla*_{VIM-5}'in ekspresyonunu varlığını gözlemlemek ve ekspresyon şartlarını belirlemek için deneylere başlanmış ve Novagen kit kullanılarak proteinler saflaştırılmıştır. Yeni VIM aleli ve *bla*_{VIM-5} genlerini içeren plazmitler transfer edildiği *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerinden rastgele tek bir koloni seçilerek ekspresyon için kullanıldı ve bu koloniler 3 ml besiyerinde büyütüldükten sonra %20 gliserol stok yapılarak -80 °C de saklanmıştır. 100 mL sıvı kanamisinli LB' ye ekim yapılarak 37 °C' de O.D 0,6 olana kadar inkübe edildi. Daha sonra 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM IPTG (izopropil β-D-1-Tiyogalaktopiranozit) ile indüklenerek, 37 °C de 4 saat ve 18 °C' de gece boyunca büyütüldü (Tablo 13). Hücreler 8000 rpm' de 10 dk santrifüjle çöktürüldü. Novagen protein saflaştırma kiti kullanılarak proteinler saflaştırıldı. Ekspresyonun en iyi olduğu şartlar belirlendi ve çok miktarda protein üretimi ve saflaştırılması yapıldı.

Tablo 13. Proteinlerin ekspresyon şartları

Farklı Sıcaklıklar	İnkübasyon süresi	IPTG konsantrasyonu
18 °C	4 saat	0 ,1 mM
18 °C	4 saat	0 ,5 mM
18 °C	o/n	0 ,5 mM
18 °C	o/n	1 mM
37 °C	4 saat	0 ,1 mM
37 °C	4 saat	0 ,5 mM
37 °C	4 saat	1 mM
37 °C	o/n	0 ,5 mM
37 °C	o/n	1 mM

2.18. *bla*_{VIM-5} ve Yeni *bla*_{VIM} Genlerinin Ekspresyonu

Ekspresyonun en iyi olduğu şart belirlendikten sonra çok miktarda protein üretimine başlandı. Daha önce plazmitler *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine transfer edildi ve gliserol stok yapıldı. Bu stoklardan kanamisinli petrilere yayma ekimi yapıldı ve tek bir koloni seçilerek, ilk başta 100 ml 30 µg/mL kanamisinli LB'ye ekimi gerçekleştirilerek 37 °C de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir protein için önceden hazırlanmış 600 mL LB besiyeri içeren 12 tane 2 mL'lik erlenler kullanıldı. Her bir erlene 600 µl kanamisin ve 6 ml hücreler eklendi ve 37 °C' de OD₆₀₀ 0,6 olana kadar inkübe edildi. Daha sonra 0,1 mM IPTG (izopropil β-D-1-Tiyogalaktopiranozit) ile indüklenerek 18 °C' gece boyunca büyütüldü. Hücreler 8000 rpm' de 10 dk santrifüjle çöktürüldü ve saflaştırmada kullanmak için pelletler -80 °C de saklandı.

2.19. VIM-5 ve Yeni VIM Proteinlerinin Saflaştırılması

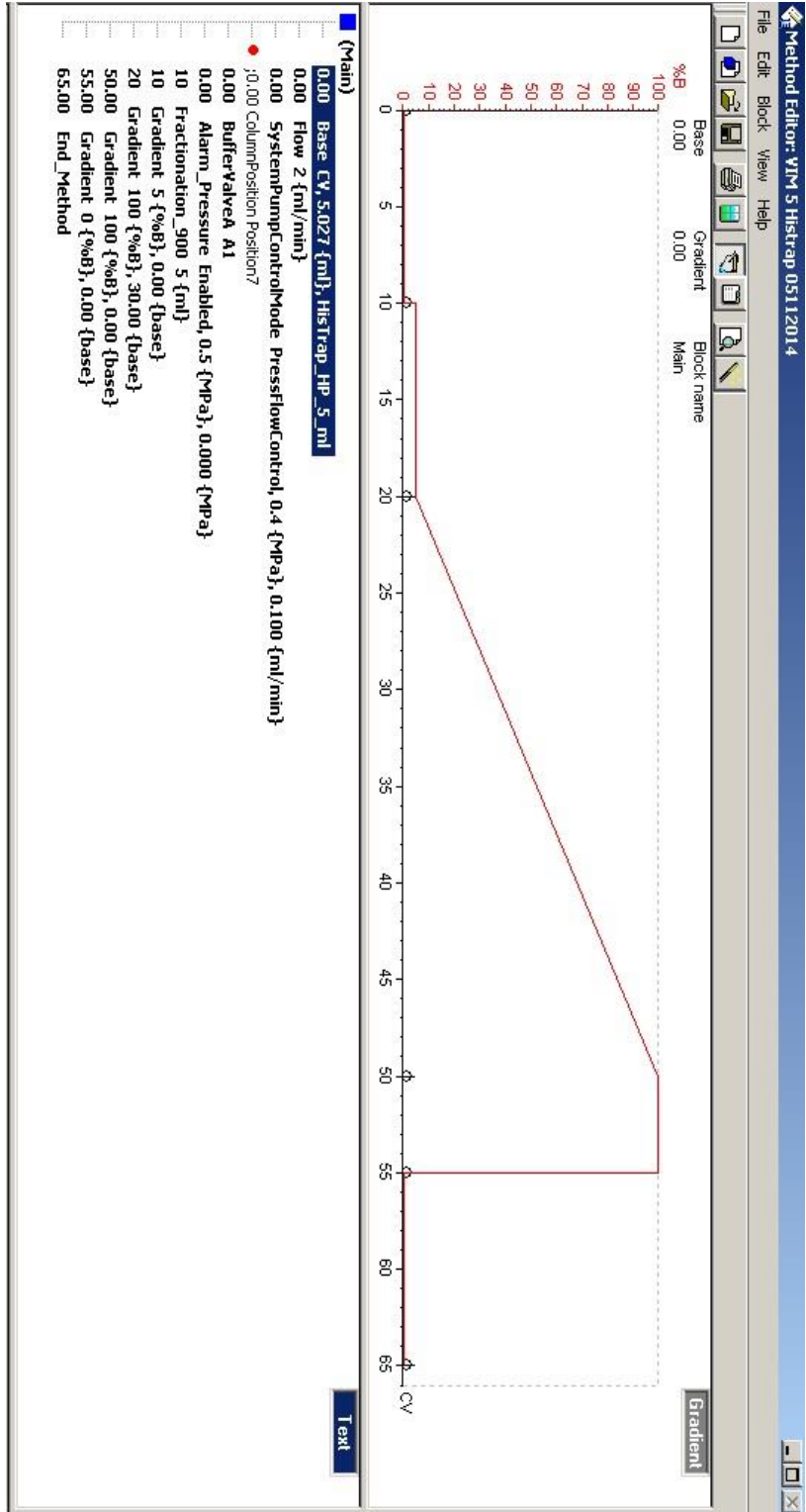
Proteinler sırası, ile Ni-afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için ÄKTA Prime FPLC (Amersham Biosciences, İsveç) sistemi kullanıldı. -80 °C'den alınan pelletler hassas terazide tartıldıktan sonra kütlelerinin 3 katı kadar Histrap-Ni-Binding tamponu (500 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM imidazol pH; 7.5), lizozim, Dnaz, Tween 20 ve PMSF

(phenylmethanesulfonylfluoride) eklenerek lizis yapıldı. Pelletler çözüldükten sonra 15 dk buz üzerinde sonikasyon yapıldı. Sonikasyon sonrası, 24000 rpm' de 30 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant filtreden geçirildikten sonra Ni- afinite kromotografisi ile saflaştırma da kullanıldı.

2.19.1. Ni-Afiniti Kromotografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması

VIM-5 ve yeni VIM proteinin ekspresyon için klonlandığı vektör olan pET-28a, N-terminal bölgesinde 6 Histidin kodonu içermektedir. Bundan dolayı, *E.coli*'nin diğer proteinlerinden VIM-5'i ve VIM proteinini ayırmak için afinite kromotografisi kullanılmıştır. Histidinin kobalt ve nikel iyonuna karşı afinitesi vardır. İçerisinde nikel bulunan bir kolondan proteinler geçirildiği zaman 6 Histidin bulunduran protein kolona bağlanır ve istenmeyen diğer proteinler kolondan akar gider. Kolona bağlanmış proteini kolondan ayırmak için ise imidazol kullanılır çünkü imidazolun nikel karşı yüksek afinitesi vardır.

Saflaştırmada 5 ml Histrap High Performance (HP) kolonu, ÄKTA explorer Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) sistemi ve Unicorn 5.0 programı (GE Healthcare United Kingdom) kullanıldı. Saflaştırmaya başlamadan önce kolon ilk olarak su ile daha sonra da saflaştırmada kullanılan tamponu (Histrap-Ni-Binding) ile yıkandı. Daha sonra Şekil 5 de gösterilen program kullanılarak proteinler saflaştırıldı.



Şekil 5. Ni-Afiniti kromatografisi ile proteinlerin saflaştırılma basamakları

2.19.2. Ultrafiltrasyon ile Proteinlerin Konsantre Edilmesi

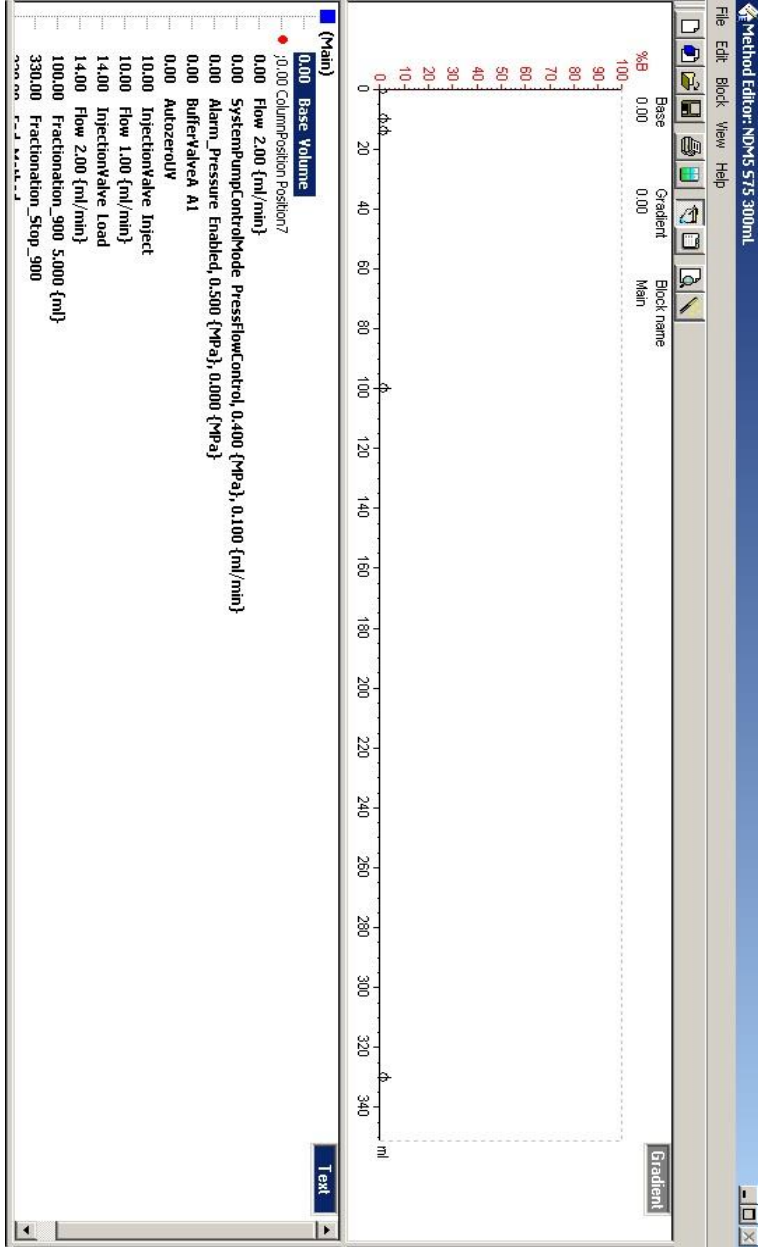
Afinite kromatografisi tamamlandıktan sonra proteinin bulunduğu fraksiyonlar seçildi. Proteinler ultrafiltrasyon tüplerine (10 kDa) koyularak 4000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi. 3C proteaz kesimi için toplam hacim 10 ml olacak şekilde protein konsantre edildi ve proteinin konsantrasyonu nano-dropla belirlendi.

2.19.3. HRV 3C Proteaz Enzimi ile 6 Histidinin Uzaklaştırılması

HRV 3C Proteaz, 3C proteaz, insan rhinovirus tip 14'ün rekombinant formudur. HRV 3C proteaz LeuGluValLeuPheGln/GlyPro aminoasit sırasına tanır ve Glutamin amino asiti ve Glisin amino asiti arasından kesim yaparak histidin bölgesini uzaklaştırır. Proteinin konsantrasyonu belirlendikten sonra 1:25 mg/ml oranında 3C proteaz eklenerek 17 saat +4 °C de inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 20 mM imidazollu tampon kullanılarak saflaştırma yapıldı. İlk olarak 5 ml histrap kolonu 20 mM imidazol tamponu ile dengelendi daha sonra 10 ml protein 3C proteaz solüsyonu kolondan geçirildi, bu esnada 3C proteaza bağlı histidin nikel bağlanmıştır. İstenilen protein ise histidin içermediğinden kolondan akmıştır. Solüsyon geçirildikten sonra 3 kez 10 ml 20 mM imidazol tamponu kolondan geçirildi ve toplam 4 tüp 40 ml protein elde edilmiş oldu son olarak kolonu temizlemek için 10 ml 500 mM imidazol tamponu kullanıldı. 40 ml protein ultrafiltrasyon ile konsantre edildi. 4000 rpm de 15 dk santrifüj yapılarak jel filtrasyon için son hacim 2 ml olacak şekilde ayarlandı.

2.19.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması

Jel filtrasyon, enzim kinetik çalışmalarında kullanılacak proteinin istenilen saflıkta elde edilmesi için kullanılmıştır. 3C proteaz kesim ve ultrafiltrasyon sonrası elde edilen 2 ml protein jel filtrasyonun da kullanıldı. S75 300 ml Superdex kolonu, ÄKTA Explorer Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) sistemi ve Unicorn 5.0 programı (GE Healthcare United Kingdom) kullanıldı. Kullanılan program Şekil 6' da gösterilmektedir.



Şekil 6. Jel filtrasyon kromotografisi ile proteinlerin saflaştırılma basamakları

2.19.5. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Nano-drop 2000c spektrofotometre (Thermo Sciences) kullanılarak proteinlerin konsantrasyonları belirlendi. Kör olarak, afinite kromatografisinden sonra elusyon tamponu (500 mM NaCl, 50 mM Tris, 500 mM imidazol, pH; 7.5) jel filtrasyondan sonra ise jel filtrasyon tamponu (200 mM Nacl, 20 mM Tris, pH; 7.5) kullanıldı. Proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için, gerekli olan proteinlerin moleküler ağırlıkları ve extinction coefficient değerleri proteinlerin sekans sıraları kullanılarak Expsy Protparam online programı ile belirlendi (Tablo 14).

Tablo 14. VIM-5 ve Yeni VIM'in in moleküler ağırlıkları ve extinction coefficient değerleri

Protein	Moleküler Ağırlık (kDa)	3C Proteaz Kesim sonrası moleküler Ağırlık (kDa)	Extinction Coefficient ($\Delta\epsilon$)
VIM-5	29.77	26.08	28.42
Yeni VIM	29.80	26.11	28.42

2.19.6. Kütle Spektrometresi ile VIM-5 ve Yeni VIM Proteinlerin Kütlelerinin Belirlenmesi

Proteinler saflaştırıldıktan sonra, kütle spektrometresi için proteinin içinde bulunduğu tampon değişimi gerçekleştirildi. Bunun için 2 ayrı kütle spektrometresi tampon değişim kolonu kullanılarak yapıldı. Önce kolonlar alt-üst edildikten sonra alt kısmı kesildi ve kapağı açılarak kuruması beklendikten sonra 1000 g' de 2 dakika santrifüjlendi. Alt kısımdaki sıvı döküldükten sonra 500 μ l 15 mM amonyum asetat tamponu eklendi ve 1000 g de 1 dakika santrifüjlendi. Yüksek kalite de tampon değişikliği istendiğinden dolayı bu basamak 4 kez tekrarlandıktan sonra 1. kolona saf proteinden 75 μ l eklendi ve yine 1000 g de 4 dakika santrifüjlendi. Daha sonra alttaki sıvı (75 μ l) alınarak 2. kolona aktarıldı ve 1000 g de 4 dakika santrifüj yapıldı. Kütle spektrometresi için en uygun protein konsantrasyonu 100 μ M olduğundan dolayı tampon değişiminden sonra nano-drop ile protein konsantrasyonu belirlendi ve konsantrasyon 100 μ M'a ayarlandı (yaklaşık 2,8 mg/ml). Plate 5 μ l (0,75 μ l protein, 4,25 μ l amonyum asetat tamponu eklenerek son konsantrasyon 15 mM'a ayarlandı) eklenerek okuma gerçekleştirildi.

2.20. VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve Yeni VIM Enzimi ile Aktivite Deneyleri

2.20.1. Steady-State Kinetik

VIM-5 ve yeni VIM proteini saflaştırıldıktan sonra VIM-1 ve VIM-2 ise Oxford Üniversitesi Kimya araştırma laboratuvarı enzim stoklarından alınarak aktivite deneylerinde kullanıldı. Aktivite deneylerinde nitrosefin, imipenem, meropenem, doripenem, seftazidim, sefholatin, sefoksitin ve ampisilin substrat olarak kullanıldı.

İlk olarak, her substrat için ayrı ayrı enzimlerin en çalıştığı konsantrasyonları belirlendi. 50 µM substrat konsantrasyonu ve 8 nM seri seyreltme (Tablo 15) ile farklı konsantrasyonlarda enzim kullanılarak deneyler yapıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Her substrat için Tablo 16’ de gösterilen dalga boyları kullanıldı.

Her substrat için ayrı ayrı en iyi enzim konsantrasyonları belirlendikten sonra steady state kinetik deneyleri gerçekleştirildi. Steady-state kinetiği için farklı substrat konsantrasyonları kullanıldı (Tablo 17). Tablo 18’de gösterilen başlangıç konsantrasyonları alınarak seri seyreltme ile substratlar seyreltildi. Deneylerde, 1 mg/mL BSA, 1 mM ZnSO₄, ve 0.01% Triton X-100 içeren 50 mM HEPES tamponu (pH 7.2) kullanıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve plate okuyucu (BMG Labtech Pherastar FS plate reader)’ da 1 dakika aralıklarla yapılarak toplam 20 okuma yapıldı. Sonuçlar daha sonra GraphPad Prism 5.01 software programı kullanılarak Michaelis–Menten grafikleri elde edildi.

Tablo 15. Her substrat için enzim konsantrasyonlarının belirlenmesi

Farklı Enzim Konsantrasyonu (nM) (50 µl)	Substrat konsantrasyonu (µM) ve deneyde kullanılan miktar (µl)	Deneyde kullanılan Tampon miktar (µl)
8		
4		
2		
1	50 (µM) ve 50 (µl)	100 (µl)
0,5		
0,25		
0,125		
0,0625		
0,03125		
0,015625		
0,007813		
0,003906		

Tablo 16. Deneylerde kullanılan substratların dalga boyları ve coefficient değerleri

Substrat	ϵ AU ⁻¹ /µM	λ_{Max} (nm)
Nitrosefin	0,0078	495
İmipenem	0,0040	300
Meropenem	0,0055	300
Seftazidim	0,099	265
Doripenem	0,0044	276
Sefhalothin	0,0066	265
Sefoksitin	0,0070	265
Ampisilin	0,0019	235

Tablo 17. Aktivite Deneylelerinde Kullanılan Substrat Konsantrasyonları

Substrat	μM (enzim konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan substrat konsantrasyonu)	μM (Steady-state kinetiğinde kullanılan substrat konsantrasyonu)
Nitrosefin	50	500
İmipenem	50	500
Meropenem	50	500
Seftazidim	25	200
Doripenem	-	-
Sephalothin	50	500
Sefoksitin	50	500
Ampisilin	50	1000

Tablo 18. Kinetik Deneylelerde Kullanılan Substrat Konsantrasyonları

Farklı substrat konsantrasyonu(μM) (50 μl)	Enzim Miktarı (μl) (Her substrat için farklı konsantrasyonda enzim kullanıldı)	Denyde kullanılan Tampon miktarı (μl)
500		
250		
125		
62,5		
3 ,25		
15,625	50 (μl)	100 (μl)
7,8125		
3,90625		
1,953125		
0,976563		
0,488281		
0,244141		

2.20.2. Doripenem ile İnhibisyon Deneyi

Doripenem için 40 nM enzim konsantrasyonuna kadar çıkılarak aktivite deneyi için en iyi enzim konsantrasyonu belirleme deneyleri 50-200 μM substrat konsantrasyonu ile 300 nm dalga boyunda 20 dk okuma yapılarak gerçekleştirildi. Fakat her hangi bir sonuç alınamadı. Bundan dolayı doripenemin muhtemelen enzimleri inhibe ettiği düşünülerek VIM-1, VIM-2 VIM-5 ve Yeni VIM enzimleri ile doripenem inhibisyon deneyi yapıldı (Tablo 19).

Tablo 19. Doripenem inhibisyon deney koşulları

Doripenem konsantrasyonu(μM) (Kullanılan miktar 50 μl)	Enzim Miktarı ve konsantrasyonu	Nitrosefin konsantrasyonu ve miktarı	Deneyde kullanılan Tampon miktar (μl)
500			
250			
125			
62,5			
31,25			
15,625			
7,8125	50 (μl) ve 0,5 (nM)	50 (μM) ve 50 (μl)	50 (μl)
3,90625			
1,953125			
0,976563			
0,488281			
0,244141			

2.20.3. İnhibisyon Deneyleri

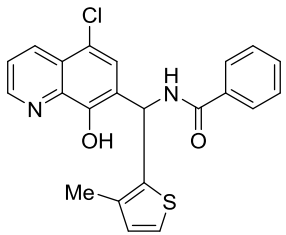
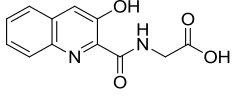
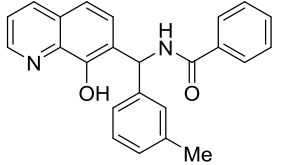
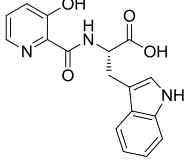
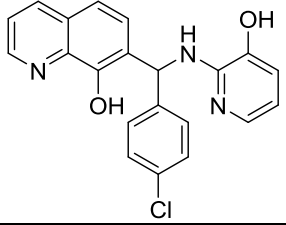
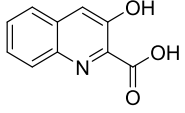
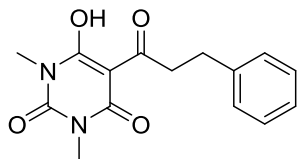
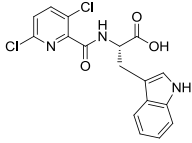
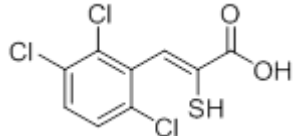
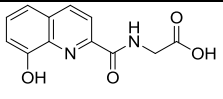
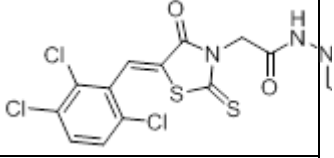
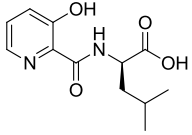
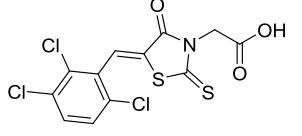
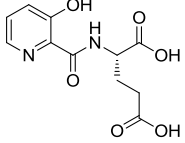
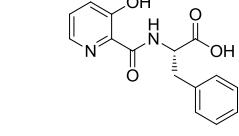
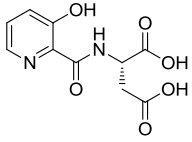
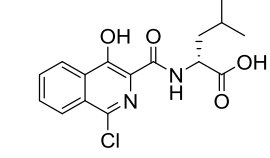
VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 metallo-beta-laktamaz enzimlerinin inhibisyonunu araştırmak için toplam 56 farklı bileşik (Tablo 20) kullanıldı. İnhibisyon deneylerinde kullanılan birleşikler Oxford Üniversitesi Kimya araştırma laboratuvarı tarafından sentez edilmiştir. İnhibisyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için beta laktamazlar için belirlenen en iyi substratlardan biri olan nitrosefin raportör substrat olarak kullanıldı. İnhibisyonda kullanılan her enzim konsantrasyonu, nitrosefin için belirlenen enzimin çalıştığı en iyi konsantrasyon kullanıldı. Nitrosefin konsantrasyonu 50 μM , inhibitör (inhibitörler DMSO ile çözülmüştür) konsantrasyonu ise 100 μM konsantrasyonda deneylere başlandı. Tampon olarak 1 mg/mL BSA, 1 mM ZnSO_4 , ve 0,01% Triton X-100 içeren 50 mM HEPES tamponu (pH 7,2) kullanıldı. Plate ilk tampon, inhibitor ve enzim eklendikten sonra 10 dk inkübe edildi ve nitrosefin eklenerek deneyler 25 °C de gerçekleştirilirdi. 2 farklı kör yapıldı. İlki %100 aktiviteyi veren kör (inhibitör yok) ikincisi ise %0 aktivite veren kör (enzim yok). Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve 495 nm (nitrosefinin dalga boyu) dalga boyunda plate okuyucu (BMG Labtech Pherastar FS plate reader)' da her dakika da bir okuma yapılarak toplam 20 dakika okuma yapıldı. Okuma yapıldıktan sonra %100 aktivite körü baza alınarak her inhibitörün kalan aktivitesi hesaplandı (Tablo 21). % kalan aktiviteye göre inhibisyonun gerçekleştiği düşünölen inhibitörler seçilerek maksimal inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC_{50}) değerlerinin hesaplanabilinmesi için deneyler

başlatıldı. 50 μ M nitrosefin ve farklı konsantrasyonlarda inhibitörler ile 3 tekrarlı okuma yapılarak inhibitörlerin IC₅₀ değerleri belirlendi (Tablo 22).

