

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Acinetobacter baumannii* KÖKENLİ BETA-LAKTAMAZ OXA-23  
GENİNİN KLONLANMASI VE ENZİM KARAKTERİZASYONU**

SİNEM TOROL

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Biyofizik Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ-2008

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Acinetobacter baumannii* KÖKENLİ BETA-LAKTAMAZ OXA-23  
GENİNİN KLONLANMASI VE ENZİM KARAKTERİZASYONU

SİNEM TOROL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAELİ

2008

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Acinetobacter baumannii* KÖKENLİ BETA-LAKTAMAZ OXA-23  
GENİNİN KLONLANMASI VE ENZİM KARAKTERİZASYONU**

SİNEM TOROL

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Biyofizik Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: YARD. DOÇ. DR. MURAT KASAP

KOCAELİ

2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Ünvanı Adı SOYADI İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI İMZA

Üye Ünvanı Adı SOYADI İMZA

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

../../2008

Prof. Dr. Ümit Biçer  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

*Acinetobacter baumannii* yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla izole edilen klinik önemi olan fırsatçı bir patojendir. *Acinetobacter* türlerinde görülen karbapenem direnci çoğu kez karbapenem hidroliz eden beta-laktamaz (karbapenemaz) genlerinin varlığı ve yaygınlığı ile alakalıdır. *Acinetobacter*'lerde karbapenem direncine sebep olan OXA-23 (ARI-1) bir karbapenemaz olup 1985'te İskoçya'da tanımlanmış daha sonra dünyanın birçok bölgesinde tespit edilmiştir. Kocaeli Üniversitesi yoğun bakım ünitesinde salgın etkeni *Acinetobacter baumannii* türü izolatlarda *bla*<sub>OXA-23</sub> geni klonlanarak tespit edilmiştir. *bla*<sub>OXA-23</sub> geni ve bu genin flanking bölgeleri tespit edilen bu klona pAc-KOU1 adı verilmiştir. Yapılan dizi analizinde genin IS*Aba1* transpozonu üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu güne kadar dünyanın çeşitli bölgelerinde *bla*<sub>OXA-23</sub> geni tanımlanmasına karşın bu genin ürünü olan OXA-23 enzimi saflaştırılmamış ve kinetik özellikleri belirlenmemiştir. Bu çalışmada OXA-23 enzimini aktif halde saflaştırmak ve kinetik parametrelerini tanımlamak istedik. Ön denemeler OXA-23'ün klasik protein saflaştırma metodları olan amonyum sülfat çöktürmesi, sıcaklık inaktivasyonu ve iyon değiştirici kromatografi ile saflaştırılamayacağını gösterdi. Bu nedenle OXA-23 füzyonla *E.coli* maltoz bağlama proteinine eklendi ve tek adımda amiloz kolon maddesi üzerinden saflaştırıldı. Saf protein ile imipenem, meropenem, sefepim, seftazidim, ampisilin, piperasilin, penisilin G ve nitrosefin hidrolizi çalışıldı. Aynı zamanda klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonları belirlendi. OXA-23 enziminin yüzey yük dağılımı, füzyon haldeki konformasyonu ve topolojik özellikleri enzimin kendine has özelliklerinin ortaya çıkarılması için yapılan bir model üzerinde incelendi.

**Anahtar sözcükler:** *Acinetobacter*, beta-laktamaz, OXA-23'ün saflaştırılması, enzim kinetiği

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* is the most common isolated opportunistic pathogen that is frequently involved in outbreaks of infection. Carbapenem resistance which are observed in *Acinetobacter spp.* is mostly related to carbapenem hydrolyzing beta-lactamase genes and their prevalence. OXA-23 (ARI-1) responsible for carbapenem resistance in *Acinetobacter spp.* was first described in Scotland in 1985 and then isolated in many other parts of the world. *bla*<sub>OXA-23</sub> gene and its' flanking region was detected by cloning in *Acinetobacter baumannii* isolated from Kocaeli University intensive care unit. The clone was named pAc-KOU1. Sequence analysis showed that this gene is located on IS*AbaI* transposon. Although *bla*<sub>OXA-23</sub> is defined in many parts of the world, the enzyme has not been purified. We, thus, aimed to purify and characterize of OXA-23 protein and determine its kinetic properties. Preliminary results showed that classic protein purification methods including ammonium sulphate precipitation, heat inactivation and ion exchange chromatography were not efficient for purification of OXA-23. Therefore, *bla*<sub>OXA-23</sub> gene was cloned into pMal-c4x to fuse the enzyme with maltose binding protein in *E. coli*. Recombinant protein was purified in a single step. Pure protein was used for imipenem, meropenem, cefepime, ceftazidime, ampicillin, piperacillin, penicillin G and nitrocefin hydrolysis. Also clavulanic acid, tazobactam and sulbactam concentration that inhibit 50 % of OXA-23 enzyme activity was calculated. Modelling of OXA-23 revealed its ionic surface structure, conformation in the fused form and its topology.

**Key words:** *Acinetobacter spp.*, beta-lactamase, OXA-23 purification, enzyme kinetics

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleŐtirilmesinde, baŐlangıcından sonuna kadar, gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, karŐılaŐtıđım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım, gerek maddi ve gerekse manevi desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Murat Kasap'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Lisans sonrası eğitim hayatımda önemli bir yeri olan ve bana araştırma olanağı sağlayan, görüŐ ve düşünceleri ile bana farklı bir bakıŐ açısı kazandıran değerli hocam Sayın Prof. Dr. Haluk Vahaboğlu'na teşekkür ederim.

Bende emeği bulunan Sayın Yard. Doç Dr. Gülçin Gacar'a minnet duygularımı sunmak isterim.

Varlığı ile yanımda olamasa da her zaman kalbimde olacak canım annem Őükran Torol'a, babam Cihangir, kardeŐlerim Cem, YeŐim ve Taylan Torol'a desteklerinden ve sevgilerinden dolayı teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. <i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri .....	2
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	3
2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> Çoklu Direnç Mekanizması .....	3
2.4. Gram Negatif Bakteri Hücre Duvar Yapısı ve Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP) .....	4
2.5. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları .....	6
2.5.1. Doğal Direnç.....	6
2.5.2. Çapraz Direnç .....	7
2.5.3. Kazanılmış Direnç.....	7
2.6. Beta-laktam Antibiyotikleri.....	7
2.7. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	9
2.7.1. Penisilin Bağlayan Protein (PBP) Değişiklikleri .....	9
2.7.2. Dış Zar Proteinindeki Değişiklikler .....	9
2.7.3. Beta-Laktamazlar .....	10
2.8. D grubu Beta-laktamazlar (OXA-ailesi) .....	13
2.8.1. OXA Tip Beta-laktamazların Alt Grupları.....	14
2.8.2. OXA Tip Karbapenemazları Kodlayan Genlerin Genetik Çevresi.....	15
2.8.3. OXA Tip Karbapenemazların Orijini.....	16
2.8.4. OXA Tip Karbapenemazların Biyokimyası.....	16
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER .....	19
3.1. Besiyerlerin Hazırlanması .....	19
3.1.1. Mueller-Hilton (MH) Agar.....	19
3.1.2. Sıvı Besiyeri.....	19
3.1.3. Antibiyotikli Besiyeri.....	19
3.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması .....	20
3.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	21
3.4. İşlenmemiş Protein Çözeltisinin Hazırlanması .....	22
3.5. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	22
3.6. pAc-KOU1 (Erişim numarası: EF120622) Vektöründen Eksprese Edilen OXA-23 Enziminin Saflaştırılması .....	23
3.6.1. Sıcaklık ile Enzim İnaktivasyonu.....	23
3.6.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	23
3.6.3. Diyaliz.....	24



3.6.4. İyon Değişirici Kromatografi .....	24
3.6.5. HiTrap Q (anyon) HP 5 ml İyon Değişirici Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma .....	24
3.6.6. HiTrap S (Katyon) HP 5 ml İyon Değişirici Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma .....	25
3.7. <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> Geninin pMal-c4x Vektörüne Sub-klonlanma Aşamaları .....	26
3.7.1. Alkali Lizis Metodu ile Plazmit DNA İzolasyonu .....	26
3.7.2. Sub-klonlama ile <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> 'ün pMal-c4x'e aktarımı .....	26
3.7.3. PZR Ürününün Agaroz Jelden İzolasyonu .....	27
3.7.4. İzole Edilen PZR Ürününün ve MBP'yi Kodlayan pMal-c4x Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Kesimi .....	28
3.7.5. Fenol-Kloroform Temizlemesi .....	28
3.7.6. Ligasyon Reaksiyonu .....	29
3.7.7. Elektroporasyon .....	29
3.7.8. Rekombinant Vektörü İçeren Koloninin Tespiti .....	29
3.7.9. <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> Geninin pMal-p4x Vektörüne Klonlanması .....	29
3.7.10. MBP-OXA23 Füzyon Proteininin Saflaştırması .....	30
3.7.11. MBP-OXA-23 Füzyon Proteininin Faktör-Xa ile Kesimi .....	30
3.8. Protein Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) .....	31
3.8.1. Solüsyonlar .....	31
3.8.2. Sabitleştirici, Boyama ve Boya Uzaklaştırıcı Solüsyonlar .....	31
3.8.3. Ayırma Jeli ( % 12 ) .....	31
3.8.4. Yükleme Jeli ( % 4 ) .....	32
3.9. OXA-23'ün Kinetik Ölçümleri .....	33
3.10. OXA-23 Modelleme Çalışmaları .....	34
3.11. Farklı Klonların Nitrosefin Aktivitelerine Bağlı Ünite Tanımlanması, Bu Ünitelerin Eşitlenmesi ve IPM ve MEM Aktiviteleri .....	35
4. SONUÇLAR .....	36
4.1. Sıcaklık Uygulaması ile Saflaştırma .....	36
4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	36
4.3. Anyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma .....	37
4.4. Katyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma .....	39
4.5. Kontrol Deneyi-VIM5'in Saflaştırılması .....	41
4.6. OXA-23 Füzyon Proteininin Saflaştırılması .....	41
4.7. OXA-23'ün MBP'den Ayrıştırılması .....	43
4.8. MBP'nin OXA-23 Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	44
4.9. OXA-23 Füzyon Proteininin Kinetiği .....	45
5. TARTIŞMA .....	49
5.1. OXA-23'ün Saflaştırılması .....	49
5.2. OXA-23'ün Topolojik Özellikleri .....	52
5.3. OXA-23'ün Kinetik Özellikleri .....	55
6. SONUÇ ve ÖNERGELER .....	56
KAYNAKLAR .....	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OXA	Oksasilinaz
PBP	<u>P</u> enisilin <u>B</u> ağlayan <u>P</u> rotein
pI	İzoelektrik noktası
IPM	İmipenem
MEM	Meropenem
OMP	Dış Zar Proteini ( <u>Q</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein)
HMP	Isı ile Değişebilen Proteinler ( <u>H</u> eat- <u>M</u> odifiable <u>P</u> rotein)
MSF	<u>M</u> ajor <u>F</u> acilitator <u>S</u> uperfamily
RND	<u>R</u> esistance- <u>N</u> odulation- <u>D</u> ivision
PZR	<u>P</u> olimeraz <u>Z</u> incir <u>R</u> eaksiyonu
MBP	<u>M</u> altoz <u>B</u> ağlama <u>P</u> roteini
PBS	Fosfat tampon salin ( <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline)
IS	İnsersiyon dizileri ( <u>I</u> nsertion <u>S</u> equence)
RMSD	Kareköklerinin deviasyonu ( <u>R</u> oot <u>M</u> ean <u>S</u> quare <u>D</u> eviation)
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ankası
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Gram negatif bakteri hücre zar yapısı.....	5
Şekil 2.2 Beta-laktam halkası ve bazı beta-laktamlar .....	8
Şekil 2.3. <i>Acinetobacter</i> 'de bulunan OXA beta-laktamazların filogenetiği ..	15
Şekil 2.4. OXA'ların asetilasyon ve deasetilasyon şeması .....	17
Şekil 4.1. Anyon değiştirici kromatografi sonucu .....	39
Şekil 4.2. Katyon değiştirici kromatografi sonucu .....	40
Şekil 4.3. OXA-23 genini içeren PZR ürünü agaroz jel görüntüsü. ....	41
Şekil 4.4. pMal-c4x-OXA23 ve pMal-p4x-OXA23 klon plazmitlerin EcoRI-BamHI restriksiyon enzimleri ile kesimi .....	42
Şekil 4.5. MBP-OXA-23 füzyon protein Faktör-Xa kesimi ve saf fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. ....	43
Şekil 4.6. MBP-OXA-23 füzyon proteininin farklı substratlar ile Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri.....	47
Şekil 5.1. OXA-23, SHV-1 ve TEM-1 proteinlerinin yüzey yük dağılımı....	49
Şekil 5.2. MBP'nin füzyon yapıldığı proteinlerin katlanmasını etkileyişi....	51
Şekil 5.3. MBP-OXA23 füzyon proteininin ikincil yapısı.....	51
Şekil 5.4. OXA-23 ve OXA-24 proteinlerinin ikincil yapılarının üst üste bindirilmiş karşılaştırılmaları.....	53
Şekil 5.5. OXA-23 aktif bölgesi ve korunmuş dizilerdeki Thr217 konumlanması.....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Bush-Jacoby ve Ambler'e göre Beta laktamazların sınıflandırılması.....	12
<b>Çizelge 2.2.</b> Ambler sınıflamasına göre grup A, C ve D beta-laktamazlarda korunmuş üç bölgenin karşılaştırılması.....	14
<b>Çizelge 3.1.</b> Stok antibiyotik konsantrasyonu ve çalışma konsantrasyonu....	20
<b>Çizelge 3.2.</b> Kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışı .....	20
<b>Çizelge 3.3.</b> OXA-23 kinetik ölçümlerinde kullanılan antibiyotiklerin dalga boyu ( $\lambda$ ) ve $\Delta\epsilon$ değerleri.....	33
<b>Çizelge 4.1.</b> OXA-23 enziminin sıcaklık inaktivasyonu ile saflaştırılması ...	36
<b>Çizelge 4.2.</b> OXA-23 enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılması .....	37
<b>Çizelge 4.3.</b> OXA-23 enziminin saflaştırılmasında anyon değiştirici kromatografide kullanılan parametreler .....	38
<b>Çizelge 4.4.</b> Anyon değiştirici kromatografi sonucu .....	38
<b>Çizelge 4.5.</b> OXA-23 enziminin saflaştırılmasında katyon değiştirici kromatografide kullanılan parametreler .....	39
<b>Çizelge 4.6.</b> Katyon değiştirici kromatografi sonucu .....	40
<b>Çizelge 4.7.</b> Farklı klonların nitrosefin aktivitelerine bağlı ünite tanımlanması ve bu ünitelerin eşitlenmesi.....	44
<b>Çizelge 4.8.</b> Nitrosefin aktiviteleri eşdeğer işlenmemiş protein çözeltilerinin IPM ve MEM aktiviteleri .....	45
<b>Çizelge 4.9.</b> OXA-23 enziminin kinetik değerleri .....	48
<b>Çizelge 4.10.</b> OXA-23'ün farklı inhibitörler ile nitrosefin aktivitesini yarıya indirdiği inhibitör konsantrasyonu. ....	48

## 1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI

Bugüne kadar birçok OXA tipi beta laktamaz geni tanımlanmış, bunların bazılarında ait enzimler saflaştırılmış ve değişik substratlarla olan aktivite ve kinetik özellikleri belirlenmiştir. Ancak OXA türü enzimlerin bir kısmı klasik metotlarla istenilen derecede saflaştırılmamaktadır. Bir OXA-karbapenemaz olan ve yaygın olarak rastlanan OXA-23 de henüz saflaştırılarak çalışılmamıştır. Hastanemizin yoğun bakım ünitesinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında bu enzime rastlanmıştır. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de *Acinetobacter* türleri arasında tedavi problemi yaratan OXA-23 enzimini saflaştırmak ve kinetik özelliklerini belirlemek anlamlıdır. Bu tezin amacı klasik protein saflaştırma metotları ile saflaştırılması zor olan OXA-23'ü rekombinant metotlar kullanarak saflaştırmak ve karakterize etmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Acinetobacter* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

DeBord'un 1939 yılında Gram negatif kokobasilleri üretral örnekten izole etmesi ile *Acinetobacter* türleri ilk kez tanımlanmıştır (Madri, 1967). Yirmi iki farklı genomik türde *Acinetobacter* cinsi tanımlanmıştır ve *Acinetobacter baumannii* klinik olarak en çok izole edilen *Acinetobacter* türüdür (Vila et al., 2007). *Acinetobacter* aerobik koşullarda 35-37 °C de üremeyi seven Gram negatif nonfermantatif bir mikroorganizmadır. Üremenin logaritmik fazında 1-1.5 x 1.5-2.5 boyutlarında basil, duraklama fazında ise kok şeklinde görülmektedir (Bergogne-Berezin and Towner, 1996).