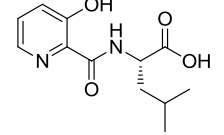
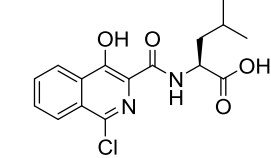
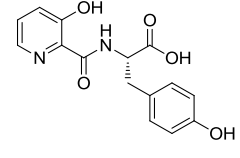
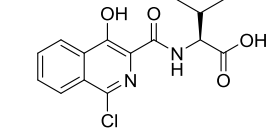
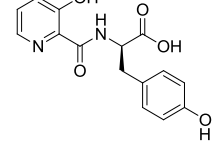
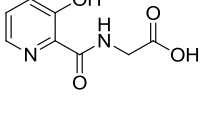
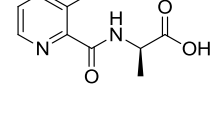
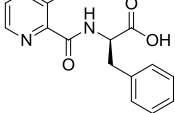
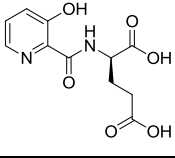
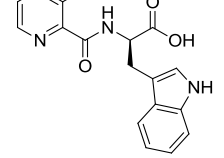
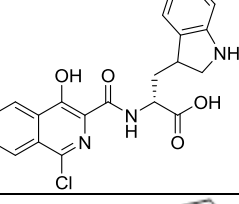
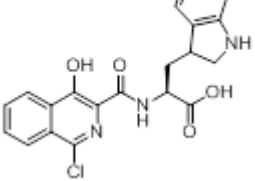
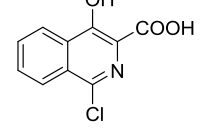
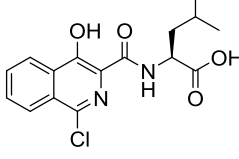
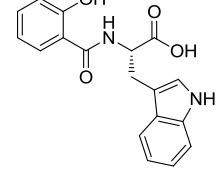
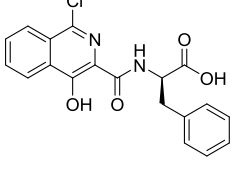
Tablo 20. İnhibisyon deneyinde kullanılan inhibitörler

No	Bileşikler	Yapı	No	Bileşikler	Yapı
1	3-OH-ridin-2COOH		29	2,4 PDCA	
2	Kynurenik asit		30	2,6 PDCA	
3	AR7COOH80H		31	Thio Mandelik asit	
4	Ksantürenik asit		32	Tiosalisilik asit	
5	AR2COOH8OH		33	Merkapto süksinik asit	
6	AR615		34	CCT6-176	
7	AR753B		35	8HQ (5)	
8	AR675		36	AR659	
9	AR618		37	CCT1-92	

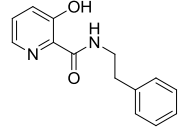
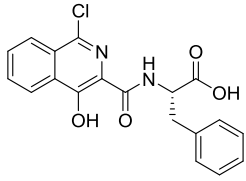
Tablo 20. İnhibisyon deneyinde kullanılan inhibitörler (Devam)

No	Bileşik	Yapı	No	Bileşik	Yapı
10	AR699		38	CCT2-66	
11	AR 672		39	CCT1-68	
12	AR633		40	CT-5	
13	AR663		41	CCT6-140	
14	AR696B		42	ML302F (tiofenolat)	
15	AR671		43	ML302	
16	AR632		44	ML302 karboksilat	
17	AR648		45	AR605	
18	AR646		46	AR 732B	

Tablo 20. İnhibisyon deneyinde kullanılan inhibitörler (Devam)

No	Bileşik	Yapı	No	Bileşik	YApı
19	AR631		47	AR731B	
20	AR635		48	<i>D-Val-FG2216</i>	
21	AR636		49	AR616	
22	AR619		50	AR606	
23	AR740B		51	AR649	
24	AR634		52	AR730B	
25	AR621		53	AR678B	
26	AR653		54	AR731B	
27	AR757B		55	D-Phe-FG2216	

Tablo 20. İnhibisyon deneyinde kullanılan inhibitörler (Devam)

No	Bileşik	Yapı	No	Bileşik	Yapı
28	AR746		56	L-Phe-FG2216	

Tablo 21. İnhibitörlerin inhibisyon oranlarının belirlenmesi

İnhibisyon Deney Bileşenleri	Konsantrasyon	Deneyde kullanılan Miktar	% 0 Aktivite Deneyi	% 100 Aktivite Deneyi
Inhibitor	100 (µM)	2 (µl)	-	-
Nitrosefin	50 (µM)	50 (µl)	50 (µl)	50 (µl)
Enzim	0,5 veya 1 (nM)	50 (µl)	-	50 (µl)
Tampon	-	98 (µl)	148 (µl)	98 (µl)
DMSO	-	-	2 (µl)	2 (µl)
Son Hacim	-	200 (µl)	200 (µl)	200 (µl)

Tablo 22. İnhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

İnhibitör konsantrasyonu (kullanılan miktar 2 µl)	Nitrosefin	Enzim	Tampon
100			
50			
25			
12,5			
6,25			
3,125			
1,5625	50 (µM) ve 50 (µl)	50 (µl) ve 0,5 (nM)	98 (µl)
0,78125			
0,390625			
0,195313			
0,097656			
0,048828			

2.21. Circular Dichroism (CD) Spektroskopisi

CD spektroskopisi için jel filtrasyon tamponu içerisinde bulunan enzimlerin tamponun hazırlanan fosfat tamponu ile değiştirilmesi gerekmektedir. Bunun için tampon değişim kolonu kullanıldı. Önce kolonlar alt-üst edildi sonra alt kısmı kesildi ve kolonun kapağı açılarak kuruması beklendi. Daha sonra 1000 g de 2 dakika santrifüj yapıldı. Alt kısımdaki sıvı döküldükten sonra 500 µl 10 mM fosfat tamponu eklendi ve 1000 g' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Yüksek kalite de tampon değişikliği istendiğinden dolayı bu basamak 4 kez tekrarlandıktan sonra kolona saf proteinden 60 µl eklendi ve yine 1000 g' de 4 dakika santrifüj yapıldı. CD spektroskopisi için en uygun protein konsantrasyonu 0,2 mg/ml olduğundan dolayı tampon değişiminden sonra nano-drop ile protein konsantrasyonu belirlendi ve konsantrasyon 0,2 mg/ml olarak ayarlandı.

CD spektroskopisi için kullanılan küvet distile suyla iyice yıkandıktan sonra tekrar içerisine su konularak ölçüm yapılır. Bu okuma küvetin iyice temiz olup olmadığını kontrol etmek içindir. Su ile okuma yapıldıktan sonra fosfat tamponu ile yine bir kaç kez küvet yıkandı ve 300 µl tampondan eklenerek okuma gerçekleştirildi ve kör olarak kullanıldı. Daha sonra 0,2 mg/ml proteinden 300 µl küvete konarak önce 25 ° C de 185-260 nm dalga boyu arasında her 0,5 nm fark dalga boyu ile 3 tekrarlı okuma gerçekleştirildi. Farklı dalga boyunda okuma gerçekleştirildikten sonra 222 nm de 25-95 ° C sıcaklık arasında her 0,5 ° C farkla proteinin erime noktası belirlendi. Okuma sonrası elde edilen veriler GraphPad Prism 5.01 yazılımı kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. *P. aeruginosa* İzolatlarının Temini ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Toplam 104 *P. aeruginosa* suşu, Bezmialem Vakıf Üniversite Hastanesinde izole edildi. 104 suşun 40'ı yara örneklerinden, 17'si kandan, 39 tanesi balgamdan ve 8 tanesi ise diğer farklı numunelerden elde edildi (Tablo 23). Suşların antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direnç profili VITEK sistemi kullanılarak belirlendi. Piperasilin, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, sefoparozon-sulbaktam, sefepim, doripenem, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, netilmisin, tobramisin, siprofloksasin, levofloksasin ve kolistin olmak üzere 15 farklı antibiyotik kullanıldı. Suşların hepsinin kolistine karşı duyarlı olduğu görüldü. En düşük direnç oranı ise toplam % 0,9 ile tobramisine karşı olduğu tespit edildi. Tobramisine karşı direnç balgam ve kan örneklerinden alınan izolatlarda görülmezken, %2,5 oran ile sadece yara örneklerinde tespit edildi. Penisilin grubu antibiyotiklerden; piperasiline karşı toplam direnç %26,9, yara örneklerinden izole edilen örneklerde %22,5, kandan alınan örneklerde %35,2, balgamdan izole edilen suşlarda %30,7 ve diğer örneklerden izole edilen bakterilerde %12,5 direnç oranı saptandı. Piperasilin-tazobaktama ise toplam %22,1 direnç frekansı görüldü ve yara (%17,5), kan (%35,2), balgam (%23) ve diğer örneklerden elde edilen izolatlarda %12,5 direnç oranı tespit edildi. Sefalosporinlerden sırasıyla en yüksek direnç sefoparozon-sulbaktam (%19,2), seftazidim (%16,3) ve sefepim (%9,6) olarak tespit edildi. Yara, kan, balgam ve diğer örnekler arasından, sefoparozon-sulbaktama direnç; %17,5, %23,5, %20,5 ve %12,5, seftazidime direnç oranı, %16,3, %5, %17,6, %28,2 ve %12,5, sefepime direnç oranı ise, %9,6, %7,5, %17,6, %7,6 ve %12,5 olduğu görüldü. Karbapenem tipi antibiyotiklerden en yüksek direnç frekansı meropeneme (%24) karşı tespit edildi. İmipenem ve doripeneme karşı direnç oranlarının sırasıyla %19,2 ve %6,7 olduğu saptandı. Yara, kan, balgam ve diğer örnekler arasından, meropeneme karşı direnç %20, %23,5, %30,7 ve %12,5, imipeneme, %12,5, %23,5, %23 ve %25, doripeneme karşı direnç ise %2,5, %11,7, %7,6 ve %12,5'dir. Beta-laktam olmayan antibiyotiklere ise sırası ile direnç oranı, levofloksasin %32,6, netilmisin %29,8, gentamisin %26,9, siprofloksasin %25,9 ve amikasin %25'dir. Yara, kan, balgam ve diğer örneklerden izole edilen suşların direnç oranı, amikasine %30,

%17,6, %25,6 ve %12,5, gentamisine %30, %29,4, %25,6 ve %12,5, netilmisine %37,5, %23,5, 28,2% ve %12,5, siprofloksasine %25,9,%32,5, %29,4, %20,5 ve %12,5 levofloksasine ise %32,6, %32,5, %35,2, %35,8 ve %25' dir (Tablo 23).

Tablo 23. Farklı numunelerden izole edilen 104 *P. aeruginosa* suşunun antimikrobiyal direnç oranları

Antibiyotik	Toplam (n=104)	Yara (n=40)	Kan (n=17)	Balgam (n=39)	Diğer (n=8)
β-laktamlar					
Piperasilin	%26,9	%22,5	%35,2	%30,7	%12,5
Piperasilin-tazobaktam	%22,1	%17,5	%35,2	%23	%12,5
Seftazidim	%16,3	%5	%17,6	%28,2	%12,5
Sefaprazon-sulbaktam	%19,2	%17,5	%23,5	%20,5	%12,5
Sefepim	%9,6	%7,5	%17,6	%7,6	%12,5
Doripenem	%6,7	%2,5	%11,7	%7,6	%12,5
Imipenem	%19,2	%12,5	%23,5	%23	%25
Meropenem	%24	%20	%23,5	%30,7	%12,5
β-laktam olmayanlar					
Amikasin	%25	%30	%17,6	%25,6	%12,5
Gentamisin	%26,9	%30	%29,4	%25,6	%12,5
Netilmisin	%29,,8	%37,5	%23,5	%28,2	%12,5
Tobramisin	%0,9	%2,5	%0	%0	%0
Siprofloksasin	%25,9	%32,5	%29,4	%20,5	%12,5
Levofloksasin	%32,6	%32,5	%35,2	%35,8	%25
Kolistin	%0	%0	%0	%0	%0

3.2. Disk Difüzyon ve E-test Sonuçları

Çoklu-ilaç dirençli ve karbapenem üreten suşlar disk difüzyon ve E-test yöntemiyle belirlenmiştir. Çoklu-ilaç direnç terimi 3 veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç gösteren suşlar için kullanılmaktadır. Karbapenem direnci, suşların imipenem, meropenem, doripenem veya ertapenem gibi karbapenemlerden birine direnç göstermesi halinde gelişen dirençtir. Disk difüzyona ve E-test sonucuna göre toplam 104 *P. aeruginosae* izolatından 24 (%23) tanesi çoklu-ilaç dirençli olarak belirlendi ve 24

izolatta karbapenem üretmektedir. Tablo 24' de çoklu-ilaç direnci gösteren suşların numaraları ve hangi antibiyotik kombinasyonlarda direnç gösterdiği verilmiştir.

Tablo 24. Çoklu ilaç dirençli suş kodları ve bu örneklerin direnç gösterdikleri antibiyotikler

No:	PİP	TZP	CAZ	CFP	FEB	AK	CN	NET	CIP	LEV	SXT	DOR	IMP	ME
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
11	R	R		R		R	R	R	R	R	R			R
14			R			R	R	R	R	R	R		R	R
17	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R			R
22	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
28	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R			R
29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
34	R	R	R			R	R	R	R	R	R		R	R
41	R	R	R	R					R	R	R			R
53	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R
58	R	R				R	R	R	R	R	R			
72	R	R			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
75	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
81	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R
82			R		R									R
84	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
85	R	R	R								R			
87	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R
90	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R		R	R
91	R	R		R		R	R	R	R	R	R		R	R
94	R	R		R		R	R	R	R	R	R		R	R
102											R		R	
103	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R		R	R
104	R	R	R	R	R	R	R	R			R		R	R

3.3.24 Çoklu-İlaç Dirençli *P. aeruginosa* Suşlarının 16S rRNA Gen DNA Dizi Analizi

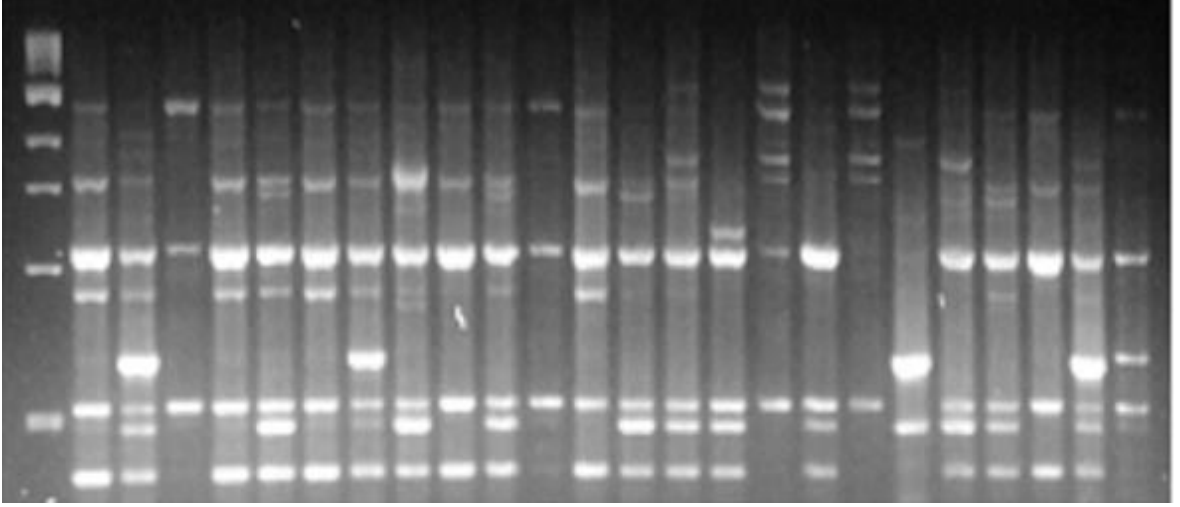
Her çoklu ilaç dirençli (24) izolat için 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildi ve yaklaşık 1500 bp'lik bölge çoğaltıldı. 1500 bp'lik bölge BLAST programı kullanılarak değerlendirildiği zaman suşların %99 *P. aeruginosa*' ya benzediği tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanan *P. aeruginosa* suşları 16S rRNA DNA dizi analizi sonuçlarına göre de doğruluğu teyit edildi.

3.4. Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişki

RAPD-PZR yöntemi ile 24 çoklu-ilaç dirençli suşun klonal ilişkisine bakıldı. RAPD-PZR yöntemi için literatürde en yaygın olarak kullanılan primerler arasından 8 tane farklı primer kullanılarak PZR yapıldı ve içerisinden en iyi çalışan 2 primer seçildi (RAPD-29 ve RAPD-34). İki farklı primer ile 24 suşa PZR yapıldı. Çoğaltılan DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yürütüldü ve oluşan bantlar görüntülendi (Şekil 7 ve Şekil 8).

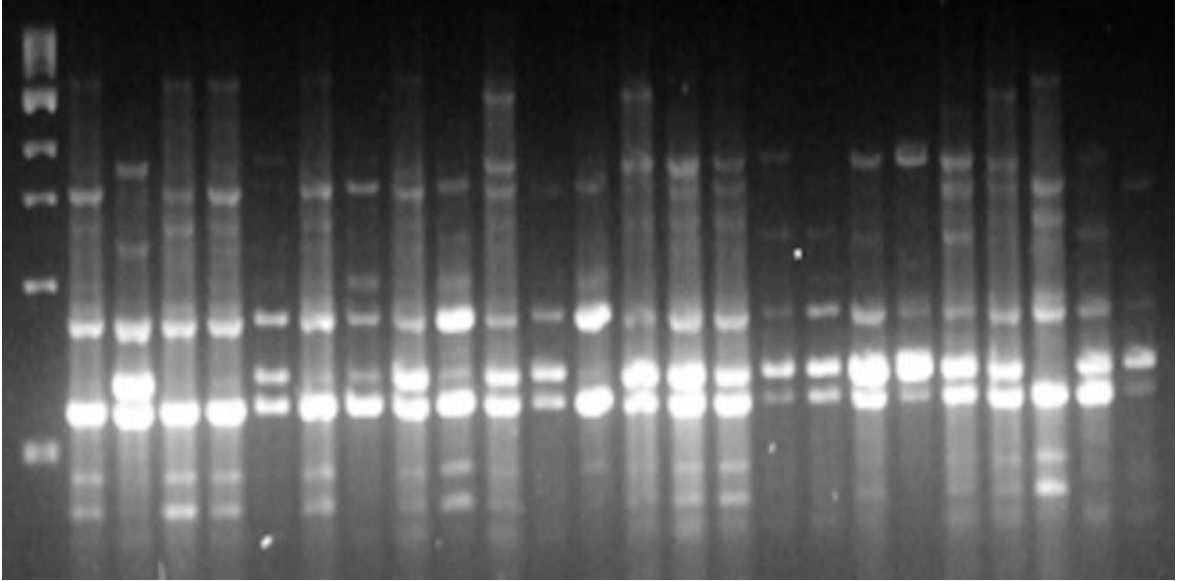
RAPD-PZR yöntemi ile oluşan DNA bantları arasındaki klonal ilişki için dendogram yapıldı. Primer 29 ile gerçekleştirilen RAPD-PZR sonucunda oluşan paternler incelendiğinde 24 suşun 4 farklı gruba ayrıldığı belirlendi (Şekil 8). Birinci grup, sadece bir örnek (90 numaralı suş) içermektedir. İkinci grupta 14 ve 58 numaralı örnek bulunurken üçüncü grubu ise 91-94-102-103 nolu örnekler oluşturmaktadır. Dördüncü grup kendi arasında 2 farklı alt gruba ayrılır. İlk grupta 2-11-17-22-28-29-34-41-53-75-82-85 numaralı örnekler bulunurken ikinci grupta 72-81-84-87-104 numaralı suşlar bulunduğu görüldü (Şekil 9).

M 2 11 14 17 22 28 29 34 41 53 58 72 75 81 82 84 85 87 90 91 94 102 103 104

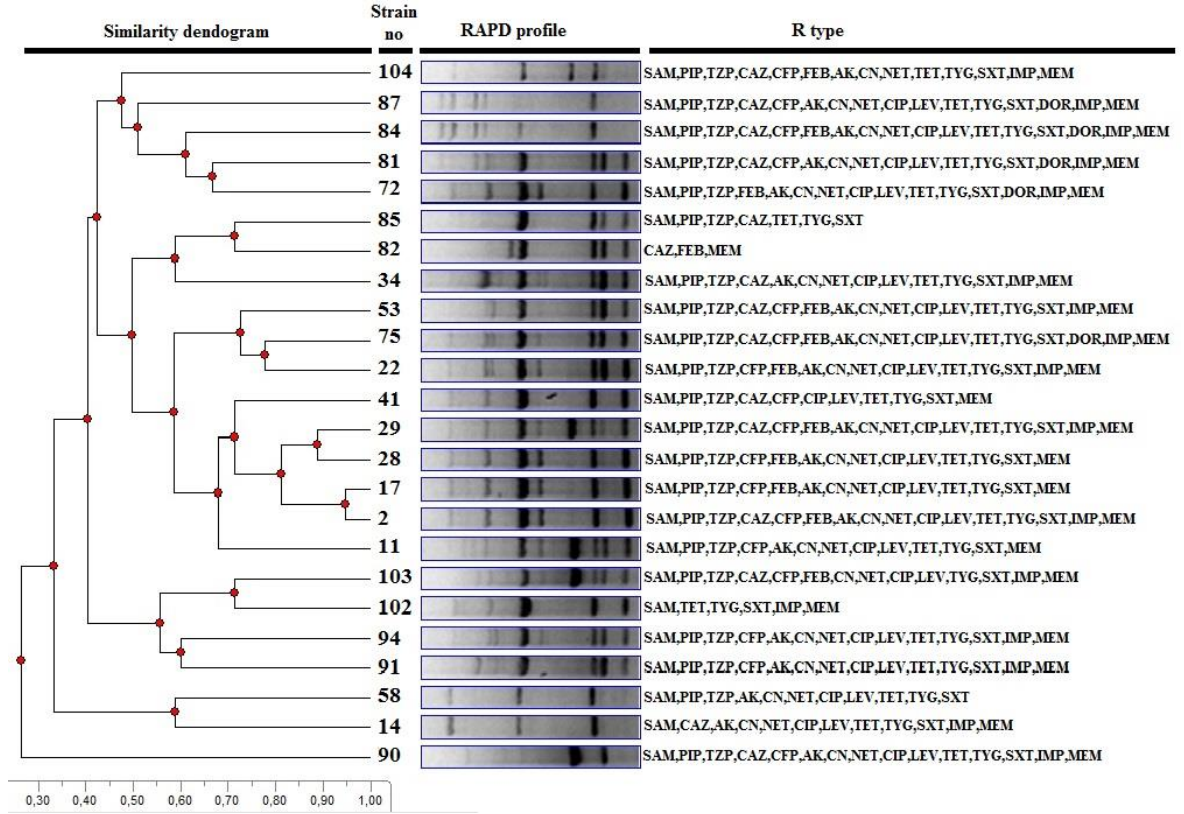


Şekil 7. Primer 29 kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

M 2 11 14 17 22 28 29 34 41 53 58 72 75 81 82 84 85 87 90 91 94 102 103 104



Şekil 8. Primer 34 kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 9. Primer 29 ile RAPD-PZR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan ve *P. aeruginosa* örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.

3.5. Beta-laktamaz Genlerinin ve İntegronların Belirlenmesi

P. aeruginosa suşunda, PZR yöntemiyle beta-laktamazları kodlayan genlerin ve integronların varlığı tespit edildi. 104 klinik kökenli *P. aeruginosa* izolatında sınıf A-B ve D beta-laktamazlara ait genler tarandı. Sınıf A beta-laktamazlardan GES, VEB, PER-2, CTX-M-1 grup, CTX-M-2 grup ve TEM genlerinin varlığı araştırıldı. Sınıf D beta-laktamazlardan OXA-51, OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 genleri, Sınıf B beta-laktamazlardan ise VIM, IMP ve NDM-1'i kodlayan genler tarandı. Sınıf D beta-laktamazlardan PZR sonucu herhangi bir pozitif sonuç alınamazken, sınıf A ve sınıf B beta-laktamazlardan birer tane pozitif sonuç tespit edildi. Sınıf A beta-laktamazlardan GES primerleri ile çoğaltılan örneklerden bir tane sınıf B beta-laktamazlardan ise VIM primerleri ile çoğaltılan örnekten bir tane pozitif sonuç alındı.

Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların varlığının araştırılmasında sınıf 2 integron pozitif suş tespit edilemezken, 3 suşun sınıf 1 integron taşıdığı tespit edildi.

Sonuç olarak bir tane GES-tip beta laktamaz, bir tane VIM-tip metallo beta laktamaz, ve 3 tane sınıf 1 integron PZR ile tespit edildi. PZR ile örneklerin tespitinden sonra bu örneklerin beta-laktamazların hangi aleli olduğunu belirlemek ve integronların hangi direnç genini kodladığını tespit edebilmek için örnekler DNA dizi analizine gönderildi.

3.6. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GES, VIM tipi beta-laktamaz ve integron örnekleri DNA dizi analizi ile elde edilen baz dizinleri Expasy translate tool ve protein BLAST programları kullanılarak değerlendirildi. Expasy Translate tool programı kullanılarak örneklerin sekans sıraları aminoasit sıralarına dönüştürüldü. BLAST programında ise aminoasit dizilimine göre karşılaştırma yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

İntegron pozitif örneklerin sekans sıraları değerlendirildiğinde üç örneğin de aminoglikozid direncine neden olan genleri kodlayan gen kasetlerini taşıdığı tespit edildi. Örneklerden iki tanesi *aadA6* ve bir tanesinin *aadA2/aacA4* gen kasetlerini taşıdığı belirlendi.

BLAST programına göre GES-tipi beta laktamazın taşıyan örneğin tam olarak GES-5 aleli olduğu belirlendi. VIM-tipi beta-laktamazın ise aminoasit sırası tüm VIM varyantları ile karşılaştırıldıktan sonra bugüne kadar var olan VIM varyantlarının hiç birine %100 benzemediği tespit edildi.

3.7. Yeni *bla*_{VIM}-tipi Metallo Beta-laktamaz Varyantının Belirlenmesi

Yeni varyant olma olasılığı göz önüne alınarak VIM tipi metallo-beta-laktamaz taşıyan suştan yeniden DNA izole edildi. Taze DNA kullanılarak aynı şartlar altında VIM primerleri ile tekrar PZR yapıldı ve pGEM-T vektörüne klonlanarak tekrar DNA dizi analizi için Macrogen'e gönderildi. Gelen sonuçlar programlar kullanılarak değerlendirildiğinde ilk alınan sonuçlara benzer olduğu tespit edildi. DNA dizi analizi

sonucu VIM pozitif örneğin 780 bp'lik (Şekil 10) bir gen olduğu ve 266 aminoasitlik (Şekil 11) bir protein kodladığı tespit edildi. BLAST program yardımıyla diğer alellere benzerliği belirlendi. VIM- tipi metallo-beta-laktamazın şimdiye kadar olan varyantlardan hiç birine benzemediği ve VIM-1 grubu içerisinde en yakın bir aminoasit farkla %99 benzerlik oranıyla VIM-5'e benzediği tespit edildi. Bu bir aminoasit farkı 265. pozisyonda VIM-5 enziminde var olan Alanin aminoasidinin Valin amino asidine dönüşmesi ile oluştuğu görüldü. Bu yeni alel *bla_{VIM-38}* olarak adlandırıldı ve nükleotit dizisi GenBank'a giriş yapılarak aksesyon numarası alındı (Kayıt numarası: KC469971).

```

ATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTATTTGACCGCGTCTGTGCATGGCTGTAGCTAGTCCGTTAG
CCCATTCCGGGGAGCCGAGTGGTGTAGTATCCGACAGTCAACGAAATTCGGGTCCGAGAGGTCCGGCTTTA
CCAGATTGCTGATGGTGTGGTTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGGATGGCGCGGTCTACCCATCCAAT
GGTCTCATTGTCCGTGATGGTGTAGTGTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGG
CCCTTCTCGCGGAGATTGAGAAGCAAATTGGACTTCCCGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACCTTTCATGA
CGACCGCGTCCGGCGGCGTTGATGTCCTTCGGAAGGCTGGAGTGGCAACGTACGCATCACCGTCCGACACGC
CGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCACCTCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACG
CAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCCGGTGCTGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATA
CGTCCCGTCAGCGAACGTGCTATACGGTGGTTGTGCCGTTCTTGCCTTGTACGCACGTCTGCGGGGAAC
GTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCAG
AGGTCGTCATTCCCGGCACGGTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTAC
AGCACACAAAAATCGCTCAGTCGTTGAGTAG

```

Şekil 10. *bla_{VIM-38}* genine ait nükleotit sırası

```

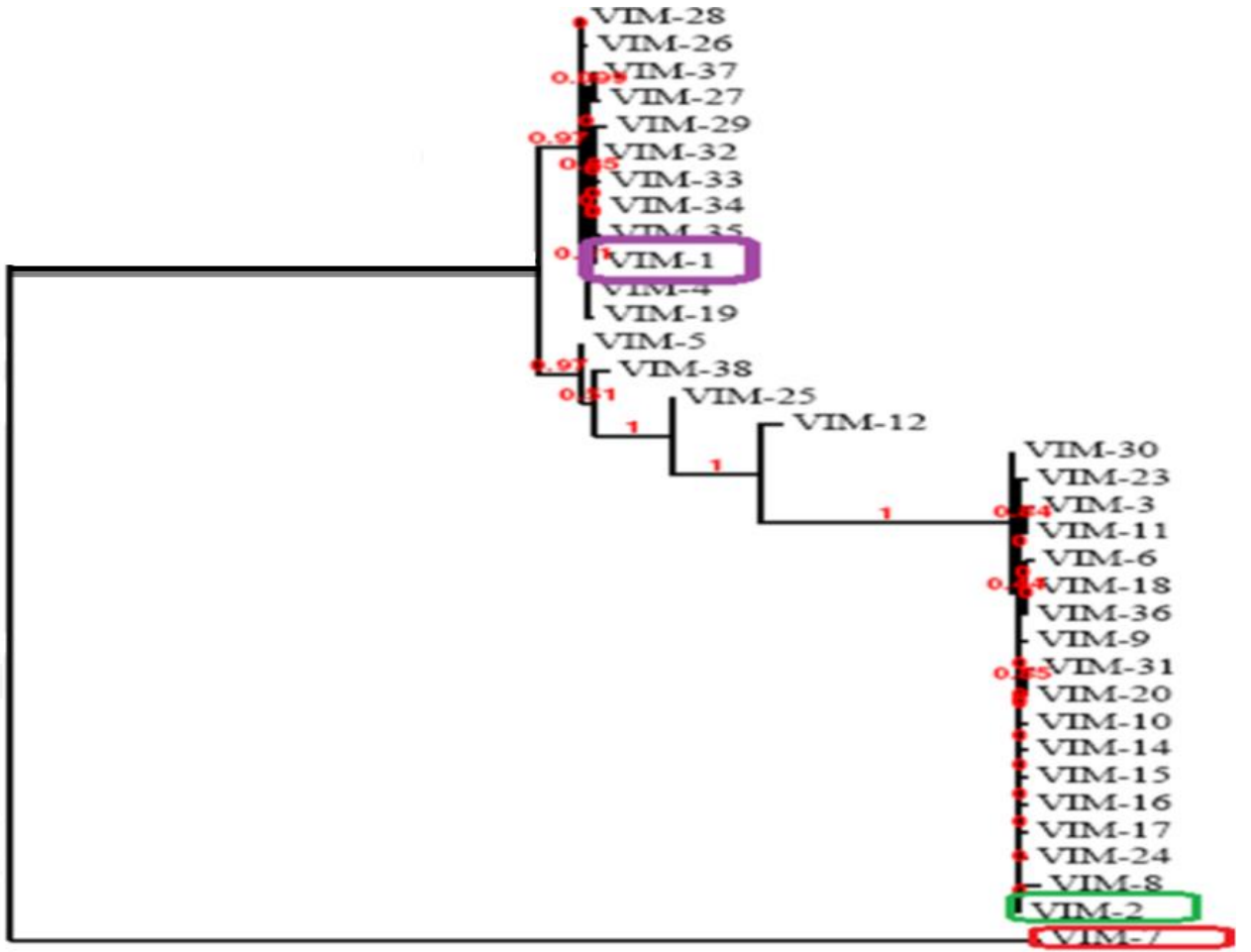
M L K V I S S L L V Y M T A S V M A V A S P L A H S G E P S G E Y P T
V N E I P V G E V R L Y Q I A D G V W S H I A T Q S F D G A V Y P S N
G L I V R D G D E L L L I D T A W G A K N T A A L L A E I E K Q I G L
P V T R A V S T H F H D D R V G G V D V L R K A G V A T Y A S P S T R
R L A E A E G N E I P T H S L E G L S S S G D A V R F G P V E L F Y P
G A A H S T D N L V V Y V P S A N V L Y G G C A V L A L S R T S A G N
V A D A D L A E W P T S V E R I Q K H Y P E A E V V I P G H G L P G G
L D L L Q H T A N V V T A H K N R S V V E

```

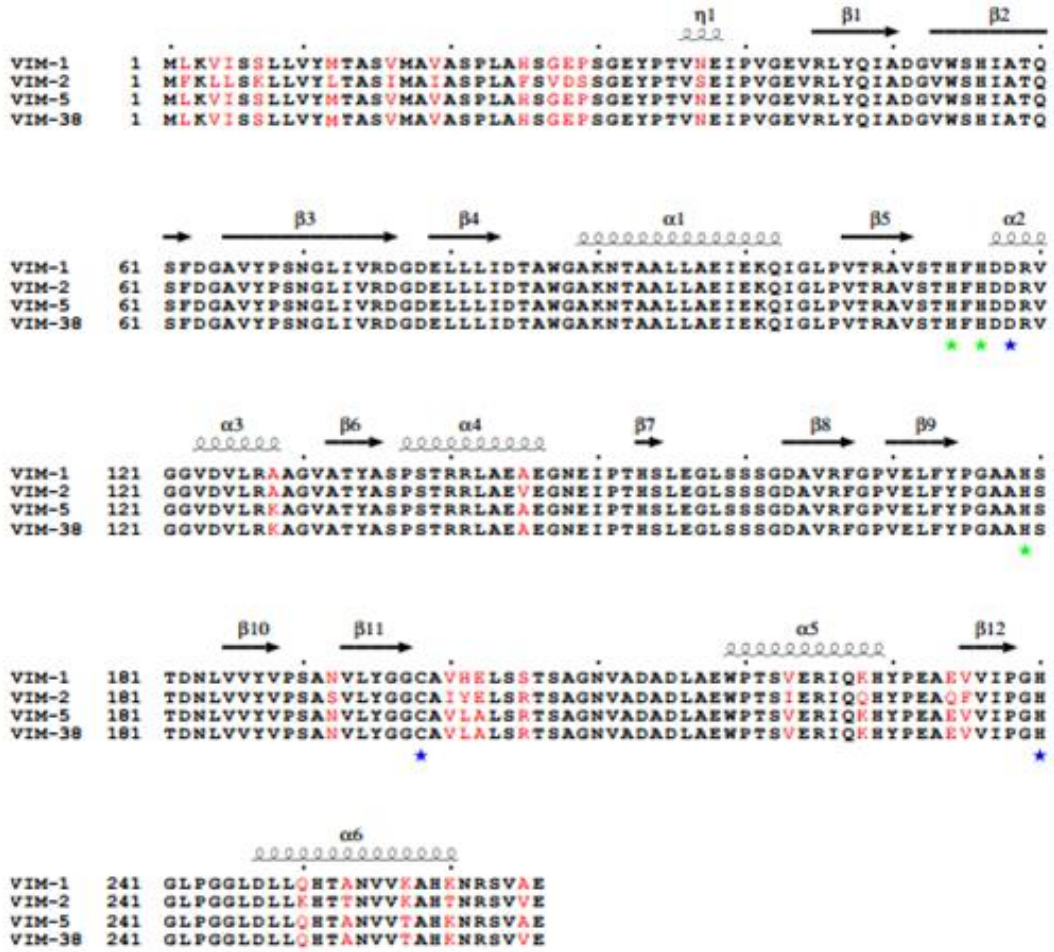
Şekil 11. VIM-38 enziminin aminoasit sırası

bla_{VIM} alellerinin aminoasit sıralarının karşılaştırılması *bla_{VIM-38}* geninin tüm nükleotit sırası belirlendikten sonra Expaty programı yardımıyla aminoasit sırasına dönüştürüldü. Daha sonra 37 *bla_{VIM}* aleli aminoasit sıraları kullanılarak benzerlik

Clustal W programında araştırıldı (Ek1 ve Şekil 12). Ayrıca VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin aminoasit düzeyinde karşılaştırılması Şekil 13' de gösterilmektedir.



Şekil 12. *bla*_{VIM} alellerinin benzerlik diyagramı



Şekil 13. VIM-38'in VIM-1-2-5 enzimleri ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması

3.8. VIM-38'in Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

VIM-38'in minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için metot kısmında belirtilen basamaklar gerçekleştirilerek TOPO vektörüne klonlandı. 15 farklı beta-laktam antibiyotiğe karşı VIM-38 ve VIM-5'in minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri belirlendi.

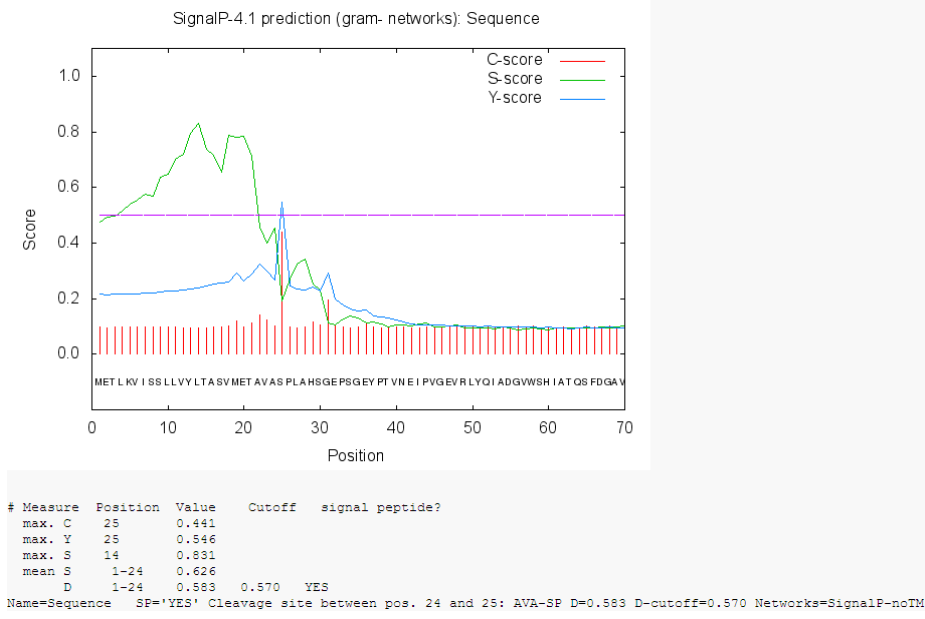
VIM-38 pozitif *P. aeruginosa* (BP2) suşunun MİK değerleri; ticarsilin, piperasilin ve sefoksitin için 256, sefotaksim ve seftazidim için 64, sefotaksim+CLA ve seftazidim+CLA için 1, meropenem, doripenem ve imipenem için 32 olduğu belirlendi (Tablo 24). *E.coli* TOP10 vektörüne klonlanan (pTOPO/*bla*_{VIM-38}) ve (pTOPO/*bla*_{VIM-5}) VIM-38 ve VIM-5'in kullanılan antibiyotiklere karşı MİK değerlerinin benzer olduğu görüldü (Tablo 25).

Tablo 25. MİK sonuçları

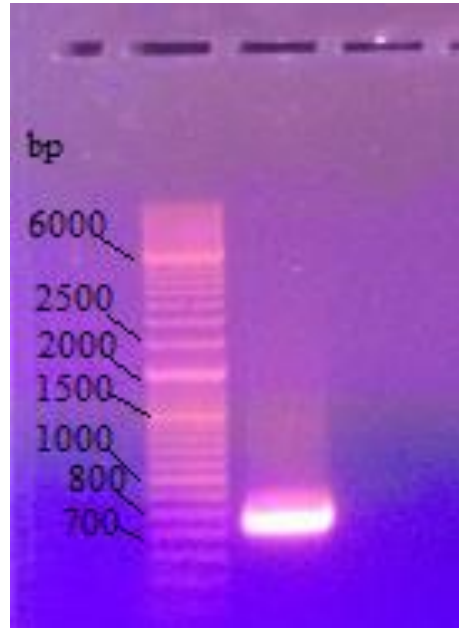
β-laktamlar	<i>P. aeruginosa</i> BP2 (VIM-38)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-VIM-38)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-VIM-5)	<i>E. coli</i> TOP10
Ticarsilin	>256	>256	>256	2
Ticarsilin + CLA	>256	>256	>256	2
Piperasilin	>256	128	128	1
Piperasilin + TZP	>256	128	128	1
Sefoksitin	>256	32	32	2
Sefotaksim	>64	32	32	0,06
Sefotaksim + CLA	>1	>1	>1	>1
Seftazidim	>64	32	32	0,12
Seftazidim + CLA	>1	>1	>1	>1
Sefepime	>64	0,094	0,094	0,06
Aztreonam	>256	0,06	0,06	0,03
Meropenem	>32	16	16	0,03
Doripenem	>32	0,125	0,125	0,03
İmipenem	>32	0,5	0,5	0,12
İmipenem + EDTA	1,5	0,12	0,12	0,12

3.9. *bla*_{VIM-38} Genin pET-28a Vektörüne Klonlanması

VIM-38 enziminin SignalP- 4.1 programı kullanarak sinyal dizisi belirlendi (Şekil 14) ve proteinin sinyal sırası dışarıda kalacak şekilde genomik DNA kullanılarak *bla*_{VIM-38} geni PZR'da çoğaltıldı. PZR sonucu “dur” kodonu ile birlikte toplam VIM-38'in 741 bp'lik (Şekil 15) bölgesi çoğaltıldı ve ekspresyon vektörüne klonlandı. Klonlanan örnekler DNA dizi analizine gönderildi.



Şekil 14. SignalP 4.1 programı kullanılarak VIM-38'in sinyal dizisinin tespiti



Şekil 15. *bla*_{VIM-38} geninin %1'lik agaroz jel görüntüsü

3.10. Nokta Mutasyonu ile VIM-38' den VIM-5 Elde Edilmesi

VIM-38 ile VIM-5 arasında tek bir aminoasit farkı vardır. Bu fark 265. aminoasit VIM-5' de Alanin VIM-38 ise valin aminoasitidir. Farklı iki enzim arasındaki enzimatik özelliklerin belirlenmesi ve aralarındaki farkları ortaya koymak amacıyla VIM-38 üzerinden VIM-5 elde edilebilmesi için nokta mutasyonu gerçekleştirildi. VIM-38' in 265. aminoasidi valini VIM-5'in 265. aminoasidi alanine çevirmek için primerler dizayn edildi. PZR metoduyla plazmit DNA (pET-28a+/bla_{VIM-38}) kullanılarak çoğaltıldı ve sekans analizine gönderildi. Sekans analizi sonucu VIM-5 kodlayan gen (pET-28a+/ bla_{VIM-5}) elde edildi ve çalışmalarda VIM-38 ile karşılaştırmalı olarak kullanıldı.

3.11. İnsersiyon ile 3C Proteazı Kodlayan Genin pET-28a+/bla_{VIM-5} ve pET-28a+/bla_{VIM-38}' e Klonlanması

HRV 3C proteaz Histag uzaklaştırılmasında kullanabilmek için bla_{VIM-5} ve bla_{VIM-38} genlerini içeren pET-28a vektörüne HRV 3C proteaz aminoasit sırası (L E V L F Q G P) PZR ile eklendi. HRV 3C proteaz aminoasit sırasını içeren pET-28a+/bla_{VIM-5} ve pET-28a+/ bla_{VIM-38} sekans sıraları Şekil 16 ve Şekil 17' de gösterilmektedir.