*Acinetobacter* dış ortamda günlerce canlı kalabilmektedir (Aktaş, 2004). *Acinetobacter* türleri *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'a oranla kuru yüzeyde çok daha uzun süre yaşayabilmektedir (Vila et al. 2007). Hava, toprak, gıda, eşya, su ve lağımında bulunabilmektedir. Sağlıklı insanda ağız florasında, üst solunum yolu, genitoüriner sistem ve gastrointestinal sistemlerde bulunduğu gösterilmiştir (Bahar and Esen, 2002). İnsanda normal flora elemanı olarak sayılmamasıyla birlikte normal deri florasında, genelde düşük yoğunlukta, kısa süreli olarak bulunabildikleri belirlenmiştir. Hastane ortamında yaygın bulunmaları nedeniyle cilt ve solunum sistemine kolonize olmaktadır. Genellikle hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olur ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde önemli bir sorundur. Neden olduğu hastane enfeksiyonları solunum sistemi enfeksiyonları, bakteremi\sepsis, üriner sistem enfeksiyonu, yumuşak doku enfeksiyonları, nozokomiyal menenjit ve diğer bazı enfeksiyonlar şeklindedir (Bergogne-Berezin and Towner, 1996, Jehl et al., 2004 , Aktaş, 2004 ).

## 2.2. *Acinetobacter baumannii*

Hastane kökenli enfeksiyon etkeni olan *A.baumannii*'nin izolasyon sıklığı dünyada gittikçe artmakta, tedavi ve kontrolünde ciddi zorluklar yaşanmaktadır. Günümüzde *Acinetobacter* cinsi bakterilerde antibiyotik direnci giderek önem kazanan bir sorun haline gelmiştir. Direnç mekanizması bölgeden bölgeye hatta hastaneden hastaneye ve kullanılan antibiyotiğe göre değişmektedir (Baştürk, 2005).

## 2.3. *Acinetobacter baumannii* Çoklu Direnç Mekanizması

Çoklu dirence sebep olan en önemli faktörler genetik elementlerdir. Bu elementler plazmitler, transpozonlar ve integronlardır (Bergogne-Berezin and Towner, 1996). Plazmitlere ilk örnek Goldstein ve arkadaşları tarafından 1980'lerin başında gösterilmiştir. Üç adet direnç geni taşıyan bu plazmit sırası ile bir beta-laktamaz olan TEM-1'i ve iki adet aminoglukozit değiştirici enzimi kodlamaktadır (Goldstein et al., 1983). Transpozonlara ilk örnek Ribera ve arkadaşlarının tetR ve tetA genlerini taşıyarak bakterinin tetrasikline direnç oluşturmasını sağlayan transpozonu karakterize etmesiyle bulunmuştur (Ribera et al., 2003). *A. baumannii*'deki genetik element olan integronlar ise Fournier ve arkadaşlarının *A. baumannii* genomunda 86kb'lik direnç adacığında 45 direnç geninin kümелendiğini göstermesiyle ortaya çıkmıştır (Fournier et al., 2006).

Mikroorganizmanın çoklu direnç kazanım mekanizması bazı antibiyotiklere karşı dış zarda düşük geçirgenlik, bazı efflux pompalarının temel ekspresyonu ya da ikisinin karşılıklı etkileşimi ile olmaktadır.

*Acinetobacter baumannii* dış zarında bulunan dış zar protein (Outer membrane protein, OMPs) porini direnç mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. *A. baumannii*'deki major OMP proteini ısı ile değişebilen protein AB (Heat Modifiable Protein AB, HMP-AB) denen ısı ile değiştirilebilen bir proteindir. Bu porin OmpA porin ailesine aittir. Bu porin ailesi yavaş porinler olarak bilinmektedir ve beta-laktamların hücre içerisine daha az miktarda girmesine izin vermektedir. Klasik trimerik porinleri olmayan organizmalarda bu protein ailesi

major porindir ve yüksek düzeyde ana dirence katkıda bulunmaktadır. *A. baumannii*'deki diğer OMP proteini OmpW'dir. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte *in vitro* şartlarında *A. baumannii* mutantlarında oluşan kolitsin direncinin bu proteinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Vila, Marti et al. 2007)

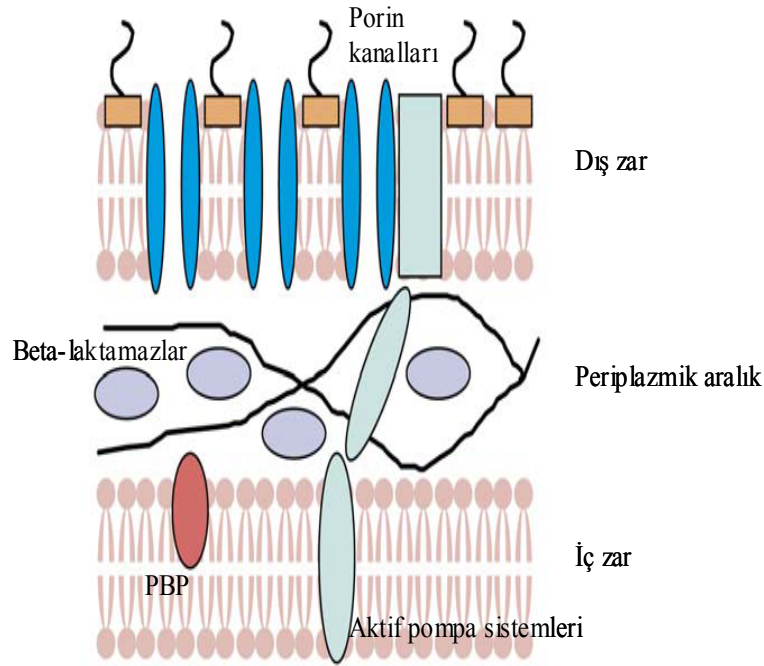
Bakteriler efflux-pompaları yardımı ile organik kimyasalların toksik etkilerinden korunmaktadırlar. Bakterilerde çoklu ilaç direnci bu taşıyıcıların fazla ekspresyonu ile alakalıdır. Efflux pompaları düşük geçirgenlikteki dış zar ile uyumlu olarak çalışmaktadır. Bakteri antibiyotik effluxunun artması ile hücre içindeki ilaç birikimini engellenmekte ve minimal inhibitör konsantrasyonunu (MIC değeri) arttırmaktadır. *A. baumannii*'deki direnci sağlayan efflux pompası genellikle major facilitator superfamily (MFS) ve resistance-nodulation-division (RND) ailesine aittir (Vila et al., 2007).

Diğer birçok Gram negatif organizmada olduğu gibi *Acinetobacter*'lerde de beta laktamlara direnç beta laktamaz üretimi ile ilişkilidir. En çok bilinen beta-laktamaz enzimleri ACE, TEM-1, TEM-2, CARB-5, ARI-1 (OXA-23) olarak belirlenmiştir (Bergogne-Berezin and Towner, 1996). Direnç kromozomal AmpC beta-laktamazlara bağlı olarak da gelişebilmektedir. AmpC beta-laktamazlar normalde indüklenmeden düşük düzeyde eksprese edilirken efektif promotör görevi gören *ISAbal* dizisinin ön bölgesine yerleşmesi ile yoğun eksprese edilebilmektedirler. *ISAbal A. baumannii*' de 13 kopya kadar bulunabilmektedir (Livermore and Woodford, 2006).

#### **2.4. Gram Negatif Bakteri Hücre Duvar Yapısı ve Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP)**

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı sıkı ve çapraz bağlı peptidoglikanlardan oluşan ve yüksek iç ozmotik basıncına karşı hücre şeklini koruyabilen karmaşık bir yapıdır. Dıştan içe doğru; dış zar (lipopolisakkarit tabaka), peptidoglikan tabakası, periplazmik aralık ve iç zar şeklinde katmanlaşmıştır. Periplazmik aralık dış zarla hücre zarı arasındaki bölümü kapsar (Şekil 2.1) (Babic et al., 2006).





**Şekil 2.1** Gram negatif bakteri hücre zar yapısı (Jehl et al., 2004 )

Peptidoglikan, ardı ardına 20-100 adet N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin oluşturduğu zincirlerin üç boyutlu ağı şeklindedir. Bakteriyel transpeptidazlar (penisilin bağlayan proteinler, PBPs) bu ağı oluşturan en temel enzimlerdir (Babic et al., 2006). Tüm PBP'lerin glikoziltransferaz, transpeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitesi vardır ve fizyolojik rolleri peptidoglikan sentezidir (Jehl et al., 2004 ). Düşük moleküler ağırlıktaki PBP'ler karboksipeptidaz, yüksek moleküler ağırlıktaki olanlar ise transpeptidaz olarak bilinirler. PBP'ler yapısal olarak beta-laktamazlara çok benzerler (Yüce, 2001). PBP'ler plazma zarına tutunmuşlardır ve periplazmik aralığa doğru çıkıntı yaparlar (Jehl et al., 2004 ). Periplazmik kısımda enzimin aktif bölgesi yer almaktadır (Gülay, 2005b). Beta-laktam ajanlar PBP'lerin substrat analoglarıdır (Gülay, 2005a). PBP'ler aynen beta-laktamazlar gibi beta-laktam ajanlara bağlanır ve onları hidroliz ederler. Hidroliz hızı çok düşük olduğundan olay geri dönüşmez açıl-enzim ara kompleksi oluşmasına, açıl ara türevinden ayrılamayan enzimin duvar sentezindeki görevini yapamamasına, hücre duvar sentezinin durmasına ve yapım-yıkım dengesinin yıkım yönünde bozulmasına sebep olur (Babic et al., 2006, Livermore, 1998). Beta-laktam antibiyotiklere dirençte

önemli bir mekanizma hedef PBP'lerin yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması şeklindedir. Değişik PBP'lerin farklı beta-laktam ajanlara bağlanma afiniteleri ve etkilendikleri ilaç düzeyleri birbirinden farklıdır. Bu durum beta-laktam antibiyotiğinin antibakteriyel etkinliklerinin neden birbirinden farklı olduğunu kısmen açıklayabilmektedir. PBP'lerin amino asit dizileri birbirinden çok farklı olmasına rağmen genel yapıları birbirine benzemektedir (Gülay, 2005b). Beta-laktam antibiyotiklerin aynı anda birden fazla PBP'yi inaktive etmesi bakteri için ölümcül bir sonuç doğurmaktadır (Gülay, 2005a).

## **2.5. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları**

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Bakterilerin antibiyotik direnci, olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için oluşabileceği gibi, aynı zamanda yaygın antibiyotik kullanımı sonucu da oluşabilmektedir. Antibiyotiklere bakteriyel direnç doğal, çapraz ya da kazanılmış şekilde olabilir (Jehl et al., 2004 , Yüce, 2001)

### **2.5.1. Doğal Direnç**

Kalıtsal özellikte olmayan direnç tipidir (Öztürk, 2002). Belirli bir cins ya da türün temel özelliğidir ve o cins ya da türün tüm suşları için geçerlidir (Jehl et al., 2004 ). Genellikle ilaçların etkili olması için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Bakteri sporları veya durgun haldeki mikobakteriler gibi metabolik olarak inaktif mikroorganizmalar ilaçlara fenotipik olarak direnç gösterebilir, ama bunlardan oluşan yeni kökenler ilaçlara duyarlıdırlar (Öztürk, 2002, Yüce, 2001).

Doğal direnç, bakterilerin vahşi fenotipini belirler ve tüm sonraki kuşaklara dikey yolla geçirilir; yatay geçiş yoktur ya da çok nadirdir (Jehl et al., 2004 ).

### **2.5.2. Çapraz Direnç**

Genellikle belli bir ilaca karşı dirençli olan bazı mikroorganizmaların yapıları ya da etki tarzı bakımından benzer ilaçlara karşıda dirençli olması halidir (Yüce, 2001, Öztürk, 2002).

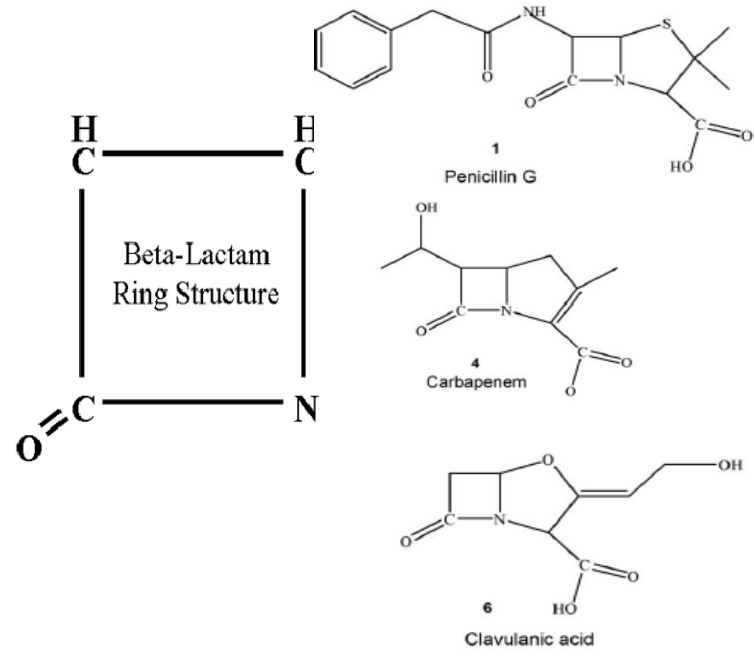
### **2.5.3. Kazanılmış Direnç**

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç kazanılması biyokimyasal reaksiyonlar ile olmaktadır (Gür, 2004). Kazanılmış direnç zaman içinde değişir ve bir cinsin bir türünün yalnızca bir bölümüyle ilgilidir. Doğal olarak duyarlı olması gereken bir mikroorganizma çok özgül direnç mekanizması ya da mekanizmaları geliştirerek türünün vahşi fenotipinden ayrı bir direnç fenotipi edinir (Jehl et al., 2004 ).

Genetik kaynaklı direnç kromozomal veya kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir. *Kromozomal direnç*, bakteri kromozomunda bazı fiziksel ve kimyasal faktörlere bağlı olarak kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. *Ekstrakromozomal direnç*, plazmid, transpozon ve integron denen genetik elemanlar ile olmaktadır (Yüce, 2001).