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTEFLEVL FQGPSPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQI  
ADGVWSHIATQSF DGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVST  
HFHDDR VGGVDVLRKAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPHTSLEGLSSSGDAVRF GPVELFYPGA  
AHSTDNLV VYVPSANVLYGGCAVLALSRTSAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVI PGHG  
LPGGLDLLQHTANVVTAHKNRSVAE
```

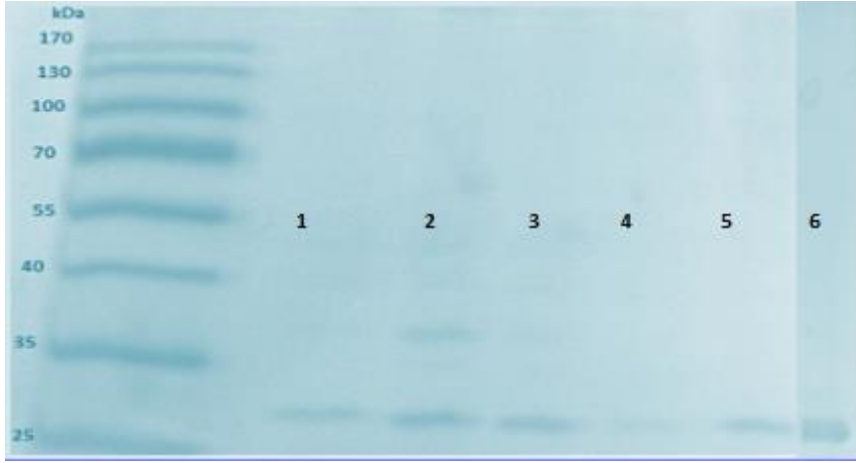
Şekil 16. HRV 3C proteaz aminoasit sırasını içeren pET-28a+/bla_{VIM-5} sekans sonucu

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTEFLEVL FQGPSPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQI  
ADGVWSHIATQSF DGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVST  
HFHDDR VGGVDVLRKAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPHTSLEGLSSSGDAVRF GPVELFYPGA  
AHSTDNLV VYVPSANVLYGGCAVLALSRTSAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVI PGHG  
LPGGLDLLQHTANVVTAHKNRSVVE
```

Şekil 17. HRV 3C proteaz aminoasit sırasını içeren pET-28a+/bla_{VIM-38} sekans sonucu

3.12. *bla*_{VIM-5} ve *bla*_{VIM-8} Genlerinin Ekspresyon Şartlarının Belirlenmesi

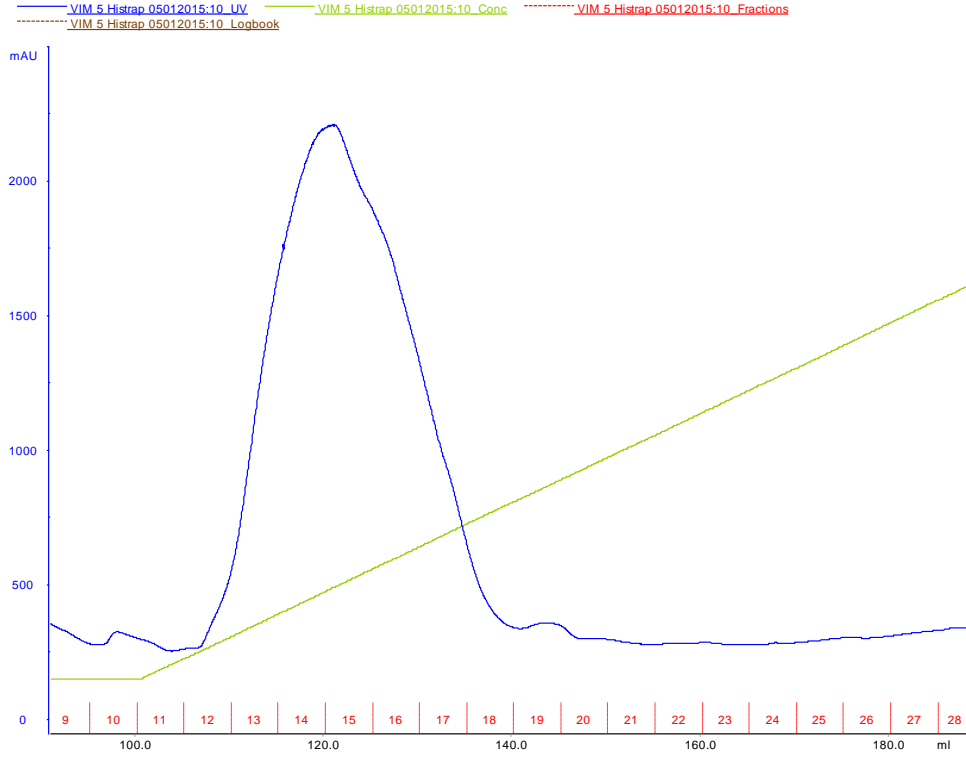
*bla*_{VIM-5} ve *bla*_{VIM-38}'in ekspresyonunu varlığını gözlemlemek ve ekspresyon şartlarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda IPTG (0,1 mM, 0,5 mM ve 1mM) ve farklı sıcaklıklarda (37 °C ve 18 °C) deneyler yapıldı ve proteinler SDS-PAGE (Şekil 18) de görüntülendi. Ekspresyonun gözlemlendiği şartlardan 0.1 mM IPTG 18 °C gece boyu seçilerek indükleme gerçekleştirildi ve proteinler sırasıyla Ni-kromotografisi ve jel filtrasyon yöntemiyle saflaştırıldı.



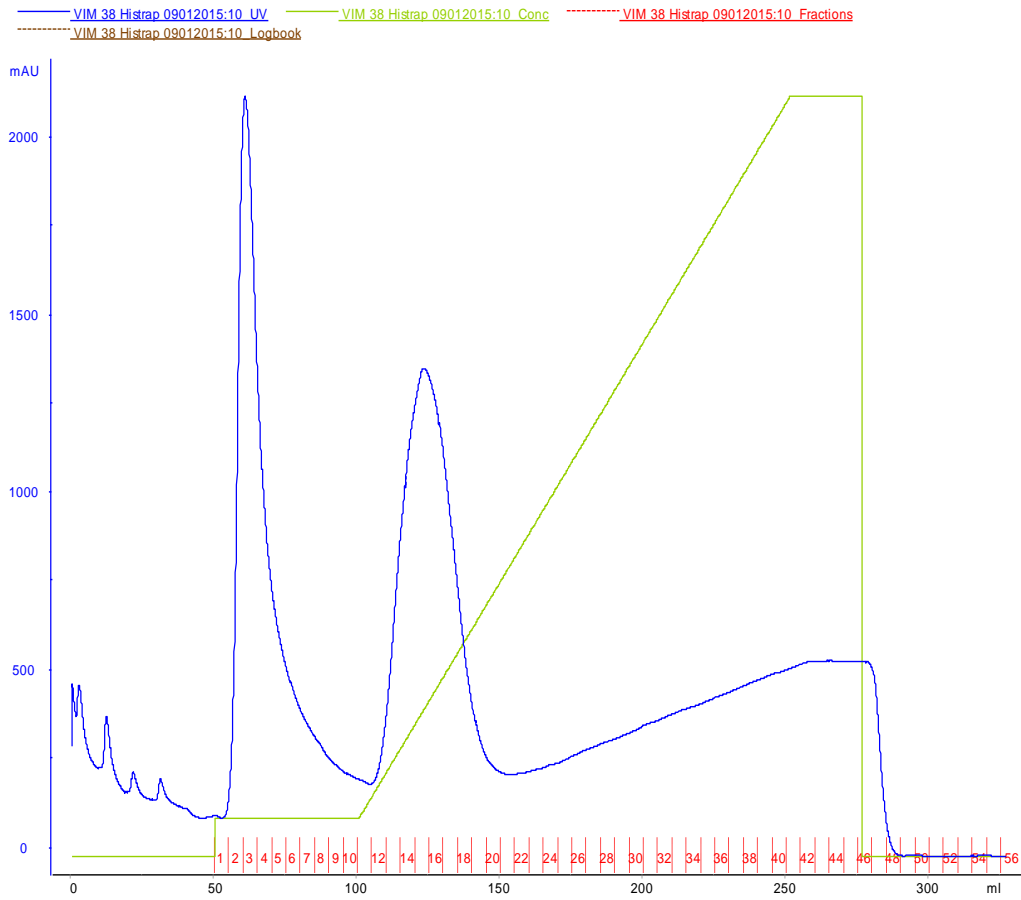
Şekil 18. Ekspresyon şartları SDS-PAGE jel görüntüsü. (1: 0,1 mM IPTG 37 °C 4 saat, 2: 0,5 mM IPTG 37 °C 4 saat, 3: 1 mM IPTG 37 °C 4 saat, 4: 1 mM IPTG 18 °C o/n, 5: 0,1 mM IPTG 18 °C o/n, 6: 0,5 mM IPTG 18 °C o/n)

3.13. Ni-Afinite Kromotografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması

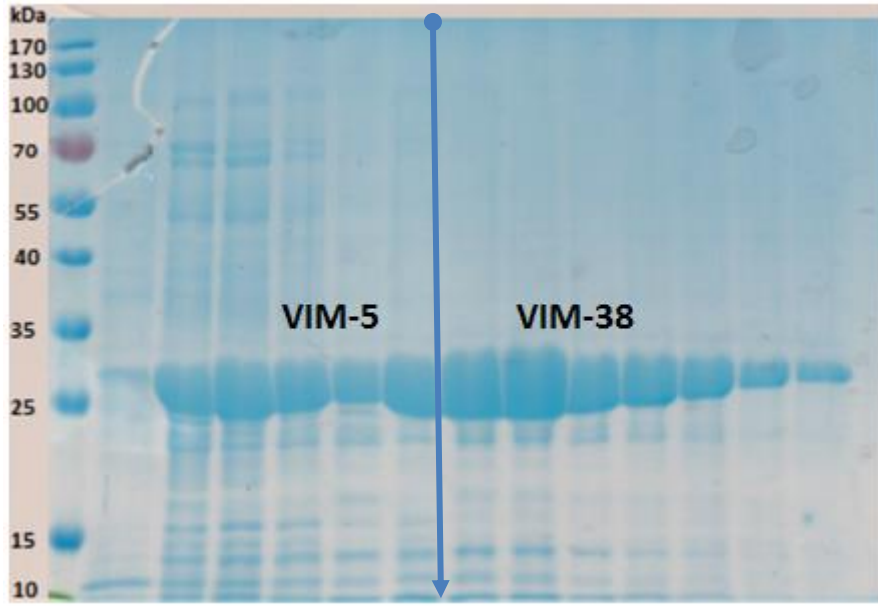
VIM-5 ve VIM-38 5 ml Histrap kolonu kullanılarak afinite kromotografisi ile saflaştırıldı. Proteinler saflaştırıldıktan sonra UV de gösterilen pik'lerin hangi tüplere denk geldiği belirlenerek (Şekil 19 ve Şekil 20) proteinleri içeren tüpler alındı (VIM-5 için 12-17 arası toplam 6 tüp, VIM-38 için 13-19 arası toplam 7 tüp). Her tüp, 5 ml protein içermektedir. VIM-5 30 ml ve VIM-38 ise 35 ml protein içermektedir. Jel filtrasyon yönteminde kolona en fazla 2 ml protein enjekte edilmektedir. Bundan dolayı 30 ml ve 35 ml protein 2 ml olacak şekilde konsantre edildi. Konsantre edilmeden önce proteinler SDS-PAGE de görüntülendi (Şekil 21).



Şekil 19. VIM-5'in afinite kromotografisi saflaştırma sonucu



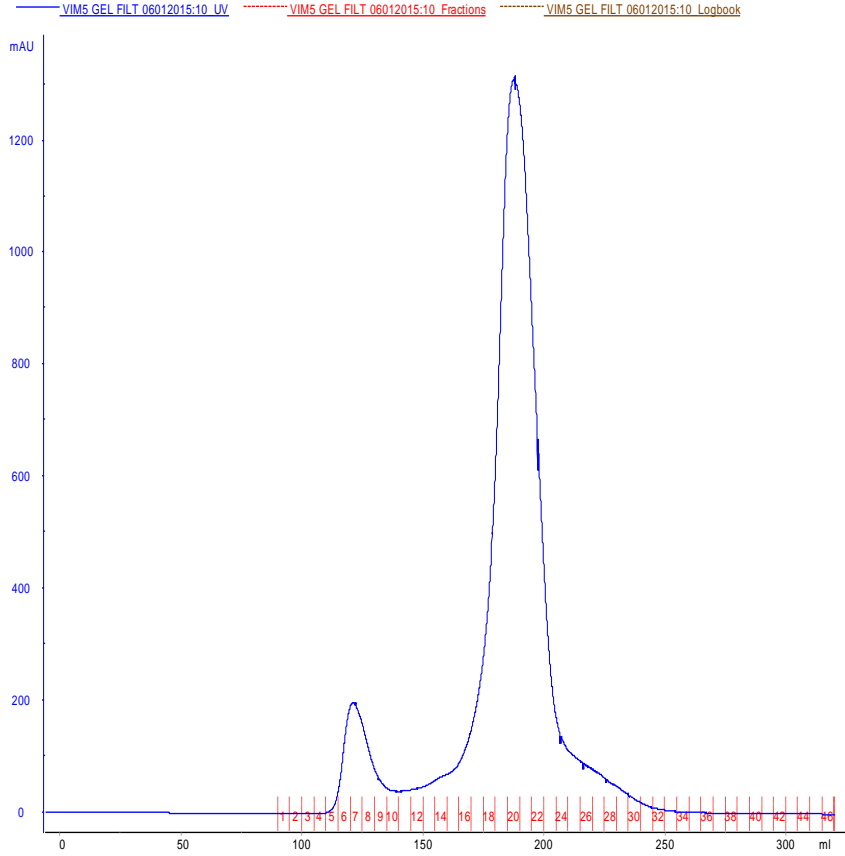
Şekil 20. VIM-38'in afinite kromotografisi saflaştırma sonucu



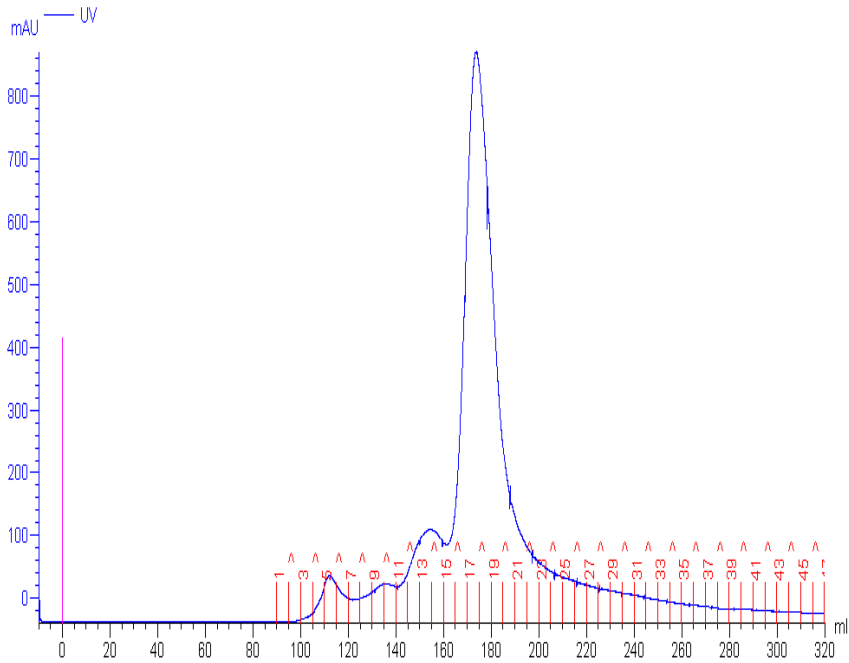
Şekil 21. VIM-5 ve VIM-38'in afinite kromatografisi sonrası SDS-PAGE görüntüsü

3.14. Jel filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Saflaştırılması

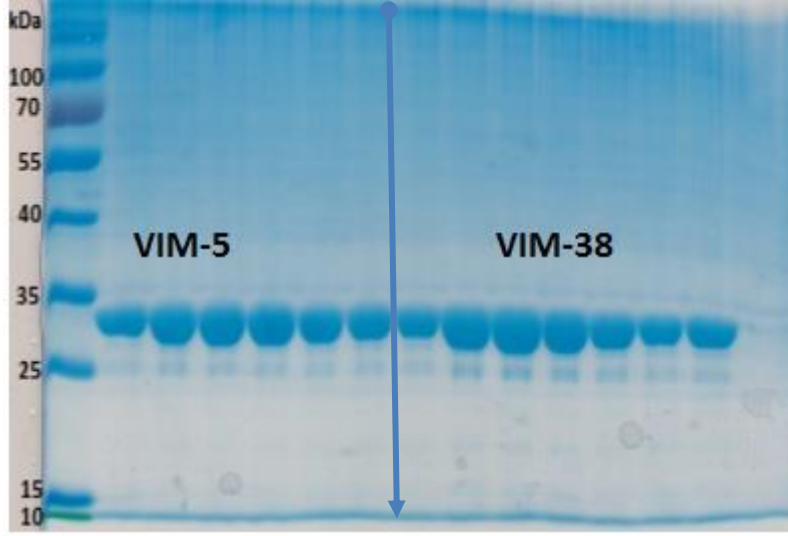
Proteinler 2 ml olacak şekilde konsantre edildikten sonra Superdex 75 300 ml kolonu kullanılarak VIM-5 ve VIM-38 saflaştırıldı. Saflaştırma sonrası VIM-5 (Şekil 22) ve VIM-38 (Şekil 23) için 16-21 arası tüpler (6 tüp 30 ml) seçildi ve SDS-PAGE de görüntülendi (Şekil 24). Daha sonra proteinler 3C proteas histrap kesimi için 10 ml olacak şekilde konsantre edildi.



Şekil 22. VIM-5'in jel Filtrasyon kromatografisi saflaştırma sonuç grafiği



Şekil 23. VIM-38'in jel Filtrasyon kromatografisi saflaştırma sonuç grafiği



Şekil 24. VIM-5 ve VIM-38'in jel filtrasyon kromatografisi sonrası SDS-PAGE görüntüsü

3.15. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

VIM-5 ve VIM-38 için 10 ml protein elde edilecek şekilde konsantre edildi. Proteinlerin moleküler ağırlığı ve coefficient değerleri daha önce belirtildiği üzere Expassy Translate ProtParam programıyla elde edilmişti. Bu değerler kullanılarak proteinlerin konsantrasyonları nano-drop cihazı kullanılarak belirlendi. VIM-5'in konsantrasyonu 5 mg/ml, VIM-38'in 2,32 mg/ml olduğu tespit edildi.

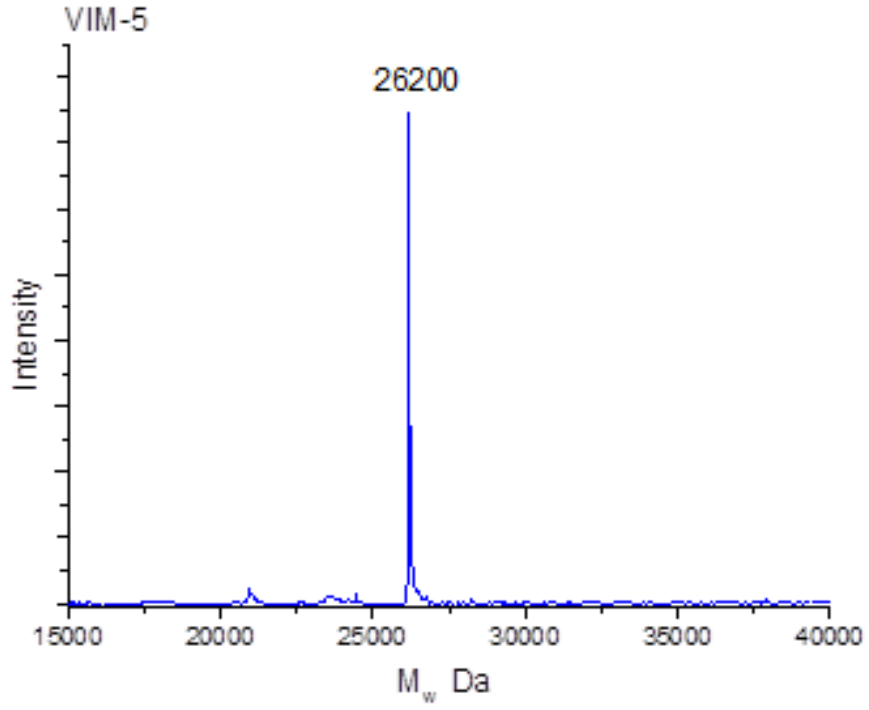
3.16. Histag Kuyruğunun Uzaklaştırılması

VIM-5 ve VIM-38 protein konsantrasyonları sırasıyla 5 mg/ml ve 2,32 mg/ml olarak belirlendi. Bu konsantrasyon VIM-5 için 1 ml de 5 mg protein, VIM-38 için ise 1 ml de 2,32 mg protein olduğu anlamına gelmektedir. Jel filtrasyon sonrası toplam 10 ml de protein elde edilecek şekilde konsantre edildi. Elde edilen toplam protein miktarı VIM-5 için 50 mg, VIM-38 için ise 23 mg'dır. Her eppendorf tüp içinde 200 µl 3C proteaz bulunmaktadır ve 200 µl 3C proteaz toplam 25 mg proteini kesebilmektedir. Bundan dolayı VIM-5'ten 6 histidini uzaklaştırabilmek için iki 3C proteaz içeren tüp ve VIM-38'ten 6 histidini uzaklaştırabilmek için ise bir 3C proteaz içeren tüp kullanıldı. 10 ml protein içeren tüplere 3C proteaz eklendikten sonra tüplerin kapakları parafilm ile iyice kapatılıp +4 ° C de gece boyu (minimum 17 saat) hafifçe çalkalamalı cihazda

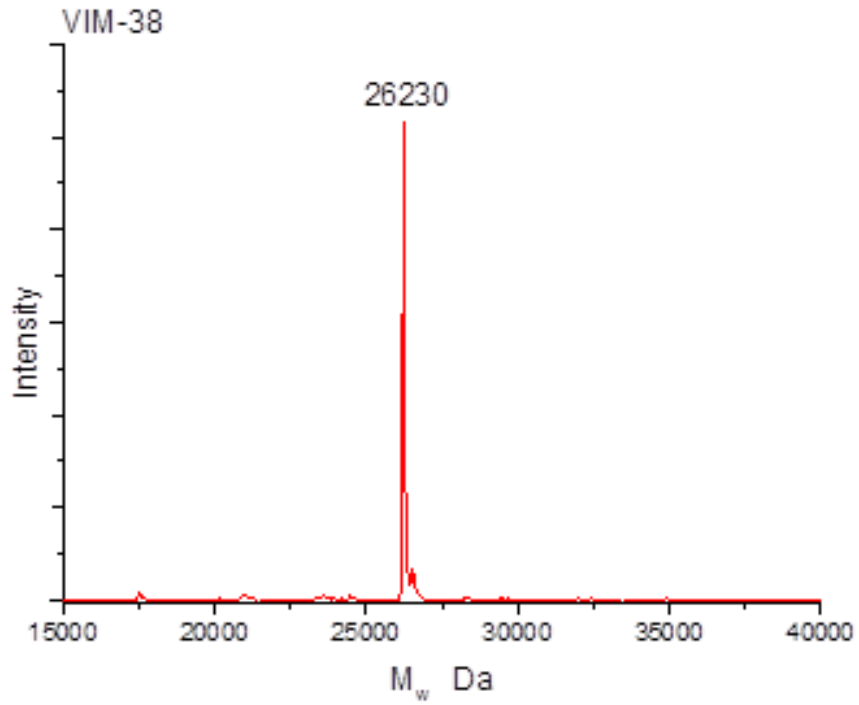
inkubasyona bırakıldı. Elde edilen protein+3C proteaz karışımı daha sonra 20 mM imidazollu tampon ile 5 ml histrap kolonu kullanılarak tekrar saflaştırıldı. Saflaştırma sonucu 40 ml VIM-5 ve 40 ml VIM-38 elde edildi. 3C proteaz ile 6 histidin uzaklaştırıldıktan sonra yine Expsy Translate ProtParam programı kullanılarak VIM-5 ve VIM-38 in moleküler ağırlığı belirlendi (26.08 kDa, 26.11 kDa). 40 ml olan proteinler 1 ml elde edilecek şekilde konsantre edildi. Son olarak 23.43 mg/ml VIM-5 ve 13.64 mg/ml VIM-38 elde edildi. Saf olarak elde edilen VIM-5 ve VIM-38'in doğru kütleye sahip olup olmadığını belirlemek için tekrar kütle spektrometresi yapıldı.

3.17. VIM-5 ve VIM-38 Proteinlerinin Kütlelerinin Belirlenmesi

VIM-5 in moleküler ağırlığı aktif bölgede çinko iyonu (65 g/mol) bulundurmadan 26,08 kDa, VIM-38'in ise 26,11 kDa olarak belirlendi. Kütle spektrometresi ile ölçüm yapıldığında Expsy programında tespit edilen moleküler ağırlığa bir veya iki çinko iyonu kütlesi eklenerek proteinlerin tam moleküler ağırlıkları belirlenmesi gerekmektedir. VIM-5 ve VIM-38 proteinleri ile yapılan ölçümler sonucu VIM-5 in moleküler ağırlığı 26.200 kDa VIM-38' in ise 26.230 kDa olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığı zaman program kullanılarak elde edilen hem VIM-5 hem de VIM-38 kütleleri ile spektrometre ile belirlenen kütleleri arasında 120 g/mol fark olduğu belirlendi. Bu fark proteinlerin aktif bölgede bir çinko iyonu 65 mg/ml ve çinko iyonundan farklı bir metal daha bulunduğunu göstermektedir (Şekil 25 ve Şekil 26). Bu sonuçlar hem VIM-5'in hem de VIM-38'in aktif bölgede çinko iyonu bulundurduğunu yani her iki proteinin de doğru şekilde katlandığını göstermektedir.