## **2.6. Beta-laktam Antibiyotikleri**

Beta-laktam antibiyotiklerinin geçmişi 1928'de Alexander Fleming'in *penicillium*'dan difüze edilen antibakteriyal ajanı yani penisilini bulmasıyla başlamıştır (Rolinson, 1998). Beta-laktam antibiyotikler düşük toksisiteye sahip yoğun kullanım alanı olan antibiyotiklerdir. Beta-laktam antibiyotikler, yapısında biri azot ve üçü karbon olan dört üyeli doymuş bir beta-laktam halkası içerirler (Şekil 2.2). Bunlardan monobaktamlar (beta-laktam halkası tek başına bulunur) dışında grubun diğer üyelerinde beta-laktam halkası beş veya altı üyeli bir başka halka ile birleşmiş durumdadır (Essack, 2001).



**Şekil 2.2** Beta-laktam halkası ve bazı beta-laktamlar (Essack, 2001)

Beta-laktam antibiyotikler grubunda penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler bulunmaktadır.

Ayrıca, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam da yapılarında beta-laktam halkası içerirler. Bu ajanlar penisilinlere direnç gelişmesinde önemli rolü olan ve beta-laktamaz enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe eden bileşiklerdir. Beta-laktam bileşenlerinin kimyasal yapısı ve biyolojik aktivitesi, beta-laktamaz kararlılığı ve toksiditesi ile alakalıdır. Beta-laktam antibiyotikler eklenmiş yan karboksil gruplarından dolayı asidik yapıdadırlar, suda kolayca çözünürler ve porinleri kullanarak periplazmik aralığa geçerler. Gram negatiflerde dış zarı en iyi geçen beta-laktam en etkili antibiyotiktir (Jehl et al., 2004 , Essack, 2001, Çakır, 2004).

## 2.7. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

### 2.7.1. Penisilin Bağlayan Protein (PBP) Değişiklikleri

Antibiyotikler kendilerine özgü bağlanma bölgelerini tanırlar ve bağlanırlar. Antibiyotiklerin bakteri hücreindeki hedefleri, hücrenin üremesi ve devamı için yaşamsal önemi olan proteinlerdir. Bu hedef bölgedeki tek bir mutasyon, bu etkileşimi değiştirebilmektedir (Gür, 2004, Öztürk, 2002, Jehl et al., 2004 ). Beta-laktam antibiyotikler kendilerine özgü PBP'yi tanıyıp bağlarlar. PBP üzerinde meydana gelen değişiklikler sırası ile (i) PBP'nin aşırı sentezi, (ii) duyarlı bir PBP'nin daha dirençli olanlar ile rekombine olması (iii) PBP'nin afinitesinde azalmaya yol açacak nokta mutasyonların beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşturması şeklinde özetlenebilir. PBP'ler yolu ile oluşan direnç Gram negatif bakterilerde nadir gözükmele birlikte daha çok Gram pozitif bakterilerde görülmektedir (Gür, 2004, Essack, 2001).

### 2.7.2. Dış Zar Proteinindeki Değişiklikler

Antibiyotiğin hücre içine alımındaki azalmadan veya hızla dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanan bir direnç söz konusudur. Hedefe ulaşan antibiyotik miktarında azalma bakteriyel dış zar proteinlerindeki değişiklik ile olmaktadır (Yüce, 2001, Jehl et al., 2004 ). Bu değişiklikler Gram negatif bakterilerde porinler üzerindeki değişikliklerdir. Küçük hidrofilik antibiyotik molekülleri dış zardan içi su dolu kanalcıklar olan porinler aracılığı ile geçebilmektedirler. Bu geçişi engellemek için hücreler porin proteinlerinin yapısını veya iyonik yükünü değiştirebileceği gibi bu proteinleri kaybedebilir. Örneğin *P. aeruginosa*' da OprD kaybı karbapenemlere karşı dirence sebep olmaktadır (Yüce, 2001).

Porin kaybı tek başına yüksek düzeyde beta-laktam direncine yol açmamaktadır. Direnç için porin kaybının yanı sıra aktif pompa sistemleri veya aşırı beta-laktamaz üretimi gibi mekanizmalar da gereklidir. Aktif pompa sistemi

antibiyotik direncine yol açan bir diğer mekanizmadır. Aktif pompa sistemi her tür hücrede bulunmakta, antibiyotik gibi amfilik ilaçlardan hücreleri korumaktadır. (Gülay, 2005a). Aktif pompa sistemlerini ilacı hücre dışına atabilen proton-motor gücünü kullanan transmembran proteinleri oluşturur (Jehl et al., 2004 ) Günümüzde beş sınıf bakteriyel pompa sistemi tanımlanmıştır. Major facilitator superfamily (MSF), ATP-binding cassette (ABC), resistance-nodulation-division (RND), multidrug and toxic compound extrusion (MATE), small multidrug resistance (SMR). Gram negatif bakterilerde yaygın olan ve klinik olarak beta-laktam antibiyotikler açısından en önemli olanı RND ailesidir. RND pompalarının varlıkları *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. putida* gibi bakterilerde gösterilmiştir (Elkins and Nikaido, 2002, Pannek et al., 2006). Bu pompalar sefalosporin ile karbapenemlerin bakteri hücresinden atımından sorumludurlar (Poole, 2004).

### **2.7.3. Beta-Laktamazlar**

Beta-laktam antibiyotiklerine karşı direncin en sık nedeni beta-laktamazlardır. Beta-laktam antibiyotiği olan penisilin ilk olarak Fleming tarafından 1928 yılında keşfedilmiştir (Frere, 1995). Froye ve Chain ise 1940 yılında *E. coli*'den elde ettikleri özütün penisilinin etkisini ortadan kaldırdığını göstermişler ve elde ettiklere enzime “penisilinaz” adını vermişlerdir (Abraham and Chain, 1988). Bir süre sonra penisilini parçalayan enzimi içeren patojen türlerinin sayısının artması ile beta-laktamaz çeşitlerinde de artış oluşmaya başlamıştır. Beta-laktam antibiyotik kullanımının aşırı olması ise dirençli türlerin ve yeni beta-laktamazların gelişmesine sebep olmuştur (Frere, 1995).

Günümüzde substrat profili, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık, hidroliz etkinliği gibi özellikler açısından farklı yaklaşık 530’u aşkın beta-laktamaz tanımlanmıştır (Gülay, 2005a, Babic et al., 2006). Kromozom veya plazmid kontrolünde yapılan beta-laktamazlar beta-laktam halkasındaki siklik amid bağı hidroliz edip beta-laktam antibiyotiğinin etkinliğine engel olmaktadır. Beta-laktamazlar yapısal olarak PBP’lerden evrimleştiklerini düşündürecek kadar

PBP'lere benzerler (Gülay, 2005a, Gür, 2005b). Aralarındaki ana fark deasetilasyon hızlarıdır (Helfand and Bonomo, 2003).

Beta-laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. Bu enzimler kullandıkları substratlara, biyokimyasal özelliklerine, gen dizilerine, keşfedildikleri yerlere, genlerin kromozom üzerindeki yerlerine, bakteri cinsine, örneğin izole edildiği hastaya ve son olarak enzimi tanımlayan araştırmacıya göre isimlendirilebilmektedirler (Jacoby, 2006). Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros veya Ambler sınıflandırılması kullanılmaktadır (Gür, 2005b) (Çizelge 2.1).

Bush-Jacoby-Medeiros beta-laktamazları penisilin, oksasilin, karbenisilin, sefaloridin, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler ve imipeneme karşı hidrolitik spektrumları ve klavulanik aside duyarlılıklarını esas alarak 1'den 4'e kadar gruplandırmışlardır (Jacoby, 2006).

Ambler tarafından yapılan sınıflandırma ise enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine dayanan moleküler sınıflandırmadır (Ambler, 1980). Bu sınıflandırmaya göre beta-laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört grupta toplanmaktadırlar. A, C ve D gruplarındaki beta-laktamazlar katalitik aktivite için aktif bölgelerinde serin dizileri içermektedirler. B grubu beta-laktamazlar ise metallo enzimdirler ve aktif bölgede çinko içerirler (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006).

**Çizelge 2.1.** Bush-Jacoby ve Ambler'e göre Beta laktamazların sınıflandırılması

Beta-laktamaz Grupları ve Genel Özellikleri						
Beta-Laktamaz	Moleküller sınıfı (Ambler)	Lokasyon	Tercih edilen substrat	CA inh.	EDTA inh.	Örnek enzimler
1	C	Chr Plz	Sefalosporinler	-	-	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri; MIR-1
2a	A	Plz	Penisilinler	+	-	Gram Pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Chr Plz	Penisilinler, Sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Chr Plz	Penisilinler, dar ve geniş Spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktalar	+	-	TEM-3 ile TEM26, SHC-2 ila SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Plz	Penisilinler	+,-	-	TEM-30 ila TEM-36, TRC-1
2c	A	Çeşitli	Penisilinler, karbenisilin	+	-	PSE-1,3 4
2d	D	Çeşitli	Penisilinler Kloksasillin	+,-	-	OXA-1 ila OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Çeşitli	Sefalosporinler	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Chr Plz	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC-A s1 OXA-24-26,40, 51,58,72
3	B	Çeşitli	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	-	+	<i>Bacteroides fragillis</i> 'in CcrA'sı VIM, IMP, SPM, GIM
4	Belirlenmemiş		Penisilinler			<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nin penisillinazı

CA inh.: Klavulanik asit inhibisyonu; EDTA inh.: EDTA inhibisyonu



## 2.8. D grubu Beta-laktamazlar (OXA-ailesi)

D grubu beta-laktamazlar (OXA-ailesi) oksasilinaz olarak adlandırılmaktadırlar. OXA-tip enzimler oksasilini benzilpenisilinden daha hızlı hidroliz etmektedir (Poirel and Nordmann, 2006). Bu enzimler penisiline, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnç gösterirler. Klavulanik asit ile zayıf inhibe olurlar. NaCl'ün inhibitör etkisi vardır. D grubu beta-laktamazlar C veya A grubu beta-laktamazlara amino asit düzeyinde % 16 benzerlik gösterirler. OXA genlerinin plazmit ya da integron üzerinde bulunması yayılımını kolaylaştırmıştır (Helfand and Bonomo, 2003). Şimdiye kadar protein düzeyinde 121 farklı tür D grubu beta-laktamaz belirlenmiştir. Bunlardan 45 tanesi diğer D grubu beta-laktamazların aksine karbapenem hidroliz aktivitesine sahiptir (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006). OXA-1'den OXA-10'a kadar olan beta-laktamazlar dar spektrumlu enzimlerdir ve tercih ettikleri substrat oksasilin ve kloksasilindir. Amino asit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiminosefalosporinleri hidroliz eden geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir. Bunlar OXA-11, OXA-13-19, OXA-28, -31, -32, -35, -45 GSBL'dir (Gür, 2005a).

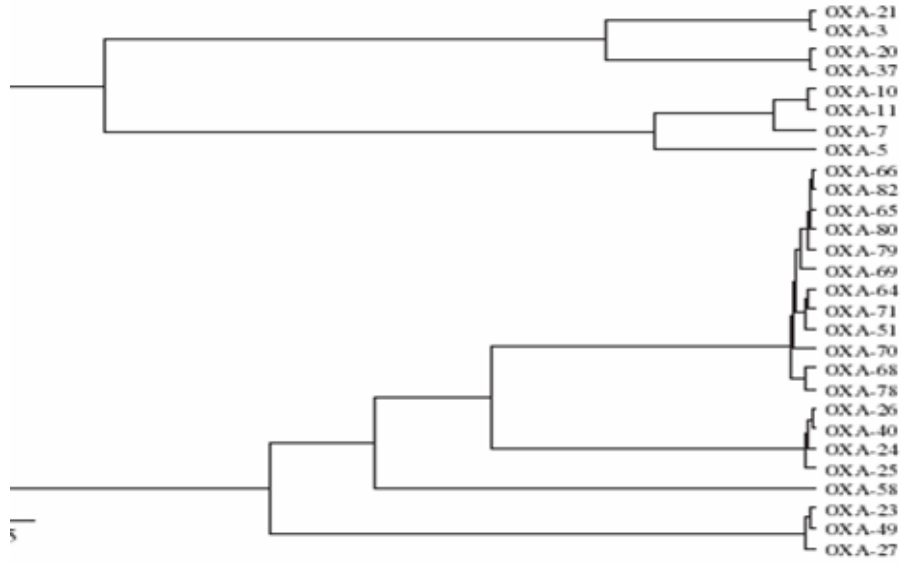
D grubu beta-laktamazların aktif bölgelerinde korunmuş üç motif bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Bu motiflerin enzim reaksiyonları sırasında substrat enzim etkileşimlerini kararlı hale getirmede görev alan hidrojen bağlarının ve diğer kovalent olmayan bağların oluşumunda görev aldığı bilinmektedir (Paetzel et al., 2000).

**Çizelge 2.2.** Ambler sınıflamasına göre grup A, C ve D beta-laktamazlarda korunmuş üç bölgenin karşılaştırılması

	1. element	2. element	3. element
Grup A	Ser <sup>70</sup> -X-X-Lys <sup>73</sup> (S-X-X-K)	Ser <sup>130</sup> -Asp <sup>131</sup> - Asn <sup>132</sup> (S-D-N)	Lys/Arg <sup>234</sup> - Thr/Ser <sup>235</sup> -Gly <sup>236</sup> (K-T-G, K-S-G, R-S-G, R-T-G)
Grup C	Ser <sup>64</sup> -X-X-Lys (S-X-X-K)	Tyr-Ala/Ser-Asn (Y-A-N)	Lys/Arg/His- Thy/Ser-Gly (K-T-G)
Grup D	Ser <sup>70</sup> -X-X-Lys (S-T-F-K)	Ser <sup>118</sup> -X-Val/Ile (S-X-V)	Tyr/Phe <sup>144</sup> -Gly-Asn (Y-G-N yada F-G- N)

### 2.8.1. OXA Tip Beta-laktamazların Alt Grupları

Karbapenem hidroliz eden OXA enzimleri sekiz alt gruptan oluşmaktadır. Her alt grubun grup üyelerinin birbirleri ile olan amino asit seviyesindeki dizi benzerlikleri  $\geq$  %92,5 civarında iken farklı alt gruplardaki grup üyeleri ile aralarındaki benzerlik % 40-70 civarındadır (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** *Acinetobacter*'de bulunan OXA beta-laktamazların filogenetiği (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006)

OXA-23 alt grubu OXA-58, OXA-24 ve OXA-51 alt grupları ile daha sıkı bir filogenetik ilişki göstermektedir. OXA-23 (ARI-1), -27 ve -49 ile birlikte 1. alt grubu oluşturmaktadır. Bu enzimler arasında iki ile beş amino asit farklılık vardır. İkinci alt grup OXA-24, -25, -26, -40 tır. Bu enzimler arasında da bir ile beş amino asit farklılık vardır. İkinci alt gruptaki OXA-24 ve 1. alt gruptaki OXA-23 arasında < % 60 amino asit benzerliği bulunmaktadır. Üçüncü alt grup OXA-51 enzim ailesidir ve *A. baumannii* de 1. ve 2. alt gruplar ile < % 63 amino asit benzerliği göstermektedir. Dördüncü alt grubu OXA-58 oluşturmaktadır ve diğer oksasilinazlar ile < % 50 amino asit benzerliği göstermektedir (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006, Brown and Amyes, 2006, Poirel and Nordmann, 2006).

### **2.8.2. OXA Tip Karbapenemazları Kodlayan Genlerin Genetik Çevresi**

Klinik örneklerde D sınıfı oksasilinazlar yaygın olarak plazmit üzerinde integron gen kasetleri şeklinde bulunmaktadırlar. Dünyanın çeşitli yerlerinde plazmit veya kromozomal DNA üzerinde taşınan *bla<sub>OXA-23</sub>* geni *A. baumannii*'den izole edilmiştir (Bonnet et al., 2002, Boo et al., 2006, Dalla-Costa et al., 2003, Donald et al., 2000, Jeon et al., 2005, Naas et al., 2005, Turton et al., 2005). *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*,

*bla<sub>OXA-58</sub>*, *bla<sub>OXA-27</sub>* genlerinin taşınımı insersiyon dizileri (IS) ile ilişkilidir. *ISAbal* *bla<sub>OXA-58</sub>*'i de içine alan kompozit bir transpozondur (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006). Sekans çalışmaları *A. baumannii* 6B92'de *bla<sub>OXA-23</sub>* geninin ön tarafındaki dizinin % 99.3 oranında *ISAbal* dizisi ile benzerliğini göstermiştir. *ISAbal* antibiyotik direnç genlerinin ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Donald et al., 2000, Segal et al., 2005).

### **2.8.3. OXA Tip Karbapenemazların Orijini**

Doğal seleksiyon nedeni ile organizmalar orijinallerinde karbapenemaz aktivitesine sahip enzim içermektedirler ya da bu genleri diğer bakterilerden plazmitler aracılığıyla almaktadırlar. İlk olarak 1985'te İskoçya'da belirlenen OXA tip karbapenemaz *A. baumannii* kaynaklı OXA-23'tür. Bu enzimin keşfediliş zamanı imipenemin genel kullanımından önce olmuştur. Bu bulgu da imipenemin klinik kullanımının D grubu karbapenemazların evrimi ile bağlantılı olmadığı fikrini desteklemektedir (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006). D grubu OXA allelerinin dağılımı Gram negatif bakterilerde limitlidir fakat Gram pozitif bakteri kromozomunda bazı homologlar bulunmuştur.

Bayesian filogeni ile ortaya çıkartılan filogenik ağaç OXA genlerinin üç farklı zaman diliminde plazmitler üzerinde bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. 2,2 milyar yıl önce Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ayrıştığı düşünüldüğünde D grubu genleri içeren plazmitin yaklaşık 116±25 milyon yıl önce, bir sonrakinin 42± 9 milyon yıl önce son zaman diliminin ise çok daha yakın bir geçmişte olduğunu göstermektedir (Hall and Barlow, 2004).

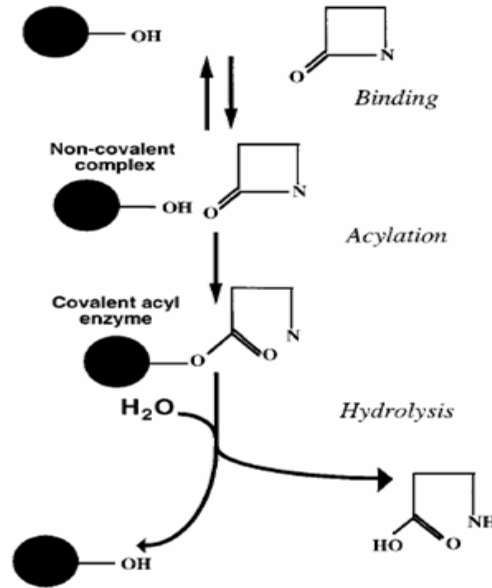
### **2.8.4. OXA Tip Karbapenemazların Biyokimyası**

OXA tip karbapenemazlar 243 ile 260 amino asitten oluşabilmektedirler. Deneysel olarak belirlenen moleküler ağırlık 23-35,5 kDa arasında olup izoelektrik noktaları pI 5,1 ile 9,0 arasında değişmektedir. OXA tip karbapenemazlardan ilk

olarak OXA-69 enziminin dimer yapı oluşturduğu gösterilmiştir (Heritier et al., 2005).

OXA'ların asetilasyon ve deasetilasyon içeren basit üç aşamalı model ile çalışmaktadır (Livermore, 1995, Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006).

Enzim öncelikle antibiyotik ile non-kovalent bir kompleks oluşturmaktadır. Enzim aktif bölgesinde bulunan serinin yan zincirinin serbest hidroksil grubu beta-laktam halkasındaki karbonil karbona nükleofilik atak yapmaktadır ve kovalent açıl ester ara form oluşmaktadır. Ester bağının hidrolizi ile aktif enzim ve hidrolize olmuş inaktif antibiyotik oluşmaktadır. Bu mekanizma A ve C grubu beta-laktamazlarda da görülmektedir (Gür, 2005b) (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. OXA'ların asetilasyon ve deasetilasyon şeması (Livermore, 1995)

Serin aktif beta-laktamazların bu üç aşamalı asetilasyon-deasetilasyon mekanizması aynıdır fakat B grubu beta-laktamazlar çinko iyonuna ihtiyaç duyduklarından A, C ve D grubu beta-laktamazlardan farklıdır.

Asetilasyon hızı yani açıl enzim ara formunun oluşumu  $k_{cat}/K_m$  ile deasetilasyon hızı yani enzimin etkinlik değeri  $k_{cat}$  ile temsil edilmektedir. Çok düşük  $K_m$  değerleri yüksek  $k_{cat}/K_m$  değerini sebep olur ki bu da yüksek katalitik aktivite demektir. Sonuç olarak beta-laktamazların beta laktam antibiyotiklerini hidrolizi  $k_{cat}$  ve  $k_{cat}/K_m$  değerlerinin analizi sonucunda belirlenir.

Beta-laktam hidrolizinde oldukça düşük *k<sub>cat</sub>* değerine sahip enzimin *in vivo* hidroliz miktarı yüksek olabilir. Bunun temel nedeni organizmanın oldukça yüksek periplazmik konsantrasyonda (1 mM'a kadar) beta-laktamaz üretebilmesidir. Beta-laktam değredasyonunun maksimum hızı ( $V_{max}$ ) *k<sub>cat</sub>* ve enzim konsantrasyonuna bağlıdır. ( $V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0$ ). Düşük *k<sub>cat</sub>* değeri yüksek enzim konsantrasyonu ile dengelenebilmektedir.

Klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam beta-laktamazların en iyi bilinen inhibitörleridir. Beta laktamazlar bu inhibitörler ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olurlar. Genellikle D sınıfı beta-laktamazların klavulanik asit ile inhibisyon oranı düşüktür. OXA tip karbapenemazlarda tazobaktamın klavulanik asitten daha fazla inhibisyon etkisi vardır. Sulbaktam diğer inhibitörler ile karşılaştırıldığında en az inhibisyon sağlayan inhibitördür (Livermore, 1995, Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006, Essack, 2001).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. Besiyerlerin Hazırlanması**

##### ***3.1.1. Mueller-Hilton (MH) Agar***

Mueller-Hilton (MH) agar (Oxoid), ticari olarak satılan preparatından üreticinin tavsiyesine uygun olarak hazırlandı. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra yaklaşık 45-50 °C ye kadar soğutuldu. Besiyeri, plastik petrilere derinliği 3-4 mm olacak şekilde steril bir ortamda döküldü ve düzgün bir zeminde soğumaya bırakıldı.

##### ***3.1.2. Sıvı Besiyeri***

Bir litre sıvı besiyeri için; 10 g tripton, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 2 g glukoz tartıldı. 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmayacaksa +4 °C'de saklandı.

##### ***3.1.3. Antibiyotikli Besiyeri***

Hazırlanan stok antibiyotik konsantrasyonları ve kullanılan antibiyotik miktarları çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Stok antibiyotik konsantrasyonu ve çalışma konsantrasyonu

Antibiyotik	Stok konsantrasyonu	Çalışma Konsantrasyonu	100 ml besiyeri için stoktan kullanılan miktar
Ampisilin	0,1 g/ml	100 µg/ml	100 µl
Kanamisin	0,1 g/ml	35 µg/ml	35 µl

Antibiyotik etkinliğinin inhibe olmaması için besiyeri yaklaşık 50 °C'ye soğutulduktan sonra antibiyotik eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra katı besiyeri ise plastik petrilere yaklaşık derinliği 3-4 mm olacak şekilde dökülerek steril bir ortamda soğumaya bırakıldı. Katılaştıran besiyeri kullanılmıyacaksa +4 °C'de saklandı. Sıvı besiyerinde ise antibiyotik eklendikten sonra kullanıldı.

### 3.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon çözeltiler çizelge 3.2.'de verildiği şekilde hazırlandı.

**Çizelge 3.2.** Kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışı

Tampon Çözelti Adı	Konsantrasyonu ve Miktarı	Hazırlanışı
Tris.Cl	50 mM, 500 ml	3,02 g Tris 400 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 9,2 veya pH 8,0 'e ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı
Tris.H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 mM, 500 ml	3,02 g Tris 400 ml saf suda çözüldü. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile pH 9,0 'a ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı.
HEPES	50 mM, 500 ml	5,95 g HEPES 400 ml saf suda çözüldü. NaOH ile pH 8,0 'e ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı
Sodyum asetat	50 mM, 500 ml	2,05 g sodyum asetat 400 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 6,0 'ya ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı.
MES	50 mM, 500 ml	5,32 g MES 400 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 5,5 'e ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı.
TBE	1 X, 1 lt	10,8 g Tris, 5,5 g borik asit, 4 ml EDTA



		(0,5 M pH 8,0) 1 lt suda çözülerek otoklavlandı.
Kolon Tamponu	20 mM Tris.Cl pH 7.4 200 mM NaCl 1 mM EDTA 100 ml	0,24 g Tris, 1,16 g NaCl ve 0,037 g EDTA 80 ml saf suda çözüldü. pH 7,4 olarak ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
PBS pH 7,5	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 Mm NaCl 500 ml	5,67 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,2 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve 2,92 g NaCl 500 ml saf suda çözülerek otoklavlandı.
Tris.Cl	1,5 M, 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 8,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
Tris.Cl	0,5 M 100 ml	6 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. HCl ile pH 6,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5 X, 300 ml	4,5 g Tris, 21,6 g glisin ve 1,5 g SDS saf suda çözülerek 5 X tampon 1 X 'e seyreltildi.
SDS-PAGE Yükleme Tamponu	6 X, 8 ml	1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 ml gliserol, 1,6 ml % 10 SDS, 0,4 ml βME, 0,2 ml BFB (% 0.05) ve 4 ml saf su karıştırıldı. 1 X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

### 3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Yüzde 1 agaroz içeren jel yapmak için 40 ml 1 X TBE içine 0,4 g agaroz (Prona Basica le Agarose, E.U) eklenerek karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar kaynatıldı. Sıvı haldeki jelin içerisine 10 ng/ml stok etidyum bromürden 1 µl eklenerek elektroforez tankında polimerleşmesi sağlandı. Elektroforez 1 X TBE tamponu içerisinde, 8 V/cm ile 20-30 dakikada tamamlandı. UV ışığında görüntüleme cihazıyla incelendi. Oluşan DNA bantları moleküler ağırlık belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### **3.4. İşlenmemiş Protein Çözeltisinin Hazırlanması**

Onbeş ml'lik tüpe 5 ml PBS pH 7,5 tampon çözeltisi konuldu. 100 µg/ml ampisilin ve 35 µg/ml kanamisin içeren 5 adet petriden bakteriler toplandı. Toplanan bakteriler vorteks ile iyice homojen hale getirildi. 4,000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atılarak bakterinin kuru ağırlığı tartıldı. Kuru ağırlığın 1:3 oranında aynı tampon çözelti eklenerek ve karıştırılarak homojen hale getirildi. Protein aktivitesinin azalmaması için buz içerisinde çalışıldı. Ultra sonikatör (Bendelin Sonoplus HD 220, Berlin) ile 15 saniye 6 kez % 50 güç ile uygulanan sonik dalgalar ile bakteri hücreleri parçalandı. 13,000 xg'de 15 dakika santrifüj edilerek üst kısım temiz bir tüpe alındı. İzole edilen işlenmemiş protein çözeltisi hemen kullanılmayacak ise damlacıklar halinde sıvı azot tankında saklandı.

### **3.5. Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlendi (Bradford, 1976). Protein standardı olarak 0,2 - 0,9 mg/ml arasında beş adet hazırlanan bovine serum albumin (BSA) dilüsyonları ile 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbanslar kullanılarak lineer bir grafik elde edildi ve bu standart eğri olarak kullanıldı. Proteini boyamada Biorad Protein Assay boyası (Bradford reaktifi – Biorad, USA) 1:5 oranında sulandırılarak kullanıldı. Özetle 200 µl Biorad Protein Assay boyası, 800 µl saf su ile karıştırıldı. Ölçülecek proteinden 5 µl eklenerek oda sıcaklığında en az beş dakika bekletildi. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri standart BSA çözeltilerinin absorbansları ile karşılaştırılarak ve dilüsyon faktörü de göz önüne alınarak protein miktarı hesaplandı.

### **3.6. pAc-KOU1 (Erişim numarası: EF120622) Vektöründen Eksprese Edilen OXA-23 Enziminin Saflaştırılması**

Meriç ve arkadaşları (2008) tarafından *bla<sub>OXA23</sub>* geni shotgun klonlama yöntemi (Brown, 2002) kullanılarak bir fajmid vektörü olan pBK-CMV (Stratagene, USA) içerisine yerleştirildi. Elde edilen rekombinant vektöre pAc-KOU1 adı verildi (Meriç et al., 2008). Rekombinant vektörü içeren *E.coli* hücresi 100 µg/ml ampisilin ve 35 µg/ml kanamisin içeren 15 adet MH agar besiyerine ekilerek 37 °C de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün bakteriler kullanılacak olan saflaştırma prosedürüne uygun tampon çözeltide toplandı ve işlenmemiş protein çözeltisi hazırlandı. Elde edilen işlenmemiş protein çözeltisi sıcaklık inaktivasyonu, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değiştirici kromatografi metodları ile saflaştırmaya çalışıldı.

#### **3.6.1. Sıcaklık ile Enzim İnaktivasyonu**

İşlenmemiş protein çözeltisi 2 ml PBS pH 7,5 içerisinde hazırlandı. 200 µl işlenmemiş protein çözeltisi saflaştırma oranını çalışmak üzere saklandı. Üç adet 200 µl'lik işlenmemiş protein çözeltisi 10 dakika boyunca 45 °C, 55 °C, 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. 15 dakika 13,000 xg de +4 °C'de santrifüj edildi. Üst fazda bulunan enzimin protein miktarı ve nitrosefin aktivitesi ölçülerek özgül aktivite ve saflaştırma dereceleri hesaplandı.

#### **3.6.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

İşlenmemiş protein çözeltisi 2 ml PBS pH 7,5 içerisinde hazırlandı. 200 µl işlenmemiş protein çözeltisi saflaştırma oranını çalışmak üzere saklandı. Üç adet 200 µl'lik işlenmemiş protein çözeltisine % 30 amonyum sülfat çöktürmesi için 0,035 g, % 50 için 0,058 g ve % 70 için 0,082 g (Arda and Ertan, 2004) amonyum sülfat eklendi ve karıştırılarak çöktürüldü. 15 dakika 13,000 xg +4 °C'de santrifüj edildi. Üst faz temiz tüpe alındı, çökelek 0,2 ml tampon çözelti ile çözüldü. Üst fazdaki ve

Çökelekteki protein miktarları ve nitrosefin aktiviteleri ölçölerek özgül aktivite ve saflaştırma dereceleri hesaplandı.