Şekil 25. VIM-5'in kütle spektrometre sonuç grafiği



Şekil 26. VIM-38'in kütle spektrometre sonuç grafiği

3.18. VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 Enzim Aktivite Deneylemleri

3.18.1. Steady-State Kinetik

VIM-5'in saflaştırıldıktan sonra en son elde edilen konsantrasyonu 23,43 mg/ml VIM-38'in ise 13,64 mg/ml olarak belirlendi. Proteinlerin konsantrasyonlar ve moleküler ağırlıkları kullanılarak proteinlerin molarite cinsinden değlerleri hesaplandı. VIM-5' in konsantrasyonu (23,43/26,08) 0,898 mM, VIM-38'in ise (13,64/26,11) 0,522 mM olarak belirlendi. Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için VIM-5 ve VIM-38'in konsantrasyonları 1 µM olacak şekilde aktivite tamponu ile sulandırılarak -80 ° C de saklandı.

Aynı deney şartlarında enzimlerin aktivitelerini değlendirebilmek için VIM-5 ve VIM-38'in dışında VIM-1 ve VIM-2 enzimleride kullanıldı. VIM-1 ve VIM-2 daha önce Oxford Üniversitesi çalışanları tarafından saflaştırılmış ve 1 µM konsantrasyonda -80 °C de saklandı.

VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin beta laktam antibiyotiklere karşı aktivitelerinin belirlenmesi için 8 farklı antibiyotik kullanıldı. İlk olarak her enzimin her substrata karşı en iyi aktivite gosterdiği konsantrasyon belirlendi.

VIM-1, VIM-2 ve VIM-38 0,5 nM, VIM-5 ise 0,25 nM konsantrasyonda nitrocefini iyi hidroliz ettiği gürüldü. Meropenemi VIM-1 2 nM da, VIM-2 ve VIM-5 8 nM da ve VIM-38 4 nM da, imipenemi tüm enzimler 2 nM da, seftazidimi VIM-1 1 nM da, VIM-2 0,1 nM da, VIM-5 ve VIM-38 0,5 nM da, sefhalotini VIM-1 ve VIM-2 0,5 nM da, VIM-5 ve VIM-38 1 nM da sefoksitini VIM-1 2 nM da VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 0,5 nM da ve ampisilini VIM-1 8 nM da, VIM-2 ve VIM-5 2 nM da, VIM-38 1 nM' da en iyi hidroliz ettikleri belirlendi. Belirlenen bu enzim konsantrasyonları steady-state kinetik çalışmalarda kullanıldı (Tablo 26). Steady-state kinetikte de elde edilen veriler kullanılan her substrat ve enzim için Michaelis–Menten grafikleri çizildi (Tablo 27 ve Tablo 28).

VIM varyantları kullanılan beta-laktam antibiyotikleri hidroliz etmeleri açasından aralarında çok küçük farkların olduğu gürüldü. Özellikle VIM-5 ve VIM-38'in katalitik

etkinliğinin birbirlerine çok benzer olduğu tespit edildi. Nitrosefine karşı en yüksek afinite $15 \mu\text{M}$ K_m ile VIM-1 gösterirken $72 \mu\text{M}$ K_m ile VIM-38'in nitrosefine karşı en az afinite gösterdiği belirlendi. $18 \mu\text{M}$ K_m ile VIM-2'nin meropeneme karşı en yüksek afiniteyi gösterdiği belirlendi. VIM-2, VIM-1 ve VIM-5' göre, imipeneme 2 kat daha yüksek afinite gösterdi. VIM-38'in imipeneme karşı en düşük K_m ($147 \mu\text{M}$) değerine sahip olduğu görüldü. Sefalosporin grubundan seftazidime karşı afinite en yüksekten en düşüğe sırasıyla VIM-1>VIM-5> VIM-2> VIM-38 ($84 \mu\text{M}$, $90 \mu\text{M}$, $119 \mu\text{M}$ ve $213 \mu\text{M}$)' dir. Sefalothin için VIM-1 $140 \mu\text{M}$, VIM-2 $49 \mu\text{M}$, VIM-5 $101 \mu\text{M}$ ve VIM-38 $59 \mu\text{M}$ K_m değerlerine sahip oldukları belirlendi. VIM-5 ve VIM-38 sefoksitine karşı çok düşük afinite gösterdi. Ampisilinin çalışılan dört enzim için de iyi bir substrat olmadığı görüldü. Tüm enzimler ampisiline karşı çok düşük afinite gösterdiler. Sırasıyla VIM-1 $1175 \mu\text{M}$, VIM-2 $713 \mu\text{M}$, VIM-5 $1138 \mu\text{M}$ ve VIM-38 $388 \mu\text{M}$ K_m değerleri belirlendi (Tablo 26).

k_{cat} (turnover sayısı) temel olarak, enzimin bir saniye de substratı ne kadar ürüne çevirdiğini gösterir. Nitrosefin için VIM-1 ve VIM-2'nin k_{cat} sonuçları birbirine çok yakınlık gösterdi. Meropenem için, VIM-1 en yüksek k_{cat} (43 s^{-1}) değerine sahipken VIM-2'nin en düşük k_{cat} (7 s^{-1}) değerine sahip olduğu belirlendi. Meropenem için VIM-5 ve VIM-38 ise birbirlerine çok yakın k_{cat} 'a sahip oldukları görüldü. İmipenem için 4 enzimin de k_{cat} değerleri arasında çok büyük fark gözlenmedi ve sırasıyla VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 için k_{cat} değeri, $31 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $92 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $58 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $89 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 'dir. Sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı enzimlerin k_{cat} sonuçlarına bakıldığı zaman en düşük değerler seftazidime karşı görüldü. Seftazidim için VIM-5 VIM-1'e göre 25 kat daha yüksek k_{cat} 'a sahip olduğu belirlendi Sefhalotin için 4 enzimde yüksek k_{cat} değerine sahiptirler. Sefoksitin için VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38'in k_{cat} değerleri $31 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $46 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $460 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ve $338 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 'dir (Tablo 26).

Bu sonuçlara göre Tablo 27 ve Tablo 28' de enzimlerin Michaelis–Menten grafikleri çizilmiştir.

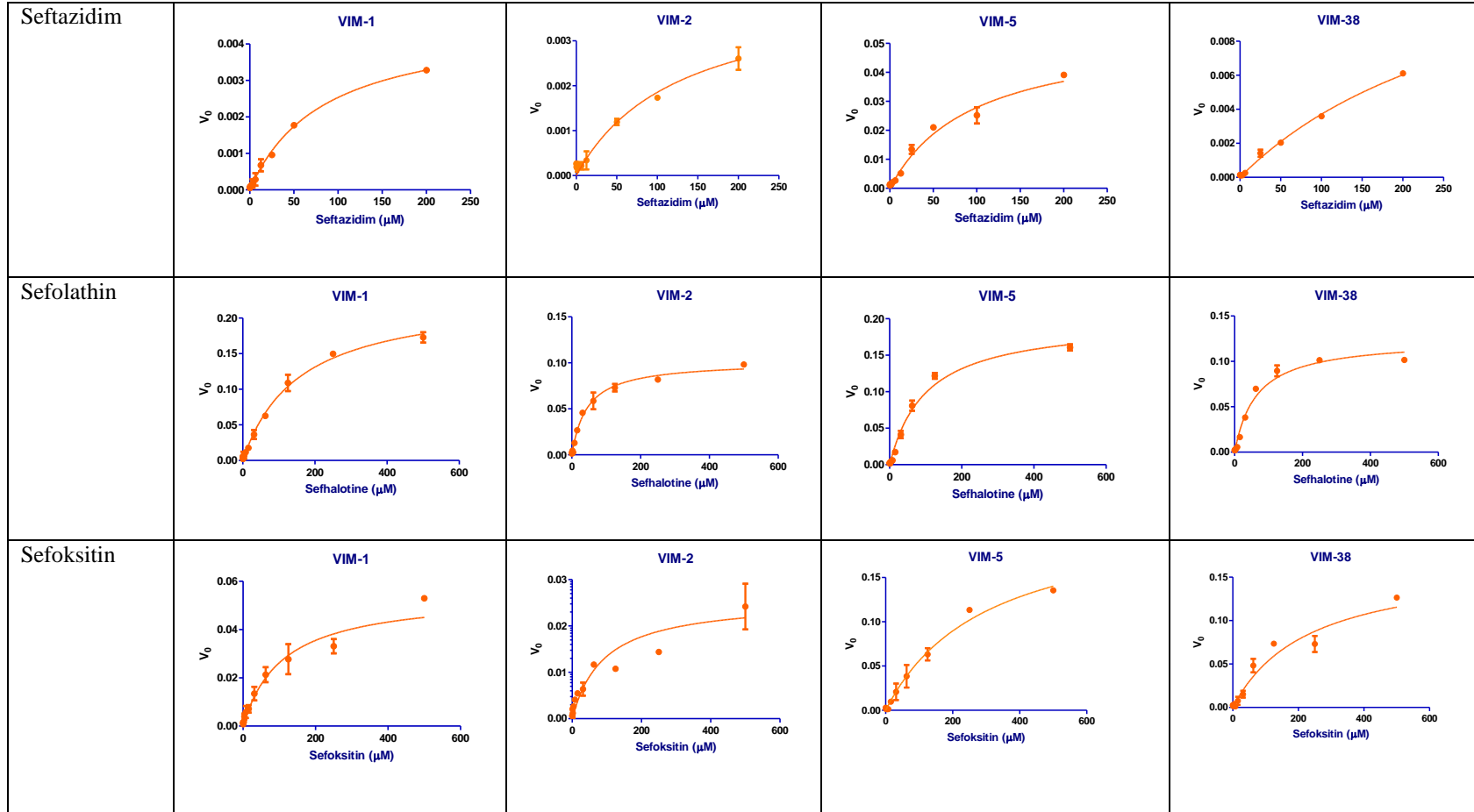
Tablo 26. Yedi Antibiyotiğe karşı VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin kinetik parametreleri

Enzim	Substrat								
			Nitrosefin	Meropenem	Imipenem	Seftazidim	Sefalotin	Sefoksitin	Ampisilin
VIM-1	Vmax	(s ⁻¹)	0.0650	0.0856 6	0.0624	0.0046	0.2237	0.0632	0.9767
	K _m	(μM)	15±0.9	72±6	64±8	84±8	140±13	170±47	1175± 174
	k _{cat}	(s ⁻¹)	130	43	31.22	4.6	447	31	122
	k _{cat} / K _m	(s ⁻¹ /μM)	8	0.59	0.48	0.05	3.1	0.18	0.103
	[E]	(nM)	0.5	2	2	1	0.5	2	8
VIM-2	Vmax	(s ⁻¹)	0.2568	0.0525 6	0.1846	0.0041	0.1034	0.0229	0.3618
	K _m	(μM)	53±5	18±2	31±3	119±34	49±6	42±13	713± 206
	k _{cat}	(s ⁻¹)	128.4	7	92	41	206	46	180
	k _{cat} / K _m	(s ⁻¹ /μM)	2.4	0.3	2.9	0.34	4.2	1.09	0.25
	[E]	(nM)	0.5	8	2	0.1	0.5	0.5	2
VIM-5	Vmax	(s ⁻¹)	0.1051	0.1147	0.1161	0.0572	0.1980	0.2303	0.4605
	K _m	(μM)	46±5	59±7	58±6	90±10	101±8	318±55	1138± 403
	k _{cat}	(s ⁻¹)	420	14	58	114	198	460	230
	k _{cat} / K _m	(s ⁻¹ /μM)	9.2	0.24	1	1.27	1.96	1.44	0.20
	[E]	(nM)	0.25	8	2	0.5	1	0.5	2
VIM-38	Vmax	(s ⁻¹)	0.3619	0.0546 1	0.1786	0.0126	0.1236	0.1691	0.1692
	K _m	(μM)	72±10	34±4	147±22	213±37	59±8	232±55	388± 77
	k _{cat}	(s ⁻¹)	723	13	89	25	123	338	169
	k _{cat} / K _m	(s ⁻¹ /μM)	10	0.4	0.60	0.11	2.09	1.45	0.43
	[E]	(nM)	0.5	4	2	0.5	1	0.5	1

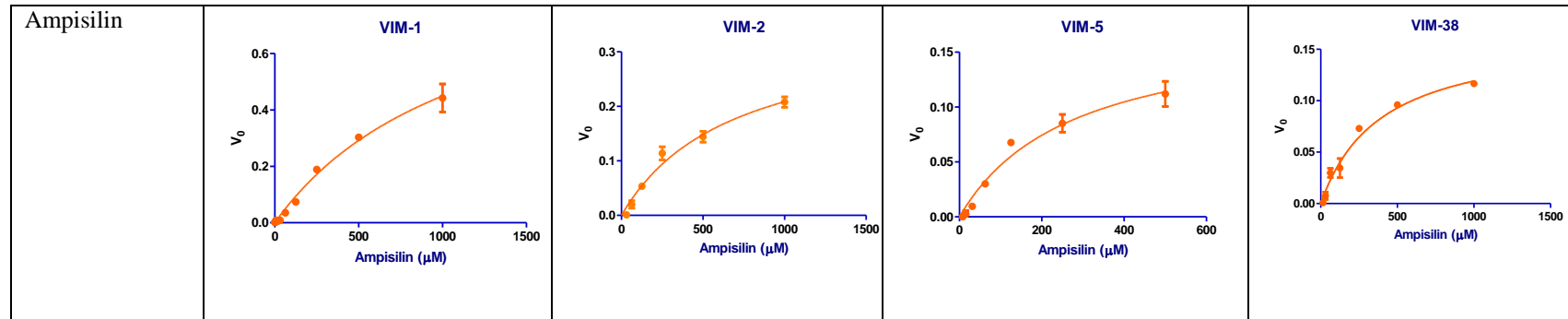
Tablo 27. Michaelis–Menten grafikleri

SUBSTRAT	ENZİM			
	VIM-1	VIM-2	VIM-5	VIM-38
Nitrosefin				
Imipenem				
Meropenem				

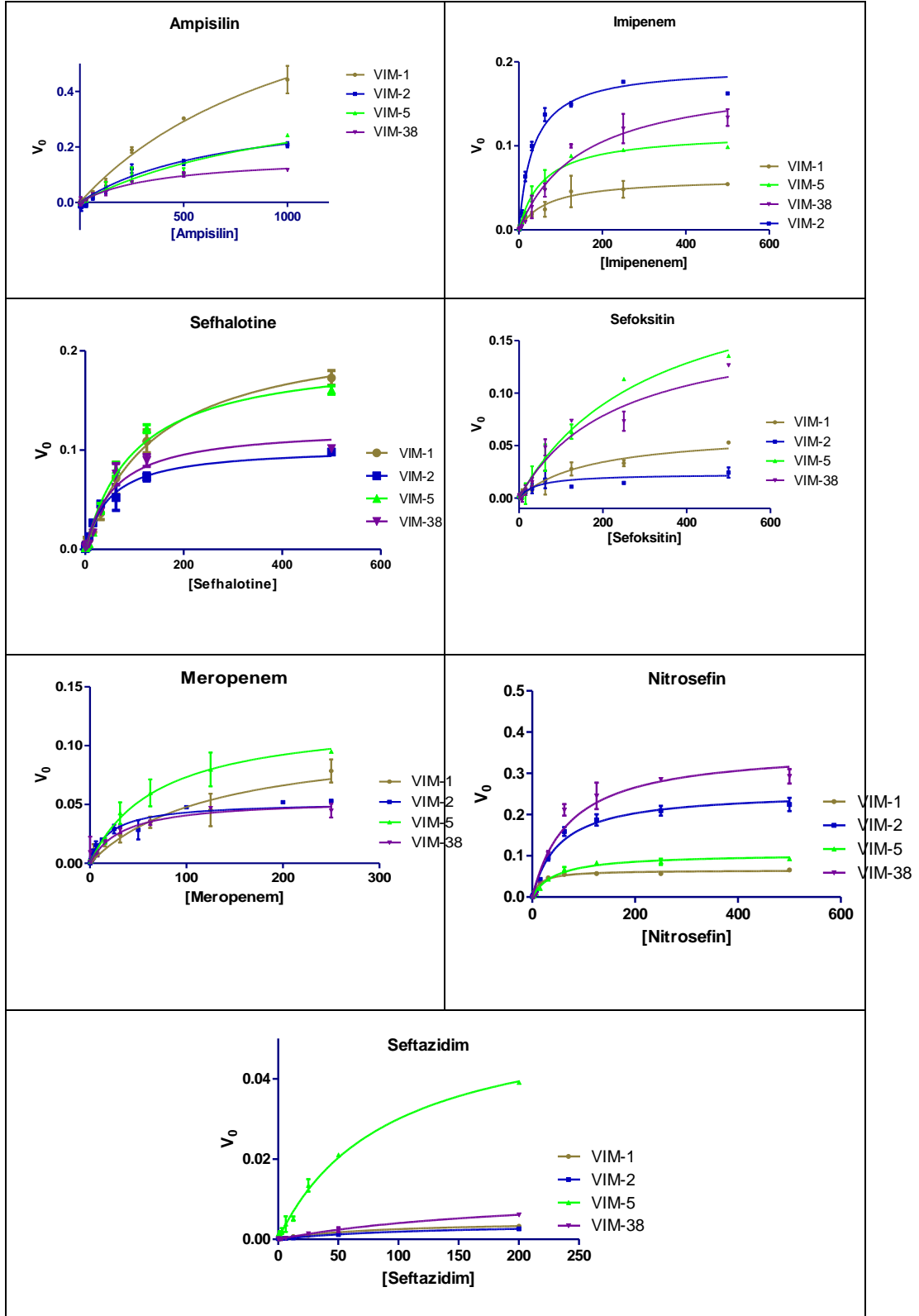
Tablo 27 (devam). Michaelis–Menten grafikleri



Tablo 27 (devam). Michaelis–Menten grafikleri

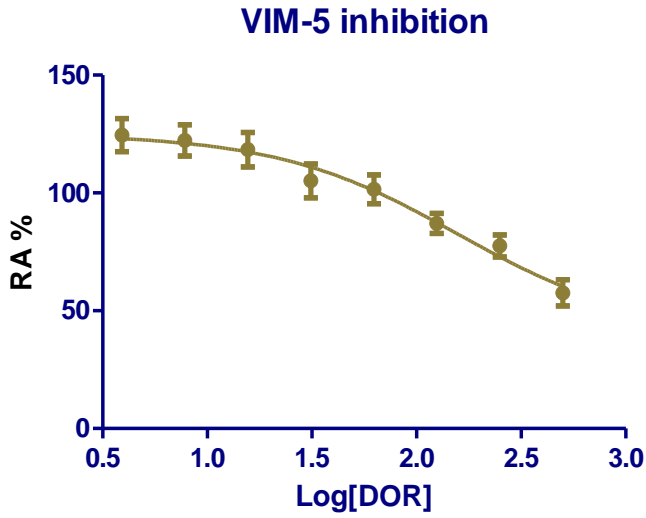


Tablo 28. VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin karşılaştırmalı Michaelis–Menten grafikleri



3.18.2. Doripenem Antibiyotiği ile İnhibisyon Deneyi

Doripenem ile VIM-5 ve VIM-38 enzimleri aktivite çalışmalarından sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine doripenemin enzimleri inhibe edebileceği düşünüldü VIM-5 ve VIM-38 ile inhibisyon deneyleri yapıldı. VIM-38 üzerine doripenemin inhibe etme etkisinin olmadığı tespit edildi. VIM-5'in üzerine doripenemin inhibisyon etkisinin araştırılmasında doripenem başlangıç konsantrasyonu 500 μ M kullanılmış ve seri seyreltmeyle inhibisyon deneyi yapılmıştır. Sonuç olarak 500 μ M ve üzeri doripenem konsantrasyonunda VIM-5'in inhibe olduğu görüldü (Şekil 27). Graphpad prism programı kullanılarak IC₅₀ değeri hesaplandı ve IC₅₀ değeri 157 olarak tespit edildi.



Şekil 27. VIM-5'in doripenem ile inhibisyon grafiği

3.18.3. İnhibisyon Deneyleri

56 farklı birleşik kullanılarak VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin inhibisyonu araştırıldı. İlk olarak 56 farklı bileşik ile enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı. Her birleşik ve her enzim ayrı ayrı kullanılarak inhibisyon değerleri belirlendi ve tablo haline getirildi (Tablo 28). Kalan aktivitesi en düşük enzimler ve 4 enzimin aktiviteleri arasındaki fark, görüldüğü 6 bileşik seçilerek IC₅₀ değerleri belirlendi. 6 farklı bileşikten ilki 24 numaralı bileşik olan AR634 ile yapılan inhibisyon deneyi sonucu, VIM-1'in 100, VIM-2'nin 50, VIM-5'in 82 ve VIM-38'in 44 %kalan

aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. İkinci bileşik 42 numaralı örnek ML302F ile yapılan deney sonucu dört enzimin de <0,5 %kalan aktivite gösterdiği görüldü. Üçüncü örnek 43 numaralı bileşik ML302 ile; VIM-1 75, VIM-2 2, VIM-5 ve VIM-38 <0,5 %kalan aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Dördüncü bileşik 44 numaralı örnek ML302 karboksilat ile VIM-1 65, VIM-2 6, VIM-5 47 ve VIM-38 48 %kalan aktivite gösterdi. Beşinci örnek 52 numaralı bileşik AR730B ile; VIM-1 79, VIM-2 39, VIM-5 <0,5 ve VIM-38 1,3, altıncı bileşik 53 nolu örnek AR678B ile VIM-1'in %kalan aktivitesi belirlenememişken VIM-2'nin 50, VIM-5'in 38 ve VIM-38'in 40 residual aktiviteye sahip oldukları görüldü (Tablo 29).

Tablo 29. Elli altı Farklı inhibitöre karşı VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38'in % kalan aktiviteleri (bileşiklerin moleküler formülleri için Tablo 20'ye bakınız)

No	%KA				No	%KA			
	VIM-1	VIM-2	VIM-5	VIM-38		VIM-1	VIM-2	VIM-5	VIM-38
1	25	40	47	49	29	48	60	47	63
2	24	100	94	84	30	100	97	100	98
3	73	100	78	64	31	59	42	90	96
4	12	85	46	41	32	87	89	93	94
5	1	6	2	3	33	61	80	73	93
6	69	71	89	84	34	48	66	92	92
7	85	94	98	87	35	59	65	58	79
8	35	71	96	81	36	65	68	78	83
9	100	88	92	90	37	226	100	100	100
10		21	54	60	38	2	<0,5	<0,5	<0,5
11	74	100	100	100	39	70	20	30	32
12	36	100	91	100	40	58	12	41	43
13	62	100	85	89	41	24	60	72	79
14	70	100	79	88	42	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
15	32	100	74	80	43	75	2	<0,5	<0,5
16	76	84	90	92	44	65	6	47	48
17	62	90	94	94	45	15	28	36	53
18	89	81	94	92	46	106	37	70	79
19	67	74	94	88	47	55	33	79	86
20	79	96	95	85	48	55	30	67	83
21	55	86	88	83	49	68	100	100	100
22	61	57	78	81	50	64	100	100	100
23	87	90	88	85	51	55	6	2	3
24	100	50	82	44	52	79	39	<0,5	1,3
25	49	79	85	79	53	-	50	38	40
26		91	89	82	54	68	64	79	78
27	55	77	71	68	55	78	78	87	90
28	95	92	85	100	56	31	76	79	89

3.18.4. Enzimlerin IC₅₀ Sonuçları

ML302F, ML302, ML302 COOH, AR730B, AR634 ve AR678B bileşikleri kullanılarak VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin IC₅₀ değerleri belirlendi. ML302F ile yapılan inhibisyon deneyinde VIM-1'in 3,7 µM, VIM-2'nin 0,02 µM, VIM-5'in 0,05 µM ve VIM-38'in 0,04 µM, ML302 ile yapılan deney sonucunda VIM-1'in IC₅₀ değeri belirlenememişken VIM-2'nin 2,3 µM, VIM-5'in 1,2 µM ve VIM-38'in 1,6 µM, ML302 COOH ile yapılan deney sonucu VIM-1'in 248 µM, VIM-2'nin 4,5 µM, VIM-5'in 46 µM ve VIM-38'in 69 µM IC₅₀ değerlerine sahip olduğu tespit edildi. Diğer 3 bileşik ile yapılan deneylerde VIM-1 için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. AR730B bileşiği kullanılarak; VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 IC₅₀ değerleri 91,6 µM, 1,5 µM, ve 1,6 µM AR634; 92,1 µM, 67 µM ve 62,5 µM AR678B; 335 µM, 50,3 µM ve 70,5 µM'dır (Tablo 30 ve Tablo 31).