### **3.6.3. Diyaliz**

Diyaliz tüpü uygun boyutta kesilerek 1 mM EDTA'da hazırlanmış 10 mM NaHCO<sub>3</sub> çözeltisinde 30 dakika kaynatıldı. Saf su ile iyice yıkandıktan sonra kullanılmayacak ise 1 mM EDTA içinde +4 °C'de saklandı. Kullanılacak diyaliz tüpü saf su ile iyice yıkandı ve tüpün bir ucu dikkatlice bağlandı. Protein çözeltisi pipet ile dikkatlice tüpe doldurulup öteki ucu da kapatıldıktan sonra anyon değişim kromatografisi için 50 mM Tris.Cl (pH 9,2), katyon değişim kromatografisi için ise 50 mM MES pH 5,5 tampon çözelti içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak gece boyu +4 °C'de tampon çözeltisinin değişmesi ve amonyum sülfat tuzunun uzaklaşması sağlandı.

### **3.6.4. İyon Değiştirici Kromatografi**

HiTrap SP HP 5 ml katyon değiştirici ve HiTrap Q HP 5 ml anyon değiştirici kolonlar Amersham Biosciences (USA) tarafından paketlenerek ticari olarak satılmaktadır.

### **3.6.5. HiTrap Q (anyon) HP 5 ml İyon Değiştirici Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma**

Onbeş adet 100 µg/ml ampisilin ve 35 µg/ml kanamisin içeren MH-Agar besiyeri hazırlandı. pAc-KOU1 plazmitini içeren *E. coli* DH 10B hücresi besiyerine ekilerek 37 °C de gece boyu inkübe edildi. Büyüyen hücreler 5 ml 50 mM Tris.Cl (pH 9,2) içerisinde toplandı. İşlenmemiş protein çözeltisi hazırlandı. İşlenmemiş protein çözeltisine 0,075 g streptomisin eklendi ve 13,000 xg'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edilerek nükleik asitlerin çökmesi sağlandı. İşlenmemiş protein çözeltisi

içeren üst kısım temiz tüpe alındı. 0,2 ml işlenmemiş protein çözeltisi saflaştırma oranını çalışmak üzere saklandı. HiTrap Q HP kolonu 25 ml 50 mM Tris.Cl (pH 9,2) ile yıkandı. 25 ml 1 M NaCl içeren 50 mM Tris.Cl (pH 9,2) tampon çözeltisi ile kolon temizlendi. Kolon tekrar 50 ml 50 mM Tris.Cl (pH 9,2) ile yıkanarak tuzlar uzaklaştırıldı. 4,5 ml işlenmemiş protein çözeltisi kolona yüklendi. İşlenmemiş protein çözeltisini içeren HiTrap Q HP kolonu, 20 ml 50 mM Tris.Cl (pH 9,2) ile kolondan çıkan fraksiyonlar nitrosefin aktivitesi vermeyinceye kadar yıkandı. Enzim, 50 mM Tris.Cl (pH 9,2) içinde NaCl konsantrasyonu 0,05 M – 0,1 M – 0,2 M – 0,3 M- 0,4 M – 0,5 M – 0,6 M olacak şekilde 5 ml'lik fraksiyonlar ile kolondan ayrıldı. Kolondan çıkan yıkama fraksiyonları ve kolondan çıkan her 5 ml'lik fraksiyonda nitrosefin aktivitesi bakıldı. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonların protein miktarı ve nitrosefin hidrolizi bakılarak özgül aktivite ve saflaştırma derecesi hesaplandı.

### ***3.6.6. HiTrap S (Katyon) HP 5 ml İyon Değişirici Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma***

Onbeş adet 100 µg/ml ampicilin ve 35 µg/ml kanamisin içeren MH-Agar besiyeri hazırlandı. pAc-KOU1 plazmitini içeren *E. coli* DH 10B hücresi besiyerine ekilerek gece boyu büyütüldü. Büyüyen hücreler 5 ml 50 mM MES pH 5,5 içerisinde toplandı. İşlenmemiş protein çözeltisi hazırlandı. İşlenmemiş protein çözeltisine 0,075 g streptomisin eklendi ve 13,000 xg'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edilerek nükleik asitlerin çökmesi sağlandı. İşlenmemiş protein çözeltisi içeren üst kısım temiz tüpe alındı. 0,2 ml işlenmemiş protein çözeltisi saflaştırma oranını çalışmak üzere saklandı. HiTrap S HP kolonu 25 ml 50 mM MES pH 5,5 ile yıkandı. 25 ml 1 M NaCl içeren 50 mM MES pH 5,5 tampon çözeltisi ile kolon temizlendi. Kolon tekrar 50 ml 50 mM MES pH 5,5 ile yıkanarak tuzlar uzaklaştırıldı. 4,5 ml işlenmemiş protein çözeltisi kolona yüklendi. İşlenmemiş protein çözeltisini içeren HiTrap S HP kolonu, 20 ml 50 mM MES pH 5.5 ile kolondan çıkan fraksiyonlar nitrosefin aktivitesi vermeyinceye kadar yıkandı. Enzim, 50 mM MES pH 5.5 içinde NaCl konsantrasyonu 0,05 M – 0,1 M – 0,15 M – 0,2 M- 0,25 M – 0,3 M olacak şekilde 5 ml'lik fraksiyonlar ile kolondan ayrıldı. Toplanan fraksiyonların nitrosefin

aktivitesi ölçüldü. Yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlarda protein miktarı bakılarak özgül aktivite ve saflaştırma derecesi hesaplandı.

DEAE-25 (Whatman, USA) kolon materyali kullanılacak tampon çözelti ile yıkanarak pH'ı tampon çözeltinin pH'ına getirildi ve silindir cam tüpe hava kabarcığı olmayacak şekilde paketlenildi. DEAE-25 anyon değiştirici kolon ile de HiTrap Q anyon değiştirici kolon kromatografisi ile saflaştırma metodundaki gibi saflaştırma işlemi yapıldı. Enzimin HiTrap Q anyon değiştirici kolonlara bağlanamamasından dolayı DEAE-25 kullanıldı.

### **3.7. *bla*<sub>OXA-23</sub> Geninin pMal-c4x Vektörüne Sub-klonlanma Aşamaları**

*bla*<sub>OXA-23</sub> geninin pMal-c4x vektörüne sub-klonlanmasında aşağıdaki metotlar kullanılmıştır.

#### **3.7.1. *Alkali Lizis Metodu ile Plazmit DNA İzolasyonu***

pAc-KOU1 rekombinant vektörünü içeren bakteriden plazmit Macherey-Nagel Plazmit DNA purifikasyon kiti prosedürü kullanılarak izole edildi. Üretici tarafından tarif edilen temel prensipte *E.coli* taşıyıcı hücrelerinde bulunan plazmit DNA'sı SDS / Alkalın lizis metodu ile saflaştırıldı (Macherey-Nagel Plazmit DNA purification kit, USA). Kısaca bakteriler uygun tampon çözelti ile lizis edildikten sonra ortam nötral pH'a getirildi ve hücre debrisleri sentrifüj ile çöktürüldü. Plazmit DNA'sını içeren faz silika bir kolona bağlandı. Tuz, metabolitler ve çözülebilir makro moleküler hücre içerikleri etanol yıkaması ile uzaklaştırıldı. Saf plazmit DNA'sı düşük iyonik güç koşullarında alkalın tampon çözeltisi ile kolondan ayrıldı.

#### **3.7.2. *Sub-klonlama ile bla*<sub>OXA-23</sub>'ün pMal-c4x'e aktarımı**

pAc-KOU1 rekombinant vektöründen *bla*<sub>OXA-23</sub> geni, dizayn ettiğimiz ve uçlarında EcoRI ve BamHI restriksiyon kesim siteleri taşıyan primerler kullanılarak

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı ve pMAL-c4x vektörüne klonlandı. PZR reaksiyonu için Mastercycler Personal (Eppendorf, USA) cihazı kullanıldı.

PZR reaksiyonu karışımı 5 µM her primerden, 1 X Tag DNA polimeraz reaksiyon tamponu, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, her biri 2,5 mM olan dNTP karışımı, 2,5 U Tag DNA polimeraz, 100 ng plazmit DNA'sı içermiştir.

### 3.7.2.1. Primerler ve İşlem

OXA-23 gen dizisini çoğaltmak için kullanılan reverse primerin başına EcoRI kesim sitesi, forward primerin başına ise BamHI kesim sitesi eklenmiştir.

Reverse primer: 5'- **GGATCCGGATCCTTAAATAATATTC** -3'

Forward primer: 5'- **GAATTCGAATTCATGAATAAATATTTTAC** -3'

PZR 35 amplifikasyon döngüsü olacak şekilde ayarlandı.

94 °C'de 3 dakika

30 saniye 94 °C'de denatürasyon	}	35 döngü
60 saniye 48 °C'de yapışma,		
90 saniye 72 °C'de uzama		

72 °C'de 10 dakika

Oluşan PZR ürünü agaroz jelde görüntülendi.

### 3.7.3. PZR Ürününün Agaroz Jelden İzolasyonu

Etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jelde yürütülen PZR bandı UV ışık kaynağı ile görüntülendi. Sonra etidyum bromürsüz jelden istenilen DNA parçası kesilerek High Pure PCR Product kiti (Roche, Germany) ile izole edildi (Kasap, 2007).

#### ***3.7.4. İzole Edilen PZR Ürününün ve MBP'yi Kodlayan pMal-c4x Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Kesimi***

Agaroz jelden izole edilen PZR ürünü ve pMal-c4x vektörü EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri (Fermentas, USA) ile kesildi. İki enzim ile kesim aynı tüpte gerçekleştirildi ve kesim için üreticinin tavsiye ettiği tampon çözelti kullanıldı.

7 µl PZR ürünü, 5 ünite EcoRI ve 5 ünite BamHI enzimleri ile 1 X EcoRI tamponu içerisinde 37 °C'de gece boyu kesildi.

0.5 µg pMal-c4x vektörü, 5 ünite EcoRI ve 5 ünite BamHI enzimleri ile 1 X EcoRI tamponu içerisinde 37 °C'de gece boyu kesildi.

Kesim sonrası reaksiyonlar birleştirilip 100 µl'ye tamamlanarak fenol-kloroform temizlemesi yapıldı.

#### ***3.7.5. Fenol-Kloroform Temizlemesi***

Restriksiyon enzimi ile kesilen pMAL-c4x vektörü ve OXA-23 DNA'sı aynı tüpte birleştirilerek fenol-kloroform temizlemesi metodu ile saflaştırıldı.

Birleştirilen ve saf su ile 100 µl'ye tamamlanan kesim reaksiyonlarına 100 µl fenol-kloroform (1:1) eklenerek iyice karıştırıldı ve 3 dakika 13,000 xg'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Üst faz temiz tüpe alındı. Üzerine eşit miktarda kloroform eklenerek iyice karıştırıldı ve 3 dakika 13,000 xg'de oda ısısında santrifüj edildi. Üst faz temiz tüpe alındı. Üzerine hacminin 1:10 oranında 3 M sodyum asetat ve 1ml % 96 etanol eklenerek kuru buzda 20 dakika bekletildi. Bekleme sonunda tüpler 20 dakika 13,000 xg'de +4 °C'de santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı. Çöken DNA'lara 1 ml % 70 etanol eklenerek 5 dakika 13,000 xg'de +4 °C'de santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve etanol iyice uçurulduktan sonra çöken DNA'lar ligasyon reaksiyonunda kullanılacak miktardaki saf su ile çözüldü.



### **3.7.6. Ligasyon Reaksiyonu**

Fenol-kloroform temizlemesinin son aşamasında çöken DNA'lar 8,5 µl su ile çözüldü ve içerisine 1 X T4 DNA ligaz tamponu ve 2,5 ünite T4 DNA ligaz eklenerek son hacim 10 µl olacak şekilde ligasyon reaksiyonu kuruldu ve +16 °C'de gece boyu bekletildi. *E. coli* K12 TB1 alıcı hücrelerine elektroporasyon ile aktarıldı.

### **3.7.7. Elektroporasyon**

Elektroporasyon, Elektroporatör 2510 (Eppendorf, USA) kullanılarak 10 µF ve 1700 V akım kullanılarak yapıldı. Sıvı azotta dondurulmuş 40 µl *E. coli* K12 TB1 alıcı hücreleri buzun üzerinde eritildi ve 2 µl ligasyon reaksiyonu eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırıldı. Önceden soğutulmuş 1 mm çaplı 100 µl'ye kadar hacmi olan elektroporasyon küvetine konulan karışıma akım uygulandıktan sonra üzerine 500 µl zengin besiyeri eklendi ve 2 saat 37 °C'de 250 xg'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler ampisilin 100 µg/ml içeren MH agar besiyerine ekildi ve 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. Antibiyotikli besiyerde sadece klonu içeren bakterilerin büyümesi beklendi.

### **3.7.8. Rekombinant Vektörü İçeren Koloninin Tespiti**

Ampisilin 100 µg/ml içeren MH agar üzerinde büyüyen koloniler tek koloni pasajı ile çoğaltılarak plazmit DNA izolasyonu ve EcoRI - BamHI restriksiyon enzim kesimleri yapıldı. Böylece pMal-c4x-OXA-23 klonunu içeren hücre belirlendi.

### **3.7.9. *bla*<sub>OXA-23</sub> Geninin pMal-p4x Vektörüne Klonlanması**

pMal-c4x vektörüne klonlanan *bla*<sub>OXA-23</sub> geni sub-klonlama ile pMal-p4x vektörüne aynı kesim siteleri ve aynı metotlar kullanılarak klonlandı.

### **3.7.10. MBP-OXA23 Füzyon Proteininin Saflaştırması**

Klonu içeren bakteri 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml zengin besiyerine ekilerek 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Büyüyen kültürün 200 µl’si 100 µg/ml ampisilin içeren 600 ml zengin besiyerine ekildi. OD<sub>600</sub> ~ 0,5 ( 2 x 10<sup>8</sup> hücre/ ml) olduğunda son konsantrasyonu 0,3 mM olacak şekilde IPTG eklendi ve 37 °C’de 3 saat daha inkübe edildi. Hücreler 3,500 xg’de 15 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Üstte kalan kısım atılarak hücreler buz üzerinde 5 ml kolon tamponu ile çözüldü. Etanol-kuru buz karışımında hücreler donduruldu. Donan hücreler buz üzerinde çözüldü ve işlenmemiş protein çözeltisi hazırlandı. İşlenmemiş protein çözeltisi içine 500 µl amiloz rezin eklendi ve oda ısısında gece boyu sallanarak füzyon proteinin amiloz rezine bağlanması sağlandı. Ertesi gün rezine bağlanmayan enzim 500 xg’de 5 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Materyal toplamda 50 ml olacak şekilde kolon tamponu ile yıkandı. Her aşamada nitrosetin aktivitesine bakıldı. Füzyon proteinin fraksiyonlarla alınması aşamasında kolon tamponu 10 mM maltoz içerdi. Enzim kolondan 10 adet 200 µl’lik fraksiyonlar haline uzaklaştırıldı ve her fraksiyonun nitrosetin aktivitesine bakıldı. Toplanan fraksiyonlar protein jel elektroforezinde yürütüldü. Saf proteini içeren fraksiyonlar sıvı azot tankında 20 µl’lik damlalar olarak saklandı.

### **3.7.11. MBP-OXA-23 Füzyon Proteininin Faktör-Xa ile Kesimi**

Protein konsantrasyonu ml ‘de en az 1 mg olacak şekilde konsantre edildi. Yirmi µl füzyon protein 1 µl 200 µg/ml Faktör-Xa ile karıştırılarak oda ısısında kesime bırakıldı. Kesim verimini arttırmak amaçlı alternatif olarak kesim reaksiyonuna % 0.01 SDS ve farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 100 mM) maltoz eklendi.