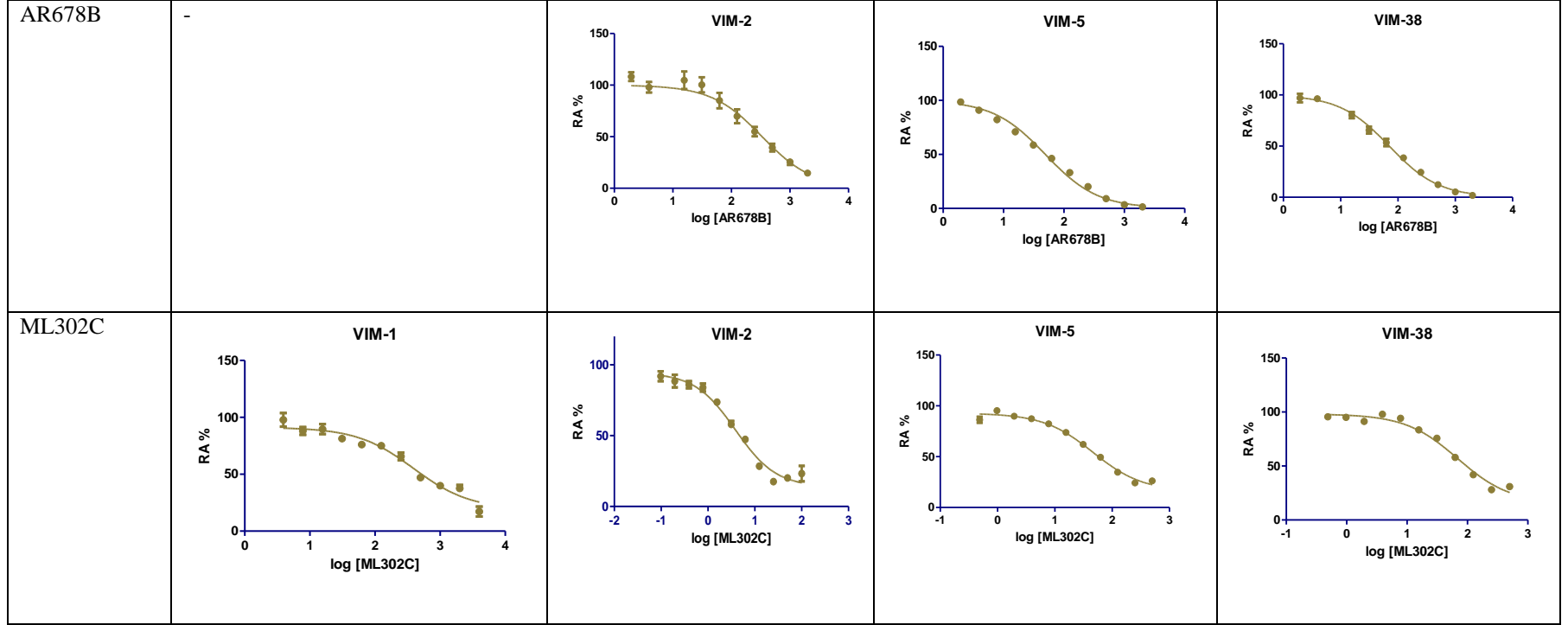
Tablo 30. Seçilen inhibitörler tarafından VIM-varyantlarının inhibisyon grafikleri

İNHİBİTÖR	ENZİM			
	VIM-1	VIM-2	VIM-5	VIM-38
AR730B	-	<p style="text-align: center;">VIM-2</p>	<p style="text-align: center;">VIM-5</p>	<p style="text-align: center;">VIM-38</p>
ML302F	<p style="text-align: center;">VIM-1</p>	<p style="text-align: center;">VIM-2</p>	<p style="text-align: center;">VIM-5</p>	<p style="text-align: center;">VIM-38</p>

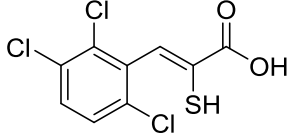
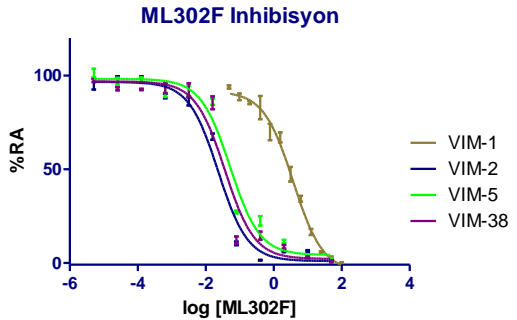
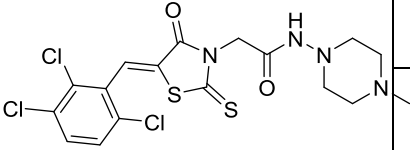
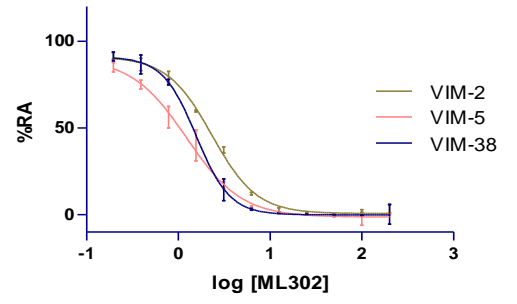
Tablo 30 (devam). Seçilen inhibitörler tarafından VIM-varyantlarının inhibisyon grafikleri

ML302	-	<p style="text-align: center;">VIM-2</p>	<p style="text-align: center;">VIM-5</p>	<p style="text-align: center;">VIM-38</p>
AR634	-	<p style="text-align: center;">VIM-2</p>	<p style="text-align: center;">VIM-5</p>	<p style="text-align: center;">VIM-38</p>

Tablo 30 (devam). Seçilen inhibitörler tarafından VIM-varyantlarının inhibisyon grafikleri

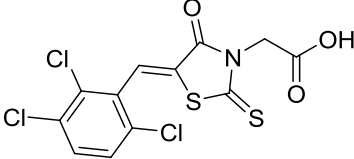
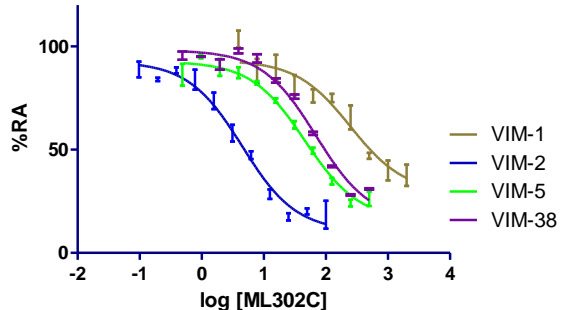
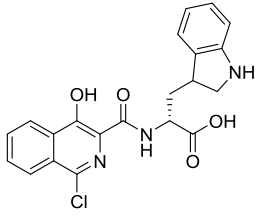
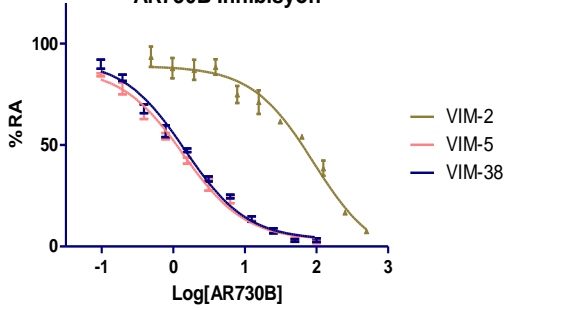


Tablo 31. Enzim inhibisyonlarının karşılaştırmalı grafikleri

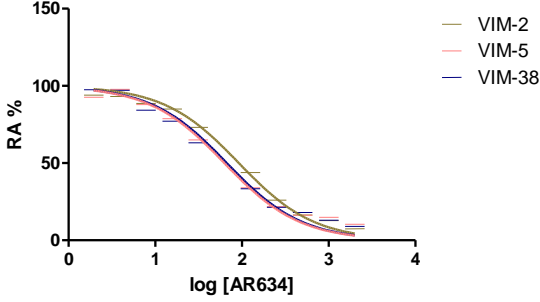
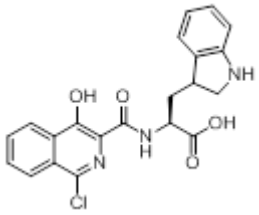
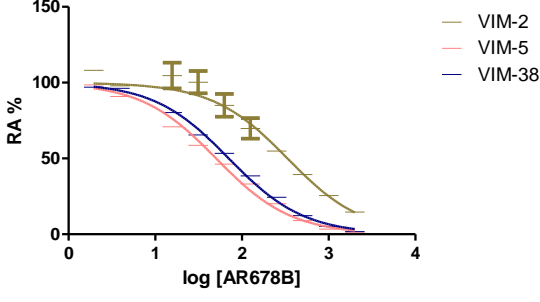
Birleşik	Yapı	KA/ IC ₅₀ (μM)				IC50 Grafikleri
		VIM-1	VIM-2	VIM-5	VIM-38	
ML302F		<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	
		3,7	0,02	0,05	0,04	
ML302		75	2	<0,5	<0,5	
		ND	2,3	1,2	1,6	
		ND	335	50,3	70,5	

Tablo 31 (devam). Enzim inhibisyonlarının karşılaştırmalı grafikleri

06

ML302 COOH		65	6	47	48	<p>ML302C Inhibisyon</p> 
		248	4,5	46	69	
AR730B		79	39	<0,5	1,3	<p>AR730B Inhibisyon</p> 
		ND	91,6	1,5	1,6	
		ND	335	50,3	70,5	

Tablo 31 (devam). Enzim inhibisyonlarının karşılaştırmalı grafikleri

AR634		100	50	82	44	<p>AR634 Inhibisyon</p> 
AR678B		ND	50	38	40	<p>AR678B Inhibisyon</p> 

3.19. CD Sonuçları

CD spektrometresi kullanılarak proteinlerin sekonder yapısı ve erime sıcaklıkları belirlendi. CD spektrometresi ile proteinler 25-95 ° C sıcaklıkla denature edildikten sonra proteinlerin yeniden katlanıp katlanamayacağı tespit edildi. 95 ° C de proteinler denature edildikten sonra 95 ° C den tekrar 25 ° C ye sıcaklık değiştirildiği zaman proteinlerin çok kararlı olduğu ve tekrar doğru bir şekilde katlandığı tespit edildi. Denaturasyon öncesi ve denaturasyon sonrası VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin α heliks yapıda olduğu belirlendi. Denaturasyon sırası VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38'in erime sıcaklıkları 69, 78,3, 83,8 ve 83,1 iken, denaturasyon sonrası erime sıcaklıklarının 65, 72,9, 77 ve 74,7 olduğu tespit edildi. Denaturasyon sırası proteinlerin erime sıcaklık farkları VIM-1 ile VIM-2 arasında 9 ° C, VIM-1 ile VIM-5 ve VIM-38 arasında 14 ° C, VIM-2 ile VIM-5 ve VIM-38 arasında 5 ° C olduğu görüldü. Denaturasyon sonrası sıcaklık farkları ise VIM-1 ile VIM-2 arasında 7 ° C, VIM-1 ile VIM-5 ve VIM-38 arasında yaklaşık 10 ° C, VIM-2 ile VIM-5 arasında 5 ° C, VIM-2 ile VIM-38 arasında 2 ° C ve VIM-5 ile VIM-38 arasında 3 ° C fark olduğu tespit edildi (Tablo 32).

Tablo 32. Enzimlerin sekonder yapısı ve erime sıcaklık grafikleri

Enzim	Spektra	Sıcaklık Denaturasyon
Kombine	<p>VIMs spectra</p> <p>Normalized CD signal</p> <p>Dalga boyu</p> <ul style="list-style-type: none"> VIM-1 VIM-2 VIM-5 VIM-38 	<p>VIM-tipi Tm</p> <p>CD sinyal [%]</p> <p>Sıcaklık (°C)</p> <ul style="list-style-type: none"> VIM-1 (69.0) VIM-2 (78.3) VIM-5 (83.8) VIM-38 (83.1)
VIM-1	<p>VIM-1 spectra</p> <p>CD Sinyal (Millidegrees)</p> <p>Dalga boyu</p> <ul style="list-style-type: none"> spectra refolded 	<p>VIM-1 Tm</p> <p>CD signal [%]</p> <p>Temperature</p> <ul style="list-style-type: none"> unfolding (69) refolding (65)
VIM-2	<p>VIM-2 spectra</p> <p>CD Sinyal (Millidegrees)</p> <p>Dalga boyu</p> <ul style="list-style-type: none"> spectra refolded 	<p>VIM-2 Tm</p> <p>CD sinyal [%]</p> <p>Sıcaklık</p> <ul style="list-style-type: none"> unfolding (78.3) refolding (72.9)
VIM-5	<p>VIM-5 Spectra</p> <p>CD Sinyal (Millidegrees)</p> <p>Dalga boyu</p> <ul style="list-style-type: none"> spectra refolded 	<p>VIM-5 Tm</p> <p>CD sinyal [%]</p> <p>Sıcaklık</p> <ul style="list-style-type: none"> Unfolding (83.8) Refolding (77.0)
VIM-38	<p>VIM-38 Spectra</p> <p>CD Sinyal (Millidegrees)</p> <p>Dalga boyu</p> <ul style="list-style-type: none"> spectra refolded 	<p>VIM-38 Tm</p> <p>CD sinyal [%]</p> <p>Sıcaklık</p> <ul style="list-style-type: none"> unfolding (83.1) refolding (74.7)

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Doktora tezi olarak yapılan bu çalışmanın ilk kısmında 104 *P. aeruginosa* Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Hastanesinden alınmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2 Compact sistem kullanılarak yapılmış ve suşların antibiyotik direnç profilleri tespit edilmiştir. Antibiyotik direnç profillerine göre izolatlardan 24 tanesinin çoklu-ilaç dirençli olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlar antibiyotik direnç genlerinin varlığı açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirilen örneklerin DNA sekans analizine göre bir tane GES tipi serin-beta laktamaz (GES-5) ve bir tane VIM tipi metallo-beta-laktamaz tespit edilmiştir. VIM-tipi metallo beta laktamazın yeni bir protein olduğu ve en yakın ve bir aminoasit farkla daha önce Türkiye de bulunan VIM-5 metallo beta laktamaz enzimine benzediği tespit edilmiştir. Bu yeni varyant VIM-38 olarak adlandırılmış ve genbankasına girilerek kayıt numarası alınmıştır.

P. aeruginosa her yerde bulunan Gram-negatif fırsatçı bir organizmadır. *P. aeruginosa* suşlarının hastane kökenli pnömoni ve özellikle de bağışıklığı baskılanmış konaklarda fulminan sepsisler gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hastanelerde *P. aeruginosa* çok çeşitli kaynaklardan izole edilebilir ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların kökünü kazımak çok zordur. Çünkü bunlar doğal olarak antimikrobiyal dirence sahiptirler. Bununla birlikte, β -laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlara gibi antibiyotiklere karşı genler bakterileri daha dirençli yapmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasında, kan örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşları piperasilin, piperasilin-tazobaktam, sefoperazon-sulbaktam, sefepime karşı çok daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Aynı antibiyotiklere karşı yara, balgam ve diğer örneklerden izole edilen suşlar kandan izole edilen örnekler ile karşılaştırıldığı zaman daha az dirençli oldukları görülmüştür. Bu gözlemler, suşları elde ettiğimiz hastanede ampirik rejimi öncelikle kan kültürlerinden tespit edilen *Pseudomonas* spp enfeksiyonlarında sefoperazon-sulbaktam vs piperasilin-tazobaktam gibi antibiyotiklerin kullanımına dayandığı gerçeğini göstermektedir. Bunların aksine, yaradan izole edilen örnekler kandan, balgamdan ve diğer örneklerden izole edilen suşlar ile karşılaştırıldığı zaman amikasin, gentamisin, netilmisin, tobramisin ve siprofloksasin gibi antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu direnç

orani suşların alındığı hastanede yara örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* spp.'nin ciddi enfeksiyonlarının tedavi başlangıcında siprofloksasin ve aminoglikozidlerin ampirik kullanımını yansıttığı göstermektedir. Karbapenemlerden olan meropeneme karşı direnç oranı kan ve yara örneklerinden izole edilen suşlarda çok düşük olduğu görülürken balgam örneklerinden izole edilen suşlarda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Guiana extended spectrum (GES) β -laktamaz Ambler sınıflandırmasında Sınıf A'ya aittir ve ilk olarak Fransa da tanımlanmıştır. GES-5 ilk başta Yunanistan da *E. coli* izolatında karakterize edilmiştir ve GES-tipi beta-laktamazlar imipenemi, seftazidimi ve sefoksitini hidroliz edebilir fakat aztreonamı hidroliz edemezler (Naas vd., 2008). GES-1 enziminin çeşitli varyantları *P. aeruginosa* suşlarında rapor edilmiştir (GES-2, GES-3, GES-5, GES-8, GES-9, GES-13 ve son olarak GES-18) ve GES-5 enzimi de dahil olmak üzere bazı varyantlar karbapenem aktivitesi gösterirler (Bonnin vd., 2013; Bebrone vd., 2013; Cicek vd., 2013a). Genellikle, *bla*_{GES}-tipi genler sınıf 1 integronların yapısının bir parçası olarak meydana gelirler fakat son zamanlarda yeni bir genetik yapıyla ilişkili integron mobilization unit (IMU) diye adlandırılan bir yapı tarif edilmiştir ve bu minyatür ters değiştirebilir (MITES) elemanlarla benzer özelliklere sahiptir (Nordmann vd., 2011; Poirel vd., 2009). Daha önceki çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarında meydana gelen sınıf 1 integron-ilişkili *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2} ve *bla*_{GES-5} genlerini tanımlanmıştır (Poirel vd., 2001; Labuschagne vd., 2008). Bu doktora tezinde *P. aeruginosa* suşunda *bla*_{GES-5} karbapenemaz geni ilk defa Türkiye'den tanımlanmıştır.

VIM-tipi metallo-beta laktamazlar, farklı ülkelerde *P. aeruginosa* suşlarında tespit edilmiştir; VIM-1 ilk olarak İtalya' da görülmüştür ve daha sonra VIM-2 varyant dünya çapında tanımlanmıştır (Cornaglia vd., 2011). VIM-1 grubuna ait olan VIM-5 enzimi ise ilk olarak Türkiye' de klinik bir *P. aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir (Bahar vd., 2004). *bla*_{VIM-5} geni ayrıca karbapenemazlar üzerine Hindistan' da geniş-çapta yapılan bir ulusal çalışma da tanımlanmıştır (Castanheira vd., 2009).

Yine bu doktora tezi kapsamında *bla*_{VIM} geninin yeni bir varyantı tespit edilmiştir. VIM-5 ve VIM-38 aminoasit sıraları karşılaştırıldığında, birbirlerinden aminoasitin farklı oldukları belirlenmiştir. *bla*_{VIM-38} geninin klonlama ve ekspresyon çalışmaları VIM-38 enziminin kendine en yakın karbapenemaz olan VIM-5'e hidrolitik

profilinin çok benzer olduğunu göstermiştir. *bla*_{VIM-38} geni sınıf 1 integron içinde gömülü halde bulunmaktadır. Bu sınıf 1 integron sadece iki gen kaseti içermektedir. Başlangıçta *bla*_{VIM-38} geni ve bunu takiben *orfD* gen kasetinin bulunmaktadır. *orfD* gen kaseti fonksiyonu bilinmeyen 96 aminoasitlik küçük bir polipeptiti kodladığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu genetik yapının varlığı Türkiye’ de klinik örnekten izole edilen ve *bla*_{VIM-5} genini taşıyan *Enterobacter cloacae* suşunda da görülmüştür (Meric vd., 2008). Ayrıca bu çalışmada tanımlanan *bla*_{GES-5} geninin de sınıf 1 integronla ilişkili olduğu tanımlanmıştır (Poirel vd., 2009).

Çalışmada tanımlanan diğer karbapenem dirençli izolatların karbapenemleri hidroliz eden beta-laktamazların varlığı açısından negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu hem moleküler hem de fenotipik çalışmalarla desteklenmiştir. Bu bulgular, bu izolatların seftazidime duyarlı, (meropenem hariç) karbapenemlere direnç olduğu *P. aeruginosa*’ da değiştirilmiş OprD2 porinin olması ile açıklanmaktadır (Mesaros vd., 2007).

Bu doktora tezi yapılanaya kadar toplamda VIM-tipi metallo beta-laktamazın 37 varyantı olduğu rapor edilmiştir. Bu varyantlar arasında bir veya birkaç aminoasit yer değişimine sahiptirler (<http://www.lahey.org/Studies/>). Her yıl bazı yeni varyantlar Enterobacteriaceae türlerinde tanımlanmaktadır. Bu yeni varyantlardan olan *bla*_{VIM-38} bir aminoasit değişimi ile VIM-5’e benzemektedir. Genler üzerinde mutasyonların birikmesi yıllar alır ve bir gen üzerinde biriken mutasyonların miktarı o genin uzun geçmişi hakkında bilgi verir. Beta laktamazların diğer türleri ile karşılaştırıldığı zaman şu anda VIM tipi β -laktamazların varyantı azdır ama yıllar sonra ne kadar varyantlara sahip olacakları tahmin edilemez.

Sonuç olarak, bu doktora çalışmasının sonuçlarından biri, Türkiye’de *bla*_{GES-5} karbapenemaz geninin ilk defa rapor edilmesidir ve yeni bir VIM-tipi metallo beta laktamaz olan VIM-38 tanımlanmasıdır. Türkiye’deki antimikrobiyal seçici stres bu karbapenemaz genlerinin yayılımına neden olabilir ve bu genlerin *P. aeruginosa* suşlarına yerleşmelerine imkan sağlayabilir.

Doktora çalışmasının bir diğer sonucu ise aynı deneysel koşulları altında VIM-1, VIM-2 ve VIM-5 enzimleri ile karşılaştırmalı olarak VIM-38 enziminin detaylı kinetik ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılmış olmasıdır.

BBL numbering sistemi, tüm MBL'leri kapsayan ortak aminoasit numaralandırma sistemidir. Bu güne kadar var olan MBL'lerin hepsi farklı aminoasit sayısına sahiptir ve bu göz önüne alınarak ortak bir numaralandırma sistemi geliştirmişlerdir (Garau vd., 2004). VIM-5 ve VIM-38 % 99 oranında birbirlerine benzemektedirler. Bu iki varyant VIM-1 grup enzimine aittirler. VIM-5 ve VIM-1 arasında 5 aminoasit fark vardır. Bu farklar A130K, H224L, E225A, S228R, K291T aminoasitleridir (BBL numbering) ve bu aminoasit değişikliklerine ek olarak VIM-38 BBL numbering düzenlemesine göre 288. (265. pozisyon) aminoasit Alanin Valine dönüşmüştür. Bu varyantlar, aminoasit seviyesinde VIM-2 ile %90'lık benzerlik gösterir. Özellikle VIM-5 ve VIM-38' de olan Arg228 ve Leu224 aminoasitleri büyük önem arz etmektedir ki bu aminoasitlerin VIM-tipi metallo-beta-laktamaz enzimlerinin substrat özgülüğünü etkilediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Docquier vd., 2003).

VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 228. pozisyonda arjinin aminoasidi içermektedir. Arg228'in substrat bağlanması için pozitif yüklü bir alan sağladığı öne sürülürken Ser228'in varlığı ise açık ve dar aktif yer yarığı ile sonuçlanan bu fiziksel kısıtlamayı kaldırır. Nispeten, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin meropeneme karşı yüksek afinite göstermesi Arg228 tarafından tanımlanan aktif bölge boşluğu içine piperazin halkasının daha iyi uyması nedeniyle olabilir.

Ayrıca VIM-2 enziminde bulunan Try224' ün seftazidim gibi substratları stabilize ettiği ileri sürülmektedir. Bu aminoasidin varlığı nedeniyle VIM-2 enzimi VIM-1 enzimine göre seftazidime karşı daha fazla afinite göstermektedir. Bunların aksine Leu224 bulunduran VIM-26 ve VIM-13 enzimlerinin kinetik çalışmasında olduğu gibi VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin sefalosporinaz aktivitelerinde önemli bir düşüş görülmemiştir. Bu değişiklikler şüphesiz farklı VIM grupları arasında farklı substratlar için afiniteyi etkilemektedir.

Genel olarak, VIM varyantları β -laktam substratlara karşı katalitik etkinliklerinde minimal farklılıklar göstermiştir. Özellikle VIM-5 ve VIM-38'in çok benzer kinetik parametrelere sahip oldukları görüldü ve çoğu durumda VIM-1 ve VIM-2 ile karşılaştırıldığı zaman VIM-1 ve VIM-2 enzimlerinin sahip oldukları kinetik parametreler arasında bir aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. VIM-1 enzimi, VIM-2 enzimiyle karşılaştırıldığı zaman meropenem karşı 6 kat daha yüksek K_m değerine sahip olduğu görülmüştür. Ancak bireysel kinetik parametrelerdeki farklılıklar benzer hidrolitik verimlilikle sonuçlanan yüksek k_{cat} değerleri tarafından dengeli olmuştur. Tüm enzimler imipenem için benzer K_m değerlerine sahiptirler. Ancak, VIM-2 için k_{cat}/K_m değeri sonucu VIM-1 ile karşılaştırıldığı zaman 5 kat daha yüksektir. VIM-5 ve VIM-38 hem imipenem hem de meropenem için çok benzer hidrolitik etkinliğe sahiptirler. Nispeten ampisilin için yüksek K_m değerleri bütün varyantlar için tespit edilmiştir. Bu yüksek K_m değerinin belirlenmesi antibiyotik için nispeten düşük bir afiniteye sahip olduklarını göstermektedir. Hem düşük afinite hem de yüksek turnover oranından dolayı ampisilin VIM-1 enziminden VIM-2 ve VIM-38 için iyi bir substrattır.

Sefhalotin ve nitrosefin, tüm VIM varyantları tarafından eşit hidroliz edilmişlerdir. Diğer β -laktamlara göre en yüksek k_{cat}/K_m değerleri göstermektedirler.

VIM-5 ve VIM-38 test edilen nitrosefin ve sefalosporinlerden olan sefhalotin ve sefoksitin için çok benzer kinetik parametrelere sahiptirler. VIM-1 sefoksitin için çok düşük k_{cat}/K_m değerine sahiptir ve diğer VIM varyantları ile karşılaştırıldığı zaman aralarında yaklaşık 6 kat fark vardır. VIM-5 enzimi VIM-1 enzimi ile karşılaştırıldığı zaman seftazidim için 5 kat yüksek k_{cat} değerine sahiptir fakat k_{cat}/K_m değerleri her iki enziminde aynıdır. Şaşırtıcı bir şekilde VIM-5 enzimi VIM-38 enzimi ile karşılaştırıldığı zaman seftazidim için yaklaşık 10 kat yüksek k_{cat}/K_m değerine sahip olduğu görülmüştür.

VIM varyantlarının inhibisyonunun araştırılmasında ise bazı birleşikler için varyantlar arasında farklılıklar görüldüğü tespit edilmiştir. Şimdiye kadar yapılan inhibitör araştırmalarında varyantlar arasındaki farklılıklara değil de enzim grupları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu doktora tezi kapsamında ise metallo beta laktamaz

enzim grubundan olan VIM tipi metallo beta laktamaz ailesinin farklı varyantları üzerine inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan birleşikler hidroksi piridinler ve hidroksiizokinolin aminoasit yerdeğişimlerinden meydana gelmektedir. Triptofan türevleri ile yapılan inhibisyon araştırmasında özellikle VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin en düşük residual aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Daha fazla karakterizasyon IC_{50} değerlerinin belirlenmesi ile yürütülmüştür. IC_{50} değerleri arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle bir birleşik için, VIM-5 ve VIM-38 enzimleri ile karşılaştırıldığı zaman VIM-2 enzimi 57 kat yüksek IC_{50} değerine sahiptir. İlginç bir şekilde VIM-1 enzimi test edilen birleşikler tarafından hiç inhibe edilememişken VIM-2 enzimi de sadece zayıf bir şekilde inhibe edilmiştir.

VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimleri dairesel dikroizm spektrometresi ile belirlenen çok yakın CD ve sekonder yapıya sahiptirler. Ancak proteinlerin erime sıcaklıkları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. VIM-5 ve VIM-38 enzimleri en stabil varyantlardır. VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin erime sıcaklıkları VIM-2 ile karşılaştırıldığı zaman $4^{\circ}C$ ve VIM-1 enzimi ile karşılaştırıldığında ise yaklaşık $14^{\circ}C$ fark olduğu tespit edilmiştir. Proteinler denatüre edilip ($25-95^{\circ}C$) erime sıcaklıkları belirlendikten sonra CD spektrasında $95-25^{\circ}C$ tekrar geri soğutma yapıldığında proteinlerin ilk formuna geri döndükleri belirlendi. Bu sonuç, dört enziminde çok kararlı olduğunu göstermektedir.

“Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında β -laktamaz Direnç Genlerinin Taranması ve Yeni Bir Metallo- β -laktamazın (VIM-38) Karakterizasyonu” başlıklı doktora tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-tipi metallo-beta laktamazın varlığı tespit edilmiştir
2. Yapılan klonlama ve sekans analizi çalışmalarıyla VIM-tipi metallo-beta-laktamazın yeni bir aleli tespit edilmiştir.
3. İlk defa Türkiye de *P. aeruginosa* izolatlarında GES-5 tespit edilmiştir.
4. Bu yeni alelin VIM-5'e %99 benzediği belirlenmiş ve VIM-38 olarak adlandırılmıştır.
5. VIM-5 ve VIM-38 arasında bir amino asit fark olduğu belirlenmiştir. Bu farkın 265. pozisyonda VIM-5 enziminde bulunan Alanin amino asitinin VIM-38 enziminde Valin amino asidine dönüşmesiyle oluştuğu belirlenmiştir.
6. VIM-38 metallo-beta laktamazın farklı antibiyotik gruplarına karşı MİK değerleri belirlenmiştir.
7. VIM-38 enziminin farklı antibiyotik gruplarına ait substratlara karşı kinetik parametreleri VIM-1, VIM-2 ve VIM-5 enzimleri ile karşılaştırılmıştır.
8. VIM-38 metallo beta laktamaz enziminin karbapenem grubu antibiyotikleri iyi hidroliz ettiği görülmüştür. VIM-38' sefalosprirlere karşı yüksek afinite gösterirken penisilin grubu antibiyotiklerden olan ampisiline karşı çok düşük afinite gösterdiği tespit edilmiştir.
9. VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimlerinin inhibisyonun araştırılmasında 56 farklı bileşik kullanılarak yapılmış ve farklı bileşiklerin enzimler üzerinde farklı inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir.
10. VIM-1, VIM-2, VIM-5 ve VIM-38 enzimleri sekonder yapıları ve erime sıcaklıkları belirlenmiştir.

5. ÖNERİLER

Dünya genelinde karbapenem üreten suşların yayılması, büyük bir endişe oluşturmaktadır. Özellikle metallo-beta-laktamazların son yıllarda ortaya çıkması bu kaos ortamını daha da artırmaktadır. Metallo beta laktamazlar, karbapenemler de dahil olmak üzere, tüm beta laktam antibiyotikleri (aztreonam hariç) hidroliz edebilirler. Bu nedenle bu enzimlerin karakteristik özelliklerinin ortaya konması ve diğer alleleri ile benzerlik ve farklılıklarının karşılaştırılması, halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Özellikle metallo beta laktamaz ailesinin en büyük gruplarından biri olan VIM-tipi metallo beta laktamaz enzimleri üzerine, daha fazla araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bu bağlamda VIM-varyantlarında bazı antibiyotiklere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarında değişime sahip olanların, yine aynı antibiyotiklere karşı kinetik parametreleri belirlenebilir. VIM-varyantları korunmuş bölge üzerinde nokta mutasyonları yapılarak, farklı antibiyotik gruplarına karşı kinetik parametrelerdeki değişimler gözlenebilir. Yeni alel olan VIM-38 enziminin üç boyutlu yapısı, kristalografik yöntemler ile çalışılabilir. Ayrıca aminoasit değişimlerinin farklı substratlara karşı afinite üzerine etkileri moleküler modelleme yöntemiyle belirlenerek, kinetik analiz sonuçları ve MİK değerleriyle karşılaştırılabilir.

Bu doktora tezinde 56 farklı birleşik kullanılarak, VIM ailesinin 4 farklı enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Yine farklı doğal veya sentetik birleşikler kullanılarak VIM varyantları üzerinde inhibisyon çalışmalarına devam edilebilir. VIM varyantları üzerinde inhibisyon etkisinin gözlemlendiği muhtemel inhibitörler seçilerek, diğer metallo-beta-laktamazlar üzerinde inhibisyon etkisinin olup olmayacağı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, E.P., Chain, E., 1988.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, 1940. *Reviews of infectious diseases*, 10, 677-8.
- Albersschonberg, G., vd., 1978.** Structure and Absolute-Configuration of Thienamycin. *Journal of the American Chemical Society*, 100, 6491-6499. DOI: 10.1021/ja00488a038
- Allen, H.K., vd., 2010.** Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews Microbiology*, 8, 251-9. DOI: 10.1038/nrmicro2312
- Ambler, R.P., 1980.** The structure of β -lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289, 321-31.
- Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R.G., 2004.** Rossolini M and Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 282-283.
- Bebrone, C., 2007.** Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical pharmacology*, 74, 1686-701.
- Bebrone, C., Bogaerts, P., Delbrück, H., Bennink, S., Kupper, M.B., Rezende, de C.R., Glupczynski, Y., Hoffmann, K.M., 2013.** GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 396-401. DOI: 10.1128/AAC.01784-12.
- Bharadwaj, R., Joshi, S., Dohe, V., Gaikwad, V., Kulkarni, G., Shouche, Y., 2012.** Prevalence of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-positive bacteria in a tertiary care centre in Pune, India. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, 265-266. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.027
- Bogaerts, P., Verroken, A., Jans, B., Denis, O., Glupczynski, Y., 2010.** Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase1. *The Lancet Infectious Diseases*, 12, 831 - 832. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70278-4
- Bonnin, R.A., Rotimi, V.O., Al Hubail, M., Gasiorowski, E., Al Sweih, N., Nordmann, P., Poire, L., 2013.** Wide dissemination of GES-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in Kuwait. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 183-188. DOI: 10.1128/AAC.01384-12
- Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M., Page, M.I., 1998.** The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent β -lactamase. *The Biochemical journal*, 331, 703-11.

- Bounaga, S., Galleni, M., Laws, A.P., Page, M.I., 2001.** CysteinyI peptide inhibitors of *Bacillus cereus* zinc β -lactamase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2, 503-10.
- Brink, A. J., Coetzee, J., Clay, C. G., Sithole, S., Richards, G. A., Poirel, L., Nordmann, P., 2012.** Emergence of New Delhi metallo-beta lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 525–527. DOI: 10.1128/JCM.05956-11
- Bryskier, A., 2005.** Antimicrobial Agents; Penicillins; Washington, DC: ASM press, 113s.
- Bryskier, A., 2005.** Antimicrobial Agents. Bölüm 7 (Oral Cephalosporins): 222-223s.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39, 1211-33.
- Bush, K., 1998.** Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clinical Infectious Diseases*, 1, 48-53.
- Bush, K. and Jacoby, G.A., 2010.** Updated functional classification of β - lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 969-76. DOI: 10.1128/AAC.01009-09
- Bush, K. and Fisher, J.F., 2011.** Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annual review of microbiology*, 65,455-78. DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102911
- Cao, V.T., Arlet, G., Ericsson, B.M., Tammelin, A., Courvalin, P., Lambert, T., 2000.** Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46, 895-900.
- Carenbauer, A.L., Garrity, J.D., Periyannan, G., Yates, R.B., Crowder, M.W., 2002.** Probing substrate binding to metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* by using site-directed mutagenesis. *BMC biochemistry*, 3,4.
- Carfi, A., Pares, S., Duée, E., Galleni, M., Duez, C., Frère, J.M., Dideberg, O., 1995.** The 3-D structure of a zinc metallo- β -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *The EMBO journal*, 14, 4914-21.
- Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., Walsh, T. R., 2004.** Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48, 4654-61.

- Castanheira, M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Mathai, D., Jones, R.N., 2009.** Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo- β -lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53,1225–1227. DOI: 10.1128/AAC.01011-08.
- Chain, E.F., Hardner, H.W., Heatley, A.D., Jennings, N.G., Orr-Ewing, M.A., Sanders, A.G., 1940.** Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The Lancet*, 239, 226-228.
- Chantalat, L., Duée, E., Galleni, M., Frère, J.M., Dideberg, O., 2000.** Structural effects of the active site mutation cysteine to serine in *Bacillus cereus* zinc- β -lactamase. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 9, 1402-6.
- Chen, Z., vd., 2011.** Coexistence of blaNDM-1 with the prevalent bla_{OXA-23} and bla_{IMP} in pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *Clinical Infectious Diseases*, 52, 692–693. DOI: 10.1093/cid/ciq231
- Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., Yu, Y., 2011.** Emergence of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1255–1259. DOI: 10.1093/jac/dkr082
- Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y., Sandalli, C., 2013a.** OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, DOI: 10.1111/1469-0691.12338.
- Çiçek, A.Ç., Düzgün, A.Ö., Saral, A., Kayman, T., Çizmeci, Z., Balcı, P.Ö., Dal, T., Fırat, M., Tosun, İ., Altıntop, Y.A., Çalışkan, A., Yazıcı, Y., Sandallı, C., 2013b.** Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3,743-7. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60149-5
- Concha, N.O., Rasmussen, B.A., Bush, K., Herzberg, O., 1996.** Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure*, 4, 823-36.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, G.M., 2011.** Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet infectious diseases*, 11, 381-93. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70056-1
- Crisp, J., Connors, R., Garrity, J.D., Carenbauer, A.L., Crowder, M.W., Spencer, J., 2007.** Structural basis for the role of Asp-120 in metallo- β -lactamases. *Biochemistry*, 46, 10664-74.
- Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y., Toh, H., 2001.** Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS letters*, 503,1-6.

- Davies, R.B. and Abraham, E.P., 1974.** Metal cofactor requirements of β -lactamase II. The Biochemical journal, 143, 129-35.73
- Davies, J. and Davies, D., 2010.** Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and molecular biology reviews, MMBR, 74,417-33.DOI: 10.1128/MMBR.00016-10
- Demain, A.L. and Elander, R.P., 1999.** The β -lactam antibiotics: past, present, and future. Antonie van Leeuwenhoek, 75, 5-19.
- de Lencastre, H., Oliveira, D., Tomasz, A., 2007.** Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. Current opinion in microbiology, 10, 428-35.
- Docquier, J.D., Lamotte-Brasseur, J., Galleni, M., Amicosante, G., Frère, J.M., Rossolini, G.M., 2003.** On functional and structural heterogeneity of VIM type metallo- β -lactamases. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 51, 257-66.
- Docquier, J.D., Benvenuti, M., Calderone, V., Stoczko, M., Menciassi, N., Rossolini, G.M., Mangani, S., 2010.** High-resolution crystal structure of the subclass B3 metallo- β -lactamase BJP-1: rational basis for substrate specificity and interaction with sulfonamides. Antimicrobial agents and chemotherapy, 54, 4343-51. DOI: 10.1128/AAC.00409-10
- Espinal, P., Fugazza, G., Lo'pez, Y., Kasma, M., Lerman, Y., Malhotra- Kumar, S., Goossens, H., Carmeli, Y., Vila, J., 2011.** Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55, 5396-5398. DOI: 10.1128/AAC.00679-11
- Essack, S.Y., 2001.** The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. Pharmaceutical Research, 18, 1391-1399.
- EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, 2000.** Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 6,503-8.
- Fabiane, S.M., Sohi, M.K., Wan, T., Payne, D.J., Bateson, J.H., Mitchell, T., Sutton, B.J., 1998.** Crystal structure of the zinc-dependent β -lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution: binuclear active site with features of a mononuclear enzyme. Biochemistry, 37, 12404-11.
- Faridoon, Hussein, W.M., Vella, P., Islam, N.U., Ollis, D.L., Schenk, G., McGeary, R.P., 2012.** 3-mercapto-1,2,4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides as metallo- β -lactamase inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 22, 380-6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.10.116

- Fast, W., Wang, Z., Benkovic, S.J., 2001.** Familial mutations and zinc stoichiometry determine the rate-limiting step of nitrocefin hydrolysis by metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry*, 40, 1640-50.
- Felici, A., Amicosante, G., Oratore, A., Strom, R., Ledent, P., Joris, B., Fanuel, L., Frère, J.M., 1993.** An overview of the kinetic parameters of class B β -lactamases. *The Biochemical journal*, 291, 151-5.
- Fisher, J.F., Meroueh, S.O., Mobashery, S., 2005.** Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical reviews*, 105, 395-424
- Fleming, A., 1929.** On the antimicrobial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10, 226-236.
- Fonseca, F., Bromley, E.H., Saavedra, M.J., Correia, A., Spencer, J., 2011.** Crystal structure of *Serratia fonticola* Sfh-I: activation of the nucleophile in mono-zinc metallo- β -lactamases. *Journal of molecular biology*, 411, 951-9. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.06.043
- Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Dideberg, O., Frère, J.M.; Metallo-beta-lactamases Working Group., 2001.** Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45, 660-3.
- Ganta, S.R., Perumal, S., Pagadala, S.R., Samuelsen, O., Spencer, J., Pratt, R.F., Buynak, J.D., 2009.** Approaches to the simultaneous inactivation of metallo and serine- β -lactamases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 1618-22. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.02.018
- Garau, G., García-Sáez, I., Bebrone, C., Anne, C., Mercuri, P., Galleni, M., Frère, J.M., Dideberg, O., 2004.** Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48, 2347-9.
- Garau, G., Di Guilmi, A.M., Hall, B.G., 2005a.** Structure-based phylogeny of the metallo- β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 2778-84.
- Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, J.M., Dideberg, O., 2005b.** A metallo- β -lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *Journal of molecular biology*, 345, 785-95.
- Garcia-Saez, I., Mercuri, P.S., Papamicael, C., Kahn, R., Frère, J.M., Galleni, M., Rossolini, G.M., Dideberg, O., 2003.** Three-dimensional structure of FEZ-1, a monomeric subclass B3 metallo- β -lactamase from *Fluoribacter gormanii*, in native form and in complex with D-captopril. *Journal of molecular biology*, 325, 651-60.

- Garcia-Saez, I., Docquier, J.D., Rossolini, G.M., Dideberg, O., 2008.** The three-dimensional structure of VIM-2, a Zn- β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* in its reduced and oxidised form. *Journal of molecular biology*, 375, 604-11.
- Green, V.L., Verma, A., Owens, R.J., Phillips, S.E., Carr, S.B., 2011.** Structure of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1). *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 67, 1160-4. DOI: 10.1107/S1744309111029654
- Hall, B.G., Salipante, S.J., Barlow, M., 2003.** The metallo- β -lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. *Journal of molecular evolution*, 57, 249-54.
- Hall, B.G., Salipante, S.J., Barlow, M., 2004.** Independent origins of subgroup B1 + B2 and subgroup B3 metallo- β -lactamases. *Journal of molecular evolution*, 59, 133-41.70.
- Hancock, R.E., 1998.** Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27, 93-9.
- Hernandez Valladares, M., Felici, A., Weber, G., Adolph, H.W., Zeppezauer, M., Rossolini, G.M., Amicosante, G., Frère, J.M., Galleni, M., 1997.** Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo- β -lactamase activity and stability. *Biochemistry*, 36, 11534-41.
- Hiraiwa, Y., Morinaka, A., Fukushima, T., Kudo, T., 2009.** Metallo- β -lactamase inhibitory activity of phthalic acid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19, 5162-5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.07.018
- Hodgkin, D.C., 1949.** The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Advancement of science*, 6, 85-9.
- Huntley, J.J., Fast, W., Benkovic, S.J., Wright, P.E., Dyson, H.J., 2003.** Role of a solvent-exposed tryptophan in the recognition and binding of antibiotic substrates for a metallo- β -lactamase. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12, 1368-75.
- Ishii, Y., Eto, M., Mano, Y., Tateda, K., Yamaguchi, K., 2010.** In vitro potentiation of carbapenems with ME1071, a novel metallo- β -lactamase inhibitor, against metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 3625-9. DOI: 10.1128/AAC.01397-09
- Iyobe, S., Kusadokoro, H., Takahashi, A., Yomoda, S., Okubo, T., Nakamura, A., O'Hara, K., 2002.** Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 2014-6.

- Jeannot, K., Poirel, L., Robert-Nicoud, M., Cholley, P., Nordmann, P., Plésiat, P., 2012.** IMP-29, a Novel IMP-Type metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56, 2187-90. DOI: 10.1128/AAC.05838-11
- Kaase, M., Nordmann, P., Wichelhaus, T. A., Gatermann, S. G., Bonnin, R. A., Poirel, L., 2011.** NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 1260–1262. DOI: 10.1093/jac/dkr135
- Karthikeyan, K., Thirunarayan, M. A., Krishnan, P., 2010.** Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 2253–2254. DOI: 10.1093/jac/dkq273
- Kesado, T., Hashizume, T., Asahi, Y., 1980.** Antibacterial activities of a new stabilized thienamycin, N-formimidoyl thienamycin, in comparison with other antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 17, 912-7.
- Kim, Y., Tesar, C., Mire, J., Jedrzejczak, R., Binkowski, A., Babnigg, G., Sacchettini, J., Joachimiak, A., 2011.** Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1—a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase. *PloS one*, 6, 24621. DOI: 10.1371/journal.pone.0024621
- Kim, M. N., Yong, D., An, D., Chung, H. S., Woo, J. H., Lee, K., Chong, Y., 2012.** Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 1433–1436. DOI: 10.1128/JCM.06855-11
- King, D. and Strynadka, N., 2011.** Crystal structure of New Delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 20, 1484-91. DOI: 10.1002/pro.697
- Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Yasuzawa, H., Jin, W., Yamagata, Y., Arakawa, Y., 2006.** Probing, inhibition, and crystallographic characterization of metallo- β -lactamase (IMP-1) with fluorescent agents containing dansyl and thiol groups. *ChemMedChem*, 1, 969-72
- Kus, J. V., Tadros, M., Simor, A., Low, D. E., McGeer, A. J., Willey, B. M., Larocque, C., Pike, K., Edwards, I. A., 2011.** New Delhi metallo- β -lactamase-1: local acquisition in Ontario, Canada, and challenges in detection. *CMAJ* 183, 1257–1261. DOI: 10.1503/cmaj.110477
- Labuschagne Cde, J., Weldhagen, G.F., Ehlers, M.M., Dove, M.G., 2008.** Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 527–530. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.020

- Lassaux, P., vd., 2010.** Mercaptophosphonate compounds as broad-spectrum inhibitors of the metallo- β -lactamases. *Journal of medicinal chemistry*, 53, 4862-76. DOI: 10.1021/jm100213c
- Lassaux, P., vd., 2011.** Biochemical and structural characterization of the subclass B1 metallo- β -lactamase VIM-4. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 1248-55. DOI: 10.1128/AAC.01486-09
- Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., 1998.** Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4, 1584-90
- Levy, S.B. and Marshall, B., 2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10, 122-9.
- Lienard, B.M., Horsfall, L.E., Galleni, M., Frère, J.M., Schofield, C.J., 2007.** Inhibitors of the FEZ-1 metallo- β -lactamase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17, 964-8.
- Lienard, B.M., vd., 2008.** Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- β -lactamases by thiols. *Organic & biomolecular chemistry*, 6, 2282-94. DOI: 10.1039/b802311e
- Livermore, D.M., 1995.** β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, 8, 557-84.
- Majiduddin, F.K., Materon, I.C., Palzkill, T.G., 2002.** Molecular analysis of β -lactamase structure and function. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 292, 127-37.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Meric, M., Kasap, M., Gacar, G., Budak, F., Dundar, D., Kolayli, F., Eroglu, C., Vahaboglu, H., 2008.** Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. *FEMS Microbiol Lett*, 282, 214-218. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01129.x
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P.M., Van Bambeke, F., 2007.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 560-378.
- Miller, L.A., Ratnam, K., Payne, D.J., 2001.** β -lactamase-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Current opinion in pharmacology*, 1, 451-8.

- Moali, C., Anne, C., Lamotte-Brasseur, J., Gros Lambert, S., Devreese, B., Van Beeumen, J., Galleni, M., Frère, J.M., 2003.** Analysis of the importance of the metallo- β -lactamase active site loop in substrate binding and catalysis. *Chemistry & biology*, 10, 319-29.
- Morán-Barrio, J., Lisa, M.N., Costello, A.L., Peraro, M.D., Carloni, P., Bennett, B., Tierney, D.L., Limansky, A.S., Viale, A.M., Vila, A.J., 2007.** The metallo- β -lactamase GOB is a mono-Zn(II) enzyme with a novel active site. *The Journal of biological chemistry*, 282, 18286-18293.
- Murphy, T.A., Simm, A.M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Walsh, T.R., 2003.** Biochemical characterization of the acquired metallo- β -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47, 582-7.
- Murphy, T.A., Catto, L.E., Halford, S.E., Hadfield, A.T., Minor, W., Walsh, T.R., Spencer, J., 2006.** Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 provides insights into variable zinc affinity of metallo- β -lactamases. *J Mol Biol*, 357, 890-903.
- Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2008.** Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 42-52.
- Nanninga, N., 1998.** Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62, 110-29.
- Nauton, L., Kahn, R., Garau, G., Hernandez, J.F., Dideberg, O., 2008.** Structural insights into the design of inhibitors for the L1 metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Molecular Biology*, 375, 257-269.
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., Livermore, D.M., 2011.** The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*, 19, 588-95. DOI: 10.1016/j.tim.2011.09.005
- Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M.A., Walsh, T.R., 2011.** Does broad-spectrum resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment caused by Gram negative bacteria? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 689-692. DOI: 10.1093/jac/dkq520
- Orellano, E.G., Girardini, J.E., Cricco, J.A., Ceccarelli, E.A., Vila, A.J., 1998.** Spectroscopic characterization of a binuclear metal site in *Bacillus cereus* β -lactamase II. *Biochemistry*, 37, 10173-80.
- Pagniez, G., Radice, M., Amoroso, A., Famiglietti, A., Gutkind, G., Abstr. 2004.** 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstr. Washington, D. C, C1-293
- Papagiannitsis, C.C., Kotsakis, S.D., Petinaki, E., Vatopoulos, A.C., Tzelepi, E., Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., 2011.** Characterization of metallo- β -lactamase VIM-27, an A57S mutant of VIM-1 associated with *Klebsiella pneumoniae*

- ST147. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55, 3570-2. DOI: 10.1128/AAC.00238-11
- Paul-Soto, R., vd., 1999.** Mono- and binuclear Zn²⁺-β-lactamase. Role of the conserved cysteine in the catalytic mechanism. The Journal of biological chemistry, 274, 13242-9.74.
- Poirel, L., Collet, L., Nordmann, P., 2000.** Carbapenem-hydrolyzing metallo β-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. Emerg. The Journal of Infectious Diseases, 6, 84–85.
- Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., de Champs, C., Dove, M.G., Nordmann, P., 2001.** GES-2, a class A β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45,2598–2603.
- Poirel, L., Heritier, C., Nordmann, P., 2005.** Genetic and biochemical characterization of the chromosome-encoded class B β-lactamases from *Shewanella livingstonensis* (SLB-1) and *Shewanella frigidimarina* (SFB-1). The Journal of antimicrobial chemotherapy, 55, 680-5.
- Poirel, L., Carrër, A., Pitout, J.D., Nordmann, P., 2009.** Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53,2492–2498. DOI: 10.1128/AAC.00033-09
- Poirel, L., Revathi, G., Bernabeu, S., Nordmann, P., 2011.** Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. Antimicrobial agents and chemotherapy 55, 934–936. DOI: 10.1128/AAC.01247-10
- Poirel, L., Bonnin, R.A., Boulanger, A., Schrenzel, J., Kaase, M., Nordmann, P., 2012a.** Tn125-Related Acquisition of *bla*_{NDM-Like} Genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 56, 1087-9. DOI: 10.1128/AAC.05620-11
- Poirel, L., Ozdamar, M., Ocampo-Sosa, A. A., Tu" rkoglu, S., Ozer, U. G., Nordmann, P., 2012b.** NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. Antimicrobial agents and chemotherapy 56, 2784–2785. DOI: 10.1128/AAC.00150-12
- Ramirez, M.S. and Tolmasky, M.E., 2010.** Aminoglycoside modifying enzymes. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 13,151-71.
- Rasmussen, B.A. and Bush, K., 1997.** Carbapenem-hydrolyzing β-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, 41, 223-32.
- Rieber, H., Frontzek, A., von Baum, H., Pfeifer, Y., 2012.** Emergence of metallo-β-lactamases GIM-1 and VIM inmultidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine-Westphalia,Germany. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 67, 1043-5. DOI: 10.1093/jac/dkr579

- Rimrang, B., Chanawong, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Sribenjalux, P., Phumsrikaew, W., Wonglakorn, L., Kerdsin, A., Chetchotisakd, P., 2012.** Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing Enterobacteriaceae in Thailand. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 2626–2630. DOI: 10.1093/jac/dks267
- Saavedra, M.J., Peixe, L., Sousa, J.C., Henriques, I., Alves, A., Correia, A., 2003.** Sfh-I, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47,2330-3.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1987.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory,545.
- Samuelsen, O., Castanheira, M., Walsh, T.R., Spencer, J., 2008.** Kinetic characterization of VIM-7, a divergent member of the VIM metallo- β -lactamase family. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52,2905-8. DOI: 10.1128/AAC.00166-08
- Sanschagrín, F. and Levesque, R.C., 2005.** A specific peptide inhibitor of the class B metallo- β -lactamase L-1 from *Stenotrophomonas maltophilia* identified using phage display. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55, 252-5.
- Saradhi, P.N.B, 2012.** Structural and biochemical investigation of Metallo- β -lactamases; Insights into the antibiotic binding sites. *Doktora Tezi. Tromso Üniversitesi, Kimya Bölümü, Tromso, Norveç*, 88s.
- Siu, L.K., 2002.** Antibiotics: action and resistance in Gram-negative bacteria. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 35, 1-11.
- Spencer, J., Read, J., Sessions, R.B., Howell, S., Blackburn, G.M., Gamblin, S.J., 2005.** Antibiotic recognition by binuclear metallo- β -lactamases revealed by X ray crystallography. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 14439-44.
- Stein, G.E., 2005.** Antimicrobial resistance in the hospital setting: impact, trends, and infection control measures. *Pharmacotherapy*, 25, 44S- 54S.
- Stoczko, M., Frère, J.M., Rossolini, G.M., Docquier, J.D., 2006.** Postgenomic scan of metallo- β -lactamase homologues in rhizobacteria: identification and characterization of BJP-1, a subclass B3 ortholog from *Bradyrhizobium japonicum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50,1973-81.
- Sun, Q., Law, A., Crowder, M.W., Geysen, H.M., 2006.** Homo-cysteinyl peptide inhibitors of the L1 metallo- β -lactamase, and SAR as determined by combinatorial library synthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16, 5169-75.
- Sykes, R.B., vd., 1981.** Monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. *Nature*, 291, 489-91.

- Sykes, R., 2010.** The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65,1842-52. DOI: 10.1093/jac/dkq217
- Tenover, F.C., 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control*, 34, 64-73.
- Tipper, D.J. and Strominger, J.L., 1965.** Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54, 1133-41.
- Todar, K., 2012.** Online Text Book of Bacteriology. p. 2.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., 2006.** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 70, 296-316.
- Toney, J.H., vd., 1998.** Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase. *Chemistry & biology*, 5, 185-96.
- Toney, J.H., vd., 2001.** Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo- β -lactamase. *The Journal of biological chemistry*, 276, 31913-8.
- Toney, J.H., 2003.** Metallo- β -lactamase inhibitors: could they give old antibacterials new life? *Current opinion in investigational drugs*, 4, 115-6.
- van Heijenoort, J., 2001.** Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 11, 25-36.
- Vanhove, M., vd., 2003.** Role of Cys221 and Asn116 in the zinc-binding sites of the *Aeromonas hydrophila* metallo- β -lactamase. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 60, 2501-9.
- Wachino, J., vd., 2011.** SMB-1, a novel subclass B3 metallo- β -lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55,5143-9. DOI: 10.1128/AAC.05045-11
- Waksman, S.A. and Flynn, J.E., 1973.** History of the word 'antibiotic'. *Journal of the history of medicine and allied sciences*, 28, 284-6.
- Walsh, C., 2000.** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406, 775-781.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P., 2005.** Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 306-25.

- Walsh, T.R., 2010.** Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*, 36, 8-14. DOI: 10.1016/S0924-8579(10)70004-2
- Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A., 2011.** Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases*, 11, 355-62. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7
- Wang, Z., Fast, W., Valentine, A.M., Benkovic, S.J., 1999.** Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Current opinion in chemical biology*, 3, 614-22.72.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1991.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35, 147-51.
- Wilson, M.E. and Chen, L.H., 2012.** NDM-1 and the Role of Travel in Its Dissemination. *Current infectious disease reports*, 14, 213-26. DOI: 10.1007/s11908-012-0252-x
- Wright, G.D., 2005.** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57, 1451-70.
- Yamaguchi, Y., vd., 2007.** Crystallographic investigation of the inhibition mode of a VIM-2 metallo- β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* by a mercaptocarboxylate inhibitor. *Journal of medicinal chemistry*, 50, 6647-53.
- Yamaguchi, Y., vd., 2010.** Structure of metallo- β -lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65-Å resolution. *Journal of biochemistry*, 147, 905-15. DOI: 10.1093/jb/mvq029
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., 2009.** Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 5046-54. DOI: 10.1128/AAC.00774-09
- Zamorano, L., Moyá, B., Juan, C., Oliver, A., 2010.** Differential β -lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65, 1540-2. DOI: 10.1093/jac/dkq142
- Zhanel, G.G., vd., 2007.** Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67, 1027-1052.
- Zhang, H., and Hao, Q., 2011.** Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25, 2574-82. DOI: 10.1096/fj.11-18403

EKLER

Ek1. VIM-38'in diğer VIM enzimleri ile aminoasit düzeyinde karşılaştırılması

VIM-1	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-35	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-34	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-32	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-33	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-27	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHISTQ	60
VIM-37	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHISTQ	60
VIM-26	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-28	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-4	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-14	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSSEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-19	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-29	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-5	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-38	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-25	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-12	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-8	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-9	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-16	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWLHIATQ	60
VIM-2	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-3	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATK	60
VIM-6	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATR	60
VIM-11	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-18	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATR	60
VIM-36	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATR	60
VIM-23	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-24	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-15	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-10	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-17	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-30	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-20	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-31	MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ	60
VIM-13	MLKVISSLLFYMTASLMAVASPLAHSGESRGEYPTVSEIPVGEVRLYQIDDDGVWSHIATH	60
VIM-7	-MFQIRSFVVGISAFVMAVLGSAAYSAQPGEYPTVDDIPVGEVRLYKIGDGVWSHIATQ	59
	: : .* : :* :** : .. *.* :. .*****.:*****:* **** **:*	
VIM-1	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-35	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-34	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAISTHFHDDR	120
VIM-32	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-33	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-27	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-37	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-26	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120
VIM-28	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR	120

VIM-4 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-14 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-19 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-29 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-5 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-38 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-25 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-12 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-8 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-9 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-16 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-2 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-3 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-6 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-11 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-18 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-36 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-23 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-24 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-15 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-10 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-17 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-30 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-20 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-31 SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR 120
VIM-13 TFDGVVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGKNTVALLAEIEKQIGLPVTRSVSTHFHDDR 120
VIM-7 KLGDTVYSSNGLIVRDADELLIDTAWGAKNTVALLAEIEKQIGLPVTRISSTHFHDDR 119
. ** . ***** . ***** : *** . ***** : *****
VIM-1 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-35 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-34 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-32 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-33 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-27 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-37 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-26 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-28 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-4 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-14 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-19 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-29 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-5 GGVDVLRKAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-38 GGVDVLRKAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-25 GGVDVLRKAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-12 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-8 GGVDVLRAGVATYASPSARRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-9 GGVDVLRAGVATYASPSIRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-16 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-2 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180
VIM-3 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGSEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-6 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGSEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-11 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGSEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-18 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLA---NEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 176

VIM-36 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-23 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-24 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-15 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-10 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-17 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-30 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-20 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-31 GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-13 GGVDALRAAGVATYASPSTRRLAEAEVNEVPTHSEGLSSSGDAVRFGPVVELFYPGAHS 180

VIM-7 GGVDVLRAGVATYTSPLTRQLAEAEAGNEVPAHSLKALSSSGDVVRFGPVVEVFYPGAHS 179

****.* * *****:* * :* * .*:*:***:.*****.*****:*****

VIM-1 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-35 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVTDADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-34 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-32 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-33 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-27 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-37 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-26 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVLELSSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-28 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVLELSRTSAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-4 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-14 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-19 TDNLVVYVPSAKVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-29 TDNLVVYVPSAKVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKRYPEAEVVIIPGH 240

VIM-5 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVLALSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-38 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVLALSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-25 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVLALSTSTAGNVADADLAEWPTSVERIQKHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-12 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-8 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-9 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-16 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-2 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-3 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-6 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-11 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-18 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 236

VIM-36 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-23 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-24 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSLTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-15 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-10 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQYVIIPGH 240

VIM-17 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-30 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIIPGH 240

VIM-20 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQRYPEAQFVIIPGH 240

VIM-31 TDNLVVYVPSASVLYGGCAIHELSTSTAGNVADADLAEWPTSIERIQRYPEAQFVIIPGH 240

VIM-13 TDNLVVYVPSANVLYGGCAVLELSRTSAGNVADADLAEWPGSVERIQQHYPEAEVVIIPGH 240

VIM-7 GDNLVVYVFAVRVLFGGCAVHEASRESAGNVADANLAEWPATIKRIQRYPEAEVVIPGH 239
 *****: . **:****: * *****:**:***** ::****:*****: *****

VIM-1 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-35 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-34 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-32 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-33 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-27 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-37 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-26 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-28 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-4 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-14 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-19 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-29 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-5 GLPGGLDLLQHTANVVTAHKNRSVAE 266
 VIM-38 GLPGGLDLLQHTANVVTAHKNRSVVE 266
 VIM-25 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-12 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-8 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-9 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-16 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-2 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-3 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-6 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-11 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-18 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 262
 VIM-36 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-23 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-24 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-15 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-10 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-17 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-30 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-20 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-31 GLPGGLDLLKHTTNVVKAHKNRSVVE 266
 VIM-13 GLPGGLDLLQHTANVVKAHKNRSVAE 266
 VIM-7 GLPGGLELLQHTTNVVKTHKVRPVAE 265
 *****:**:****: .* .*.*

ÖZGEÇMİŞ

Azer ÖZAD DÜZGÜN 16/07/1985 tarihinde Kars'da doğdu. İlk öğretimini 1999 yılında Kars ili Halitpaşa İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2003 yılında Kars ilinde Cumhuriyet (YDA) Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında başladığı lisans eğitimini 28/07/2008 tarihinde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2008 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'da Yüksek lisans öğrenimine başladı 2009-2010 yılları arasında Avrupa Birliği ERASMUS Öğrenci Değişimi Programı kapsamında Polonya'nın Jagiellonian Üniversitesi'nde bulundu. 2010 yılında Yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Yine aynı yıl Kars Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'da Doktora öğrenimini başladıktan bir yıl sonra Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'na yatay geçiş yaptı. TÜBİTAK 2214-A - Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında 07/09/2014-07/03/2015 tarihleri arasında 6 aylık süreyle Oxford Üniversitesi, Kimya Araştırma Laboratuvarında bulundu. 2011/2013 yılları arasında Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. 2013 yılı Haziran ayından beri Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Orta seviyede İngilizce bilen Azer ÖZAD DÜZGÜN evlidir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;

Görev Aldığı Projeler:

1. NDM-1 Metallo-Beta-Laktamazlarda Alelik Değişimlere Yol Açan Amino Asitlerin Mutasyonel Analizi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/BAP-2014.102.03.03. 2014-2016.
2. GES tipi beta laktamazlarda varyasyonlara neden olan ve serin A beta laktamazlarda (TEM, SHV) korunmuş bazı aminoasitlerin katalitik aktiviteye etkilerinin araştırılması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/BAP-2014.102.03.02. 2014-2016.
3. Yeni Metallo- β -laktamaz Gen Varyantı VIM-38'in Biyokimyasal Karakterizasyonu ve Bazı Korunmuş Amino Asitlerin Mutasyonel Analizi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/BAP-2013.102.03.13. 2013-2015.

4. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'lerde Sınıf 1, 2, 3 İntegron gen Kasetlerinin Taranması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi.
BAP 2012.106.01.11. 2012.

SCI-SCIE-AHCI Kapsamındaki Makaleleri:

Iraz, M., Duzgun, A.O., Cicek, A.C., Bonnin, R.A., Ceylan, A., Saral, A., Nordmann, P., Sandalli, C., 2014. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*,78(3),292-294.

Cicek, A.C., Duzgun, A.O., Saral, A., Sandalli, C., 2014. Determination of a novel integron-located variant (*bla*_{OXA-320}) of Class D β -lactamase in *Proteus mirabilis*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10),1030-1035.

Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y., Sandalli, C., 2013. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, DOI: 10.1111/1469-0691.12338.

Copur, Cicek, A., Saral, A., Ozad, Duzgun, A., Yasar, E., Cizmeci, Z., Ozlem, Balci, P., Sari, F., Firat, M., Altintop, Y.A., Ak, S., Caliskan, A., Yildiz, N., Sancaktar, M., Esra, Budak, E., Erturk, A., Birol, Ozgumus. O., Sandalli, C., 2013. Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *The Journal of Antibiotics*, 66(11), 647–650.

Cicek, A.Ç., Saral, A., Duzgun, A.O., Cizmeci, Z., Kayman, T., Balci, P.O., Dal, T., Firat, M., Yazici, Y., Sancaktar, M., Ozgumus, O.B., Sandalli, C., 2013. Screening of Class 1 and Class 2 Integrons in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Collected from Seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. *Open Journal of Medical Microbiology*,3,227–233.

Çiçek, A.Ç., Düzgün, A.Ö., Saral, A., Kayman, T., Çizmeci, Z., Balcı, P.Ö., Dal, T., Firat, M., Tosun, İ., Altıntop, Y.A., Çalışkan, A., Yazıcı, Y., Sandallı, C., 2013. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3,743-7. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60149-5.

Katıldığı Kongreler;

Duzgun, A.O., Sandalli, C., Saral, A., 2014. The New Alleles of Beta-Lactamases from Turkey in 2013. British Society for Antimicrobial Chemotherapy Antibiotic Resistance Mechanisms Workshop For Researchers, 27 - 28 November, Holiday Inn Birmingham City Centre.

Duzgun, A.O., Sandalli, C., Çiçek A.C., 2014. ‘NDM-1 Tipi Metallo-β-Laktamaz Enziminin Mutasyonel Analizi’ 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 18-20 Nisan, İstanbul, Türkiye.

Duzgun A.O., Sandalli C., Çiçek A.C., ‘VIM-38 Tipi Metallo-β-Laktamaz Enziminin Molekuler Karakterizasyonu ve Mutasyonel Analizi’, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 18-20 Nisan 2014, İstanbul, Türkiye.

Duzgun A.O., Sandalli C., Iraz M., Saral A., Calık F., Cicek A.C. ‘Klebsiella pneumoniae Kökenli blaOXA-48 Genine Ait Yeni Bir Alelin Belirlenmesi’, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 18-20 Nisan 2014, İstanbul, Türkiye.

Duzgun A.O., Sandalli C., Saral A., Cicek A.C., Iraz M., Özgümüş O.B. ‘Klebsiella pneumoniae Suslarında Sinif I ve Sinif II Integronların Molekuler Karakterizasyonu’, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 18-20 Nisan 2014, İstanbul, Türkiye.

Iraz M., Duzgun A.O., Doymaz M.Z., Sandalli C., Akkoyunlu Y., Saral A., Özgümüş O.B., Cicek A.C., ‘Çoklu İlaç Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında NDM-1, OXA-48, TEM, SHV ve CTX-M Genlerinin Prevalansı ve Türkiye’de *bla*_{TEM-166} Geninin Tespiti’, 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 10-13 Kasım 2013, Antalya, Türkiye.

Cicek A.C., Saral A., Duzgun A.O., Yasar E., Cizmeci Z., Balci P.O., Sari F., Firat M., Altıntop Y.A., Ak S., Caliskan A., Yildiz N., Sancaktar M., Sandalli C., ‘A Multicenter Study of Escherichia Coli Producing Extended-Spectrum β-Lactamases (TEM, SHV and CTX-M) from Turkey’, The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May 2013, Tirana, Albania.

Iraz M., Duzgun A.O., Cicek A.C., Bonnin R.A., Ceylan A., Saral A., Nordmann P., Sandalli C., ‘A Novel VIM-38 Variant and the First Detection of GES-5 Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* from Bezmialem Vakıf University, Turkey’, The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May 2013, Tirana, Albania.

Cicek A.C., Duzgun A.O., Saral A., Sandalli C., ‘Determining of a Novel Integron-Located *bla*_{OXA-1-Like} Variant of Class D β-Lactamases in *Proteus mirabilis*’, The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May 2013, Tirana, Albania.

Cicek A.C., Saral A., Iraz M., Ceylan A., Duzgun A.O., Peleg A.Y., Sandalli C., ‘GES- and OXA-type β-Lactamases Predominate in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates from a Turkish University Hospital’, The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May 2013, Tirana, Albania.

- Cicek A.C., Saral A., Özad A., Cizmeci Z., Kayman T., Balci P.O., Dal T.,Firat M., Caliskan A., Yazıcı Y., Sancaktar M., Özgümüş O.B.,Sandalli C.,** “Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen 261 *Pseudomonas aeruginosa* Suşunda Sınıf I ve II İntegronların Moleküler Karakterizasyonu”, XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Kuőadası – Aydın, Turkey.
- Cicek A.C., Özad A., Saral A., Kayman T., Cizmeci Z., Balci P.O.,Firat M., Tosun I.,Altıntop Y.A., Caliskan A., Yazıcı Y., Sandalli C.,** “Türkiye’nin Farklı İllerindeki Hastanelerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Sınıf I ve Sınıf II İntegronların Moleküler Karakterizasyonu”, XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Kuőadası – Aydın, Turkey.
- Gültepe M.,Özad A., Makbul S. and Coőkunçelebi K.,** “Relationships based on nrDNA ITS region in some endemic Scorzonera L. (Asteraceae) Taxa from Turkey.”, International symposium on Biology of rare and endemic plant species, 2010, Fethiye, Turkey.
- Gültepe M, Özad A., Coőkunçelebi K, Makbul S, Sandallı C.,** “Bazı Scorzonera L. (Asteraceae) Taksonlarının nrDNA ITS Dizilerine Dayalı Karşılaştırılması.” 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 2010, Denizli.
- Tuleja M., Zeren Y., Ozad A., Konieczny R., Plachno B.J.,** “In vitro response of sunflower immature zygotic embryos to ethylene inhibitors.” Abstracts of XXIX Conference on Embryology Plants, Animals, Humans, May 19-21, 2010, Torun - Ciechocinek, Poland. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 52, Suppl. 1, p. 94., <http://versita.metapress.com/content/122154>.