### **3.8. Protein Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

#### **3.8.1. Solüsyonlar**

Akrilamid – bisakrilamid (% 30) hazırlamak için 29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid tartılıp 100 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C’de saklandı.

Amonyum persülfat (APS) (% 10) hazırlamak için 1 g APS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C’de saklandı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10) hazırlamak için 1 g SDS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

Ticari olarak satılan N,N,N', N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) kullanıldı (Sigma, USA).

#### **3.8.2. Sabitleştirici, Boyama ve Boya Uzaklaştırıcı Solüsyonlar**

Sabitleştirici solüsyon için 40 ml metanol ve 10 ml asetik asit karıştırılarak su ile 100 ml’ye tamamlandı. Sabitleştirici solüsyonun içerisine 0,25 g Coomassie mavisi eklenerek boyama solüsyonu hazırlandı.

Jel zeminindeki fazla boyayı uzaklaştırmak için boya uzaklaştırma işlemi yapıldı. Fazla boyayı uzaklaştırmak için jel 40 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 60 ml saf su çözeltisi ile 30 dakika oda sıcaklığında yıkandı.

#### **3.8.3. Ayırma Jeli ( % 12 )**

Ayırma jeli (% 12) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı (Laemmli, 1970).

Saf su	:1,75 ml
1.5 M Tris.Cl pH 8.8	:1,25 ml
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	:2 ml
% 10 SDS	:50 µl

% 10 APS	:25 µl
TEMED	:2,5 µl

#### 3.8.4. *Yükleme Jeli ( % 4 )*

Yükleme jeli (% 4) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı (Laemmli, 1970).

Saf su	:1,50 ml
0.5 M Tris.Cl pH 6.8	:625 µl
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	:325 µl
% 10 SDS	:25 µl
% 10 APS	:12,5 µl
TEMED	:2,5 µl

İki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasına önce ayırma jeli üstten 5 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeyine 2 mm yüksekliğe kadar su ile doyurulmuş n-bütanol pipet ile eklendi. Jel polimerize olduktan sonra n-bütanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı ile cam plakalar arası temizlendi ve ayırma jeli eklenerek yüklemeye tarağı yerleştirildi. Polimerize olan jel tanka yerleştirildi. Yüklenmek istenen protein çözeltilerinin hacimlerine göre 6 X yüklemeye tamponu 1 X olacak şekilde eklendi. Protein çözeltileri 95 °C'de 3 dakika kaynatılarak buz üzerine alındı ve kısa bir santrifüjden sonra mikropipet yardımıyla yüklemeye gözlerine yüklenerek 180 V'da 60 dakika yürütüldü. Yürüme sonunda jel cam plakalardan çıkarıldı ve 30 dakika sabitleştirici solüsyonda yıkandı. Daha sonra jel Coomassie mavisi içeren boyama solüsyonunda yıkandı. Protein bantları belirteç bantları ile karşılaştırılarak belirlendi.

### 3.9. OXA-23'ün Kinetik Ölçümleri

Çalışılacak antibiyotiğin başlangıç yoğunluğu antibiyotiğin tablodaki molar absorpsiyon katsayısı ( $\Delta\epsilon$ ) değerine göre hesaplandı (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** OXA-23 kinetik ölçümlerinde kullanılan antibiyotiklerin dalga boyu ( $\lambda$ ) ve  $\Delta\epsilon$  değerleri

Antibiyotik	$\lambda$ (nm)	$\Delta\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
Ampisilin	230	-900
Penisilin G	235	-780
Piperasilin	235	-1640
İmipenem	300	-9000
Meropenem	300	-9500
Nitrosefin	482	15000
Sefepim	260	-10000
Seftazidim	260	-6916

Spektrofotometrik aktiviteler 30 °C'de ve uygun dalga boylarında ölçüldü. Cihaz su ile kör okuma yapılarak sıfırlandı. PBS tamponu içerisinde hazırlanan substratların konsantrasyonları  $\Delta\epsilon$  değerleri baz alınarak aşağıdaki gibi ayarlandı. Lambert-Beer kuralına göre:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A: Substratın absorbans

$\epsilon$ : Molar absorpsiyon katsayısı ( $M^{-1} cm^{-1}$ )

b: Işık yolu kalınlığı (1cm)

c: Substrat konsantrasyonu (M)

$c$  ( $\mu M$ ) =  $OD_{\lambda} \cdot 10^6 / \Delta\epsilon_{\lambda}$  formüle göre hesaplandı (Laidler, 1993).

Her substrat için enzimin başlangıç miktarı belirlendi. Enzim küvete konuldu ve üzerine mikropipetle olabildiğince hızlı bir şekilde substrat eklenerek homojen bir karışım oluşması sağlandı. Çalışılan her antibiyotik için belirtilen dalga boylarında (Çizelge 3.3) reaksiyondaki absorbans değişimi ( $\Delta A/min$ ) kaydedildi. Kontrol okumada oto hidrolizden kaynaklanan herhangi bir değişim ölçüldüğünde bu değişim enzim tarafından gerçekleştirilen enzim aktivitesinden çıkartıldı. Her substrat ile üç

kere ölçüm yapıldı. Değerler grafik çizim programında çizelge yapılarak Synex ChemSW Enzyme Kinetic Pro™ (version 2.36) (Fairfield, CA) yazılım programına göre değerlendirildi.

Sabit miktarda enzim farklı konsantrasyondaki klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam inhibitörleri ile muamele edilerek nitrosefin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonları belirlendi. Klavulanik asitten (0,25 g/ml) 1/1, 10<sup>-1</sup>, 1/50, 10<sup>-2</sup>; tazobaktamdan (0,1 g/ml) 1/1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> ve sulbaktamdan (0,15 g/ml) 1/1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dilüsyonlar yapılarak 10 µl'si enzim ile karıştırıldı ve nitrosefin aktivitesini belirlendi.

### 3.10. OXA-23 Modelleme Çalışmaları

OXA-23'e ait üç boyutlu bir yapının bulunmayışı nedeni ile daha önce belirlenmiş ve Protein Data Bankasına (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) eklenmiş OXA-24 ( PDB ulaşım no: 2jc7) üç boyutlu yapısı üzerinden Swiss Model kullanılarak bir model yapıldı (<http://www.swiss-model.expasy.org> ). Elde edilen modelin doğruluğu ve kalitesi OXA-23 ve OXA-24 arasındaki eşdeğer atomların kareköklerinin deviasyonuna (RMSD) bakılarak değerlendirildi. Tahmin edilen OXA-24 yapısı üç farklı görüntüleme programı ile analiz edildi. Bu programlar sırası ile MolMol (<http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>), Swiss-Pdb Görüntüleyici (<http://www.expasy.org/spdv/>) ve PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>)' dur. Swiss-Pdb görüntüleyicide süper impozisyon ve RMSD hesaplaması için iterative magic fit algoritması kullanılırken MolMol içerisinde fit algoritması kontrol paneli üzerinden kullanıldı. Aktif site amino asitlerinin görüntülenmesi PyMOL aracılığı ile MBP-OXA23 füzyon proteini MolMol aracılığı ile gösterildi. Yüzey elektrostatik potansiyel yük dağılımı MolMol programı ile yapıldı. Amino asit dizileri Clustel X ile karşılaştırıldı. OXA-23 ve OXA-24 üzerindeki esnek ve esnek olmayan bölgeler FIRST programı kullanılarak (<http://firstweb.asu.edu>) tahmin edildi.

### **3.11. Farklı Klonların Nitrosefin Aktivitelerine Bağlı Ünite Tanımlanması, Bu Ünitelerin Eşitlenmesi ve IPM ve MEM Aktiviteleri**

pAc-KOU1, pMal-c4x-OXA-23 ve pMa-p4x-OXA-23 rekombinant vektörlerini içeren bakteriler uygun antibiyotikli besiyerlerine ekildi ve işlenmemiş protein çözeltileri hazırlandı. Elde edilen işlenmemiş protein çözeltilerinin nitrosefin hidrolizleri ölçüldü. Dakikadaki absorban değişimine göre hidroliz edilen nitrosefinin konsantrasyonu hesaplandı. Assay hacmine göre hidroliz edilen nitrosefinin konsantrasyonu nmol'e çevrildi. 100 nmol nitrosefini bir dakikada hidroliz eden enzim miktarı bir ünite olarak tanımlandı. İşlenmemiş protein çözeltilerinin nitrosefini hidroliz miktarları ünite cinsinden hesaplandı ve seyreltilerek nitrosefin aktiviteleri eşitlendi. Eşit nitrosefin aktivesine sahip bu seyreltilmiş işlenmemiş protein çözeltilerinin imipenem ve meropenem aktiviteleri ölçülerek karşılaştırıldı.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Sıcaklık Uygulaması ile Saflaştırma

OXA-23'ün sıcaklık uygulanarak yapılan saflaştırmasında proteinin denenen hiçbir sıcaklıkta istenilen derecede saflaşmadığı ve hatta uygulanan sıcaklık şokunun proteini denatüre ederek aktivitesinin büyük çoğunluğunu kaybetmesine neden olduğu görüldü. Elde edilen en yüksek saflaştırma derecesi % 29 geri kazanımla 0,8 kat olarak 45 °C'de gözlemlendi. Sıcaklık arttıkça hem geri kazanımın hem de saflaştırma derecesinin düşüşü OXA-23'ün "ısıya dayanıksız" bir protein özelliği taşıdığını gösterdi.

**Çizelge 4.1.** OXA-23 enziminin sıcaklık inaktivasyonu ile saflaştırılması

	Toplam Ünite (nmol/dak 10 <sup>-7</sup> )	Toplam Protein (mg)	Özgül Aktivite (U/mg 10 <sup>-7</sup> )	Saflaştırma Oranı	% Geri Kazanım
<b>İşlenmemiş Protein Çözeltilisi</b>	24	0,92	26		
<b>45 °C</b>	7	0,324	21	0,8	29
<b>55 °C</b>	0,6	0,22	2,7	0,1	2,5
<b>60 °C</b>	0,02	0,1	0,2	0,007	0,08

### 4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Benzer şekilde amonyum sülfat çöktürmesi ile yapılan saflaştırma denemelerinde OXA-23'ün kullanılan hiçbir amonyum sülfat konsantrasyonunda istenilen saflaştırmayı vermediğini gösterdi. Arzu edilen doğrultuda olsaydı eğer OXA-23'ün çoğunluğunun ya sıvı fazda ya da çökelekte olması beklenilirdi. Test



edilen üç farklı amonyum sülfat konsantrasyonundan saflaştırma amaçlı en faydalı görüneni % 50 amonyum sülfat ile yapıları olup % 12'lik bir geri kazanımla 2 kez saflaştırma sağlandı. İki kat saflaştırma tipik bir amonyum sülfat saflaştırma oranı olmasına rağmen elde edilen geri kazanımın düşük oluşu bu metodunda OXA-23 için uygun bir metot olmadığını gösterdi. Amonyum sülfat çöktürmesi geri kazanımı yüksek olması halinde tercih edilen bir metot olup bir sonraki saflaştırma adımından önce tuzdan kurtulmak için diyaliz yapımını gerektirir. Protein saflaştırılmasında prosedüre eklenen her bir adımın son aşamada elde edilecek saf proteinden kayıba neden olması amonyum sülfatın ancak yüksek geri kazanımlarda kullanılabilmesine işaret etmektedir.

**Çizelge 4.2.** OXA-23 enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılması

	<b>Toplam Ünite (nmol/dak 10<sup>-7</sup>)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Özgül Aktivite (U/mg 10<sup>-7</sup>)</b>	<b>Saflaştırma Oranı</b>	<b>% Geri Kazanım</b>
<b>İşlenmemiş Protein Çözeltisi</b>	50	1,8	30		
<b>% 30 Çökelek</b>	2,4	0,06	40	1,3	4,8
<b>% 30 Üst Faz</b>	5	0,224	20	0,6	10
<b>% 50 Çökelek</b>	6,4	0,104	60	2	12,8
<b>% 50 Üst Faz</b>	1,2	0,192	6	0,2	2,4
<b>% 70 Çökelek</b>	7,4	0,284	26	0,9	14,8
<b>% 70 Üst Faz</b>	0,2	0,038	5	0,16	0,4

### 4.3. Anyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma

Q-Sepharose anyon değişimi kromatografisi 4 farklı tampon çözeltisi ve iki farklı tuz eluenti ile denemiş olmasına rağmen test edilen hiçbir koşulda istenilen saflıkta ve geri kazanımda OXA-23 eldesine izin vermedi.

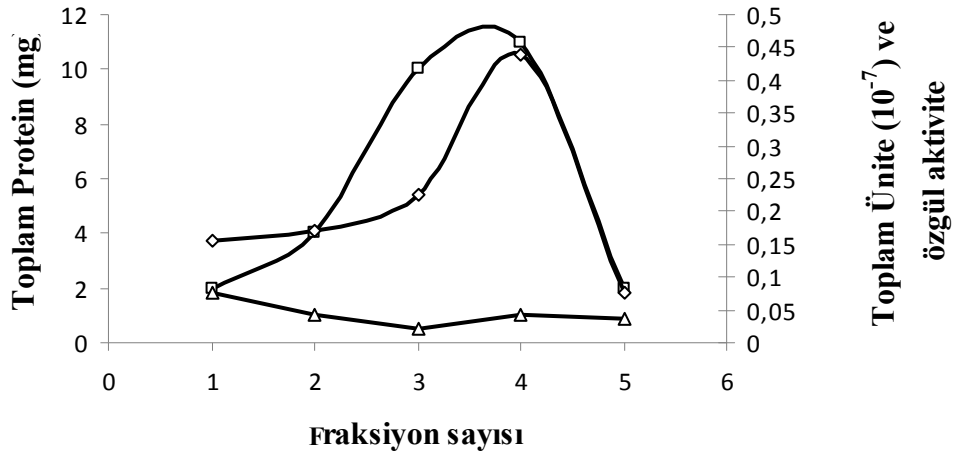
**Çizelge 4.3.** OXA-23 enziminin saflaştırılmasında anyon değiştirici kromatografide kullanılan parametreler

<b>Kullanılan Tuz Çözeltileri</b>	<b>Anyon Değiştirici Tamponları</b>
NaCl	50mM Tris.Cl pH 9,2 50mm Tris.Cl pH 8,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50mM Tris.H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 9,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50mM HEPES pH 8,0

Ortamın pH'sı 9,2'de tutulmasına ve böylelikle OXA-23'ün net eksi yükle yüklenmiş olması zorlanmış olmasına rağmen anyon değişim kolonuna bağlanmanın zayıf olduğu ve proteinin yıkamalar sırasında seyreltik bir şekilde geldiği görüldü. Buna ilaveten kolona bağlanan proteinin tuz gradienti ile indirilmesi halinde de OXA-23'ün diğer birçok proteinle birlikte kolondan indiği ve bu yüzden de saflaşmadığı gözlemlendi (Çizelge 4.4.) Aktif fraksiyonlarda yapılan ölçümde % 20 geri kazanımın % 82'lik protein geri kazanımı ile uyuşmayışı OXA-23'ün bu kolonda aktivite kaybettiğini de göstermektedir.

**Çizelge 4.4.** Anyon değiştirici kromatogafi sonucu

<b>Anyon Değiştirici Kromatografi</b>	<b>Toplam ünite (nmol/dak 10<sup>-7</sup>)</b>	<b>Toplam protein (mg)</b>	<b>Özgül aktivite (U/mg 10<sup>-7</sup>)</b>	<b>Saflaştırma oranı</b>	<b>% Geri kazanım</b>
<b>İşlenmemiş protein çözeltisi</b>	5,32	35	0,14		
<b>Fraksiyon 1</b>	0,155	2	0,0775	0,5	3
<b>Fraksiyon 2</b>	0,17	4	0,0425	0,3	3,2
<b>Fraksiyon 3</b>	0,225	10	0,0225	0,16	4,2
<b>Fraksiyon 4</b>	0,44	11	0,0415	0,3	8,2
<b>Fraksiyon 5</b>	0,075	2	0,0375	0,26	1,4



**Şekil 4.1.** Anyon değiştirici kromatografi sonucu. Toplam protein □, özgül aktivite Δ, Toplam ünite ◇ sembollerleriyle gösterilmiştir.

#### 4.4. Katyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma

Katyon değişim kromatografisi iki farklı tamponla iki farklı pH'da gerçekleştirildi.

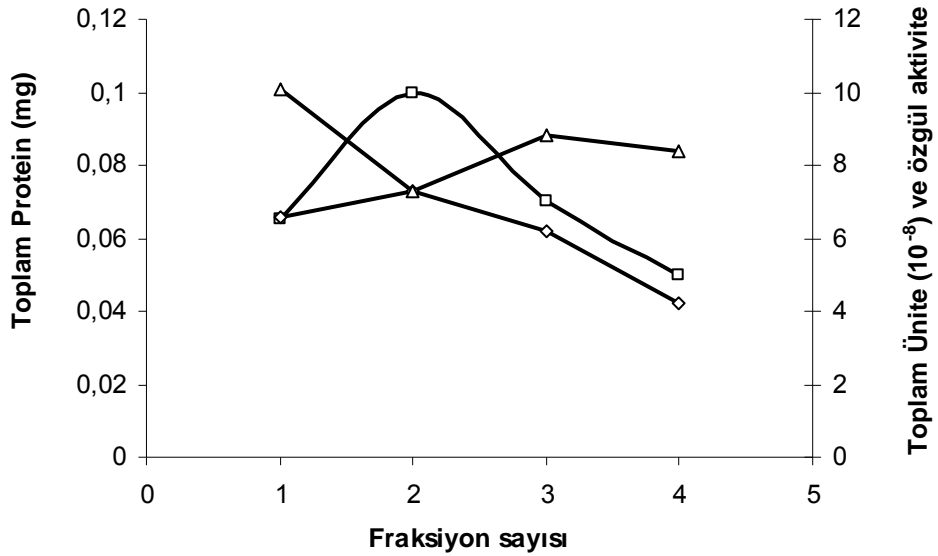
**Çizelge 4.5.** OXA-23 enziminin saflaştırılmasında katyon değiştirici kromatografide kullanılan parametreler

Kullanılan Tuz özeltileri	Katyon Değiştirici Tamponları
NaCl	50 mM MES pH 5,5
NaCl	50 mM Sodyum Asetat pH 6,0

pH 5,5'de OXA-23'ün net yükünün pozitif olması ve kolona güçlü bir şekilde bağlanması beklendiği halde kromatografi sonrasında OXA-23'ün sadece % 20 sinin aktivitesini kaybetmeden kolondan indiği ve bu % 20'ninde % 7'sinin yıkamalar sırasında geldiği gözlemlendi. Katyon değişim kromatografisi yukarıda bahsedilen diğer metotlar gibi OXA-23'ün saflaştırılmasında kullanılamaz.

**Çizelge 4.6.** Katyon değiştirici kromatografi sonucu

Katyon Değiştirici Kromatografi	Toplam ünite ( nmol/dak $10^{-7}$ )	Toplam protein (mg)	Özgöl aktivite (U/mg $10^{-8}$ )	Saflaştırma oranı	% Geri kazanım
İşlenmemiş protein çöztelisi	1270	15	84,6		
Yıkama 1	61	5,5	2,22	0,03	4,8
Yıkama 2	29	8,5	3,41	0,04	2,28
Fraksiyon 1	6,6	0,065	10,1	1,2	0,5
Fraksiyon 2	7,3	0,1	7,3	0,52	0,57
Fraksiyon 3	6,2	0,07	8,8	0,8	0,49
Fraksiyon 4	4,2	0,05	8,4	1	0,33



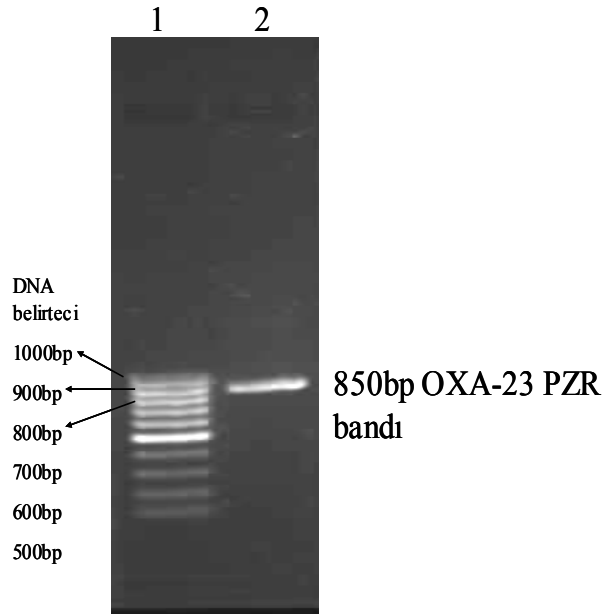
**Şekil 4.2.** Katyon değiştirici kromatografi sonucu. Toplam protein □, özgöl aktivite Δ, Toplam ünite ◇ sembolleriyle gösterilmiştir.

#### 4.5. Kontrol Deneyi-VIM5'in Saflaştırılması

OXA-23'ün anyon ve katyon değişim kromatografisinden saflaşmayışı, akla bu kolonların satın alınan firmaca iyi üretilemediği veya laboratuvarında uygun koşullarda saklanmadığı için çalışmadığı ihtimalini getirmektedir. Bu ihtimallerin doğru olmadığını göstermek için aynı kolonları kullanarak yapılan VIM-5 enzimi saflaştırılması referans alınabilir. Yapılan saflaştırma işlemi sonucunda VIM-5'in % 48 geri kazanımla 10 kat saflaştığı bulunmuştur (Gacar et al., 2005). Ayrıca, DEAE-25 (Whatman, USA) anyon değiştirme kolon materyalide laboratuvarımızda oluşturduğumuz kolon içerisine paketlenip OXA-23 saflaştırması için kullanıldı. Alınan sonuçlar bu materyalinde Q-Sepharose benzeri sonuçlar verdiğini gösterdi. Bu nedenle klasik saflaştırma metotları yerine OXA-23'ün saflaştırılması için rekombinant füzyon sistemlerinin denenmesi kararlaştırıldı.

#### 4.6. OXA-23 Füzyon Proteininin Saflaştırılması

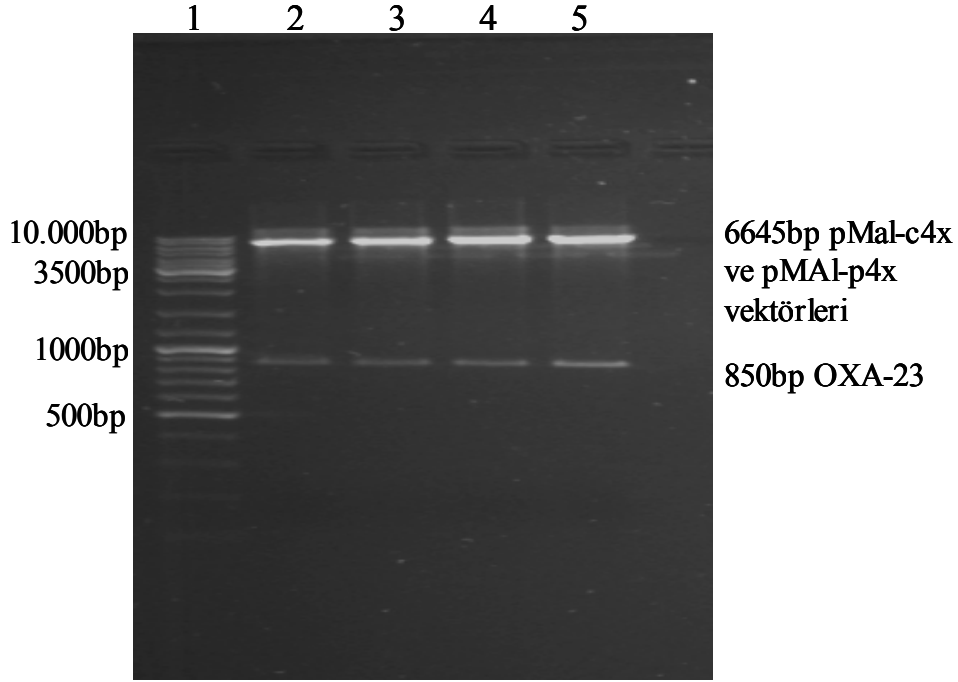
OXA-23 geni PZR ile pAc-KOU1 üzerinden agaroz üzerinde tek band verecek şekilde çoğaltıldı (şekil 4.3).



**şekil 4.3.** OXA-23 genini içeren PZR ürünü agaroz jel görüntüsü.

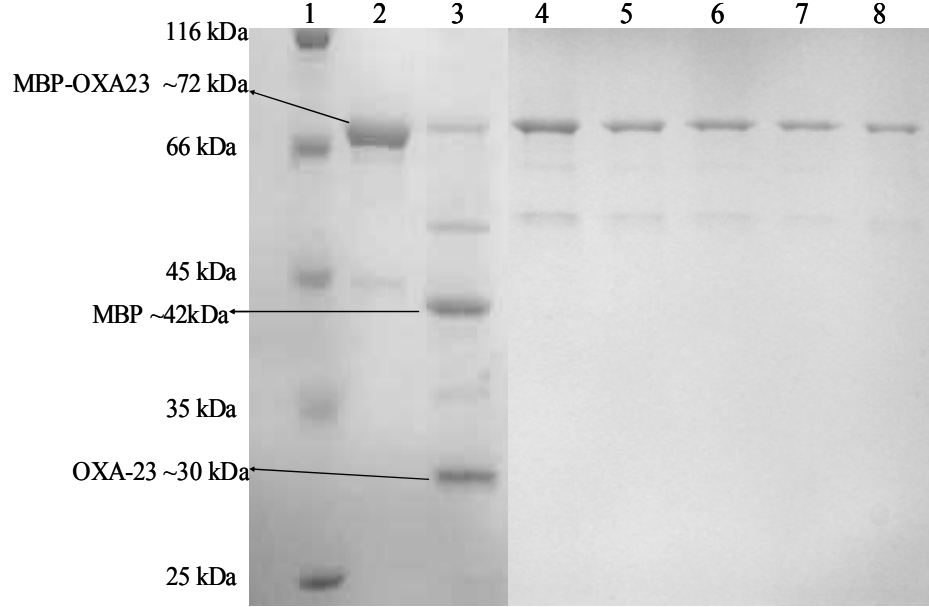
1. DNA belirteci (100bp DNA ladder Fermentas, USA), 2. PZR ürünü OXA-23

PZR’de kullanılan primerlerde EcoRI ve BamHI kesim bölgeleri olduğu için bu iki kesim bölgeleri kullanılarak OXA-23 geni pMal-p4x ve pMal-c4x üzerine klonlandı (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** pMal-c4x-OXA23 ve pMal-p4x-OXA23 klon plazmitlerin EcoRI- BamHI restriksiyon enzimleri ile kesimi. 1. DNA belirteci (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas, USA ), 2. EcoRI- BamHI kesilmiş klon 1 pMal-c4X-OXA23, 3.EcoRI- BamHI kesilmiş klon 2 pMal-c4X-OXA23, 4. EcoRI- BamHI kesilmiş klon 1 pMal-p4X-OXA23, 5. EcoRI- BamHI kesilmiş klon 2 pMal-p4X-OXA23

Klonlamayı takiben füzyon proteini uygun şartlarda *E. coli* K12 içerisinde ekprese edildi. Amiloz rezini üzerinden metotlar kısmında tarif edildiği şekilde saflaştırıldı ve SDS-PAGE üzerinde saflık derecesi onaylandı (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** MBP-OXA-23 füzyon protein Faktör-Xa kesimi ve saf fraksiyonların SDS-PAGE görüntüsü. 1. Protein Belirteci (Fermantas, USA); 2. Saf MBP-OXA-23 füzyon protein; 3. Faktör-Xa ile kesilmiş MBP-OXA-23 füzyon protein; 4. Saf MBP-OXA-23 füzyon protein #1; 5. Saf MBP-OXA-23 füzyon protein #2; 6. Saf MBP-OXA-23 füzyon protein #3; 7. Saf MBP-OXA-23 füzyon protein #4; 8. Saf MBP-OXA-23 füzyon protein #5.

SDS-PAGE üzerinde 72 kDa bölgesinde gözlemlenen tek band füzyon MBP-OXA-23'ün yüksek oranda saflaştığını gösterdi.

#### 4.7. OXA-23'ün MBP'den Ayırıştırılması

OXA-23'ü füzyon yapıldığı protein olan MBP'den ayırmak için saf protein Faktör-Xa ile metotlarda tarif edildiği gibi kesime bırakıldı. Kesim sonuçları OXA-23'ün gece boyu süren kesimlerde % 100 olmasa da büyük çoğunluğunun kesildiğini ancak kesilen proteinin aktif olarak MBP'den ayırıştırılamayacağını gösterdi. Kısa süreli kesimler ise (2-3 saat, oda sıcaklığında) Faktör-Xa'nın füzyon proteinini çok

düşük seviyede kestiğini ve dolayısı ile kesimin pratik bir anlam ifade etmeyeceğini gösterdi. Kesim verimini artırmak için ortama eklenmesi tavsiye edilen düşük miktardaki SDS hem kesim verimini arttırmadı hem de proteinin aktivitesini kaybetmesine neden oldu. Bu nedenle kinetik çalışmalar enzimin özgün özelliklerini etkilemeyeceğini düşündüğümüz MBP-füzyonu ile yapıldı (Kapust and Waugh, 1999).

#### 4.8. MBP'nin OXA-23 Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

MBP'nin OXA-23 hidroliz aktivitesi üzerinde etkisinin olup olmadığını gösterebilmek için enzimin üç farklı klondan ekspresyonu (pAc-KOU1, pMal-c4x-OXA-23 ve pMal-p4x-OXA-23) yapıldı. Her bir eksprese OXA-23 ile nitrosefin aktivitesi bakıldı. Nitrosefin aktiviteleri temel alınarak yapılan dilüsyonlarla OXA-23 nitrosefin hidroliz aktiviteleri eşitlendi.

**Çizelge 4.7.** Farklı klonların nitrosefin aktivitelerine bağlı ünite tanımlanması ve bu ünitelerin eşitlenmesi

<b>Klon ismi</b>	<b>Nitrosefin ünitesi</b>	<b>Üniteleri eşitlemek için kullanılacak enzim dilüsyonları</b>
pAc-KOU1	0,11	2,7 X
pMal-c4x-OXA-23	0,6	16,2 X
pMal-p4x-OXA-23	0,037	1 X

Nitrosefin aktiviteleri eşitlenmiş işlenmemiş protein çözeltileri ile imipenem ve meropenem hidrolizi çalışıldı. Sonuçlar sitoplazmik olarak eksprese edilen füzyon proteininin diğer OXA-23'lere oranla aktivite kaybetmediğini ve hatta 3,2 kat daha aktif olduğunu gösterdi (Çizelge 4.8).



**Çizelge 4.8.** Nitrosefin aktiviteleri eşdeğer işlenmemiş protein çözeltilerinin IPM ve MEM aktiviteleri

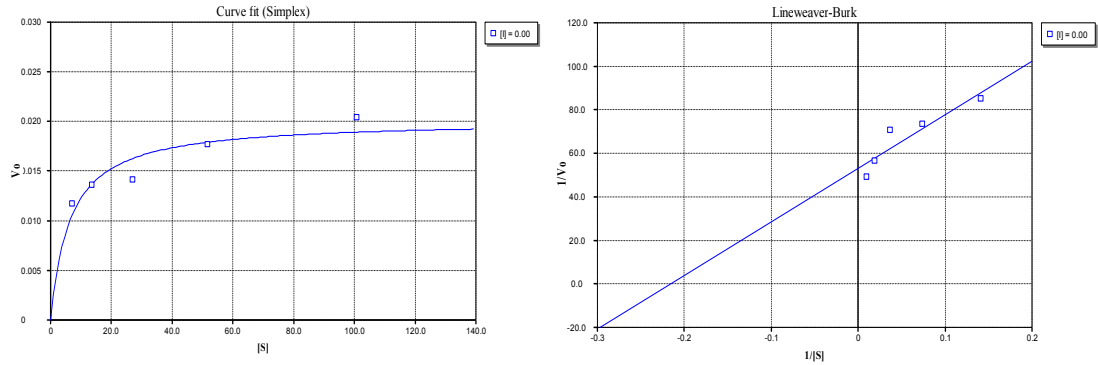
Klon ismi	Vektör ismi	IPM $\Delta A/\text{dak}$	MEM $\Delta A/\text{dak}$
pAc-KOU1	pBK-CMV	0,0200 $\pm$ 0,0002	0,0037 $\pm$ 0,0006
pMal-c4x-OXA-23	pMal-c4x	0,064 $\pm$ 0,018	0,0055 $\pm$ 0,0009
pMal-p4x-OXA-23	pMal-p4x	0,0138 $\pm$ 0,0003	0,0030 $\pm$ 0,0005

Not: Enzim aktiviteleri üç kez ölçülmüştür.

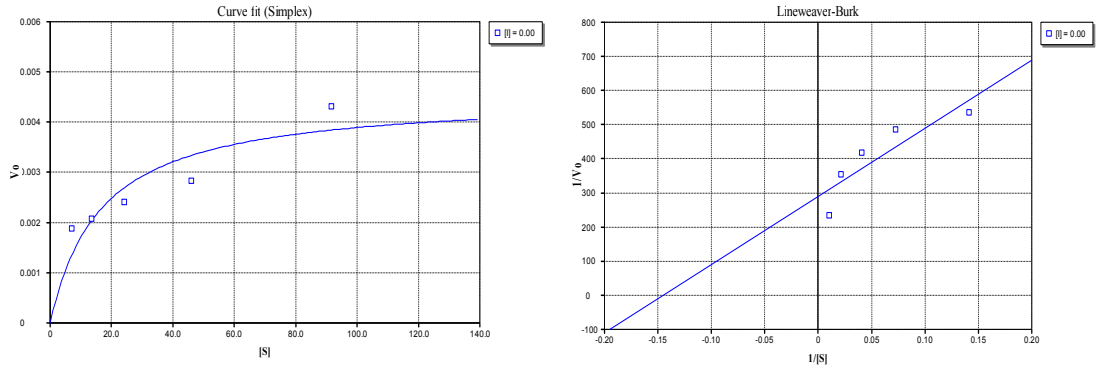
#### 4.9. OXA-23 Füzyon Proteininin Kinetiği

Materyal metotta yazıldığı gibi OXA-23'ün farklı substratlar ile Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.6).

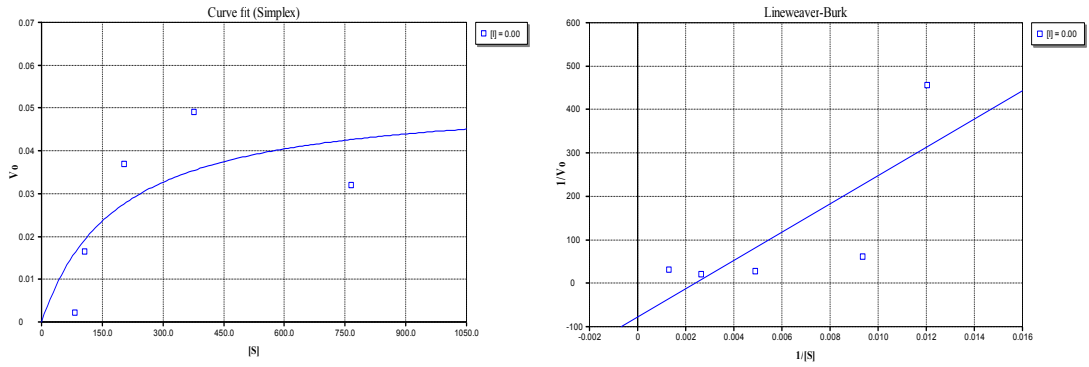
#### İmipenem–OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



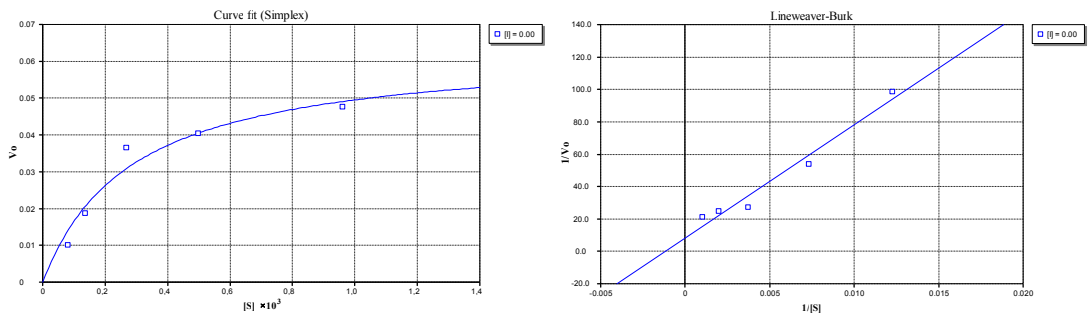
## Meropenem-OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



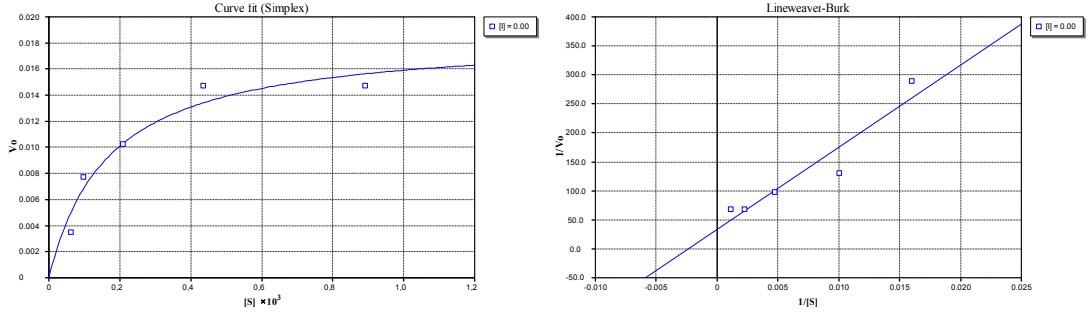
## Penisilin G-OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



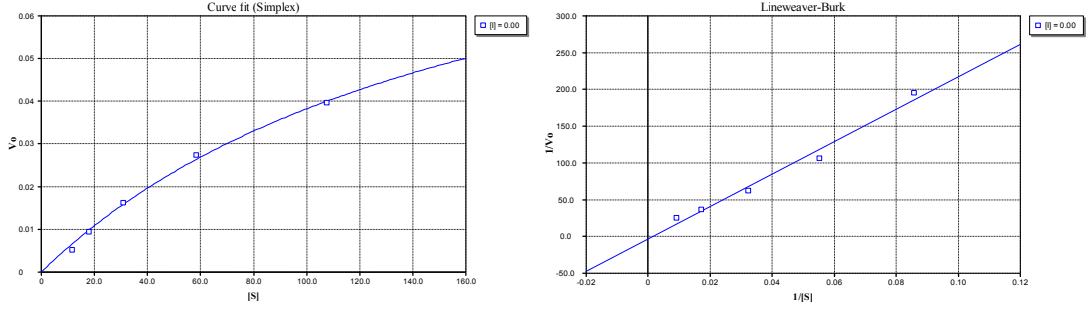
## Piperasilin-OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



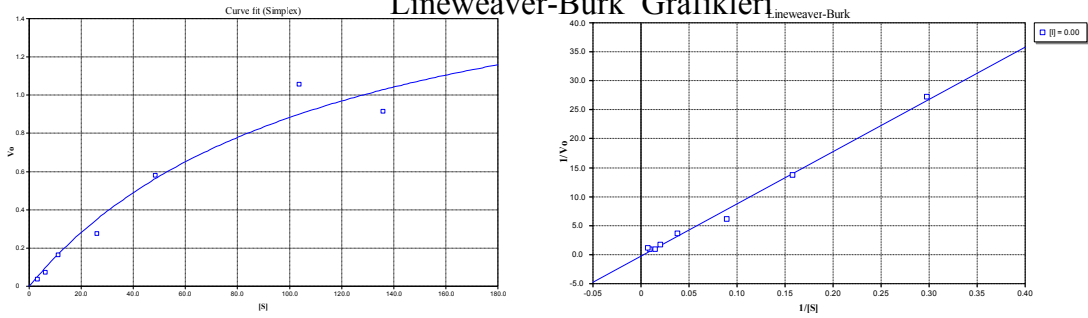
### Ampisilin-OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



### Sefepim-OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



### Nitrozefin-OXA23 reaksiyonu Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk Grafikleri



**Şekil 4.6.** MBP-OXA-23 füzyon proteininin farklı substratlar ile Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri.

Bu grafik değerlerinden hesaplanan kinetik değerler ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  ve  $k_{cat}/K_m$ ) çizelgede verildi (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** OXA-23 enziminin kinetik değerleri

Substratlar	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu M/sn$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1}sn^{-1}$ )
Ampisilin	161	0,02	31	200
Penisilin G	188	0,05	78	400
Piperasilin	302	0,06	47	150
İmipenem	6,26	0,02	2,8	450
Meropenem	17	0,004	0,7	40
Nitrosefin	108,75	1,9	1500	13800
Sefepim	173	0,1	3	18
Seftazidim	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi

Sabit miktarda OXA-23 füzyon proteininin farklı konsantrasyondaki klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam inhibitörleri ile nitrosefin aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu belirlendi (Çizelge 4.10).

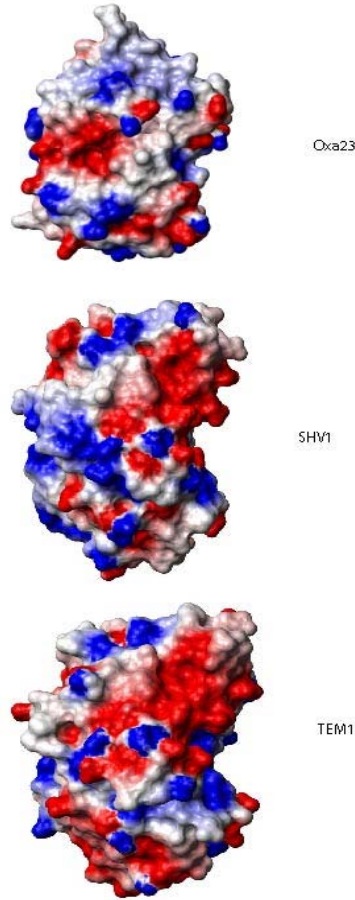
**Çizelge 4.10.** OXA-23'ün farklı inhibitörler ile nitrosefin aktivitesini yarıya indirdiği inhibitör konsantrasyonu.

<b>İnhibitör Konsantrasyonu <math>IC_{50}</math> (mM)</b>			
	<b>Tazobaktam</b>	<b>Klavulanik asit</b>	<b>Sulbaktam</b>
<b>OXA-23</b>	31	210	3300

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. OXA-23'ün Saflaştırılması

Bu çalışma ile klasik protein saflaştırma yöntemlerinin OXA-23 üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu daha önce OXA-2 üzerinde çalışan Holland ve Dale tarafından fark edilmiş olup OXA-2'nin saflaştırılması amaçlı daha uygun bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır (Holland and Dale, 1984). OXA-23'ün iyon değişim kromatografisinde matriks maddelerine bağlanmayışı bu proteinin yüzey yük dağılımının yoğun bir biçimde nötral amino asitlerce tutulduğuna işaret etmektedir. Yapılan elektrostatik yüzey yük dağılımı analizi deneysel yolla fark edilen bu gerçeği doğrular yöndedir. OXA-23'ün yüzeyi ağırlıklı olarak yüksüz amino asitlerce kaplanmıştır (Şekil 5.1).

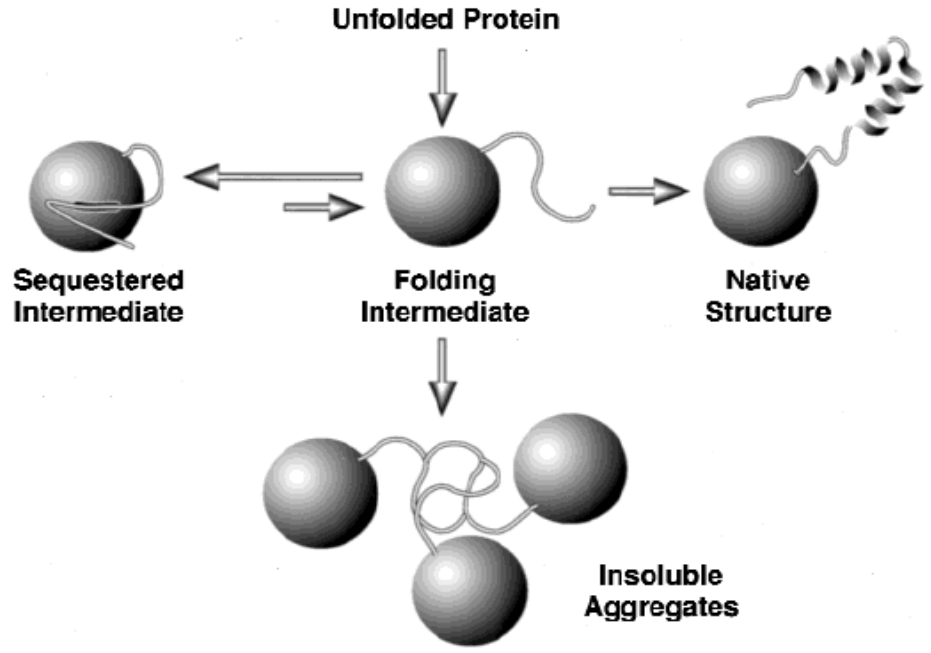


Şekil 5.1. OXA-23, SHV-1 ve TEM-1 proteinlerinin yüzey yük dağılımı

Bunun aksine klasik metodlarla kolayca saflaştırılabilen SHV ve TEM proteinlerinin yüzey yük dağılımı OXA-23'den oldukça farklıdır ve hem negatif hem de pozitif yüklü amino asitlerle kaplanmıştır. Bu nedendir ki bu proteinler hem anyon hem de katyon değişim kromatografisi ile kolayca saflaştırılabilenmektedir.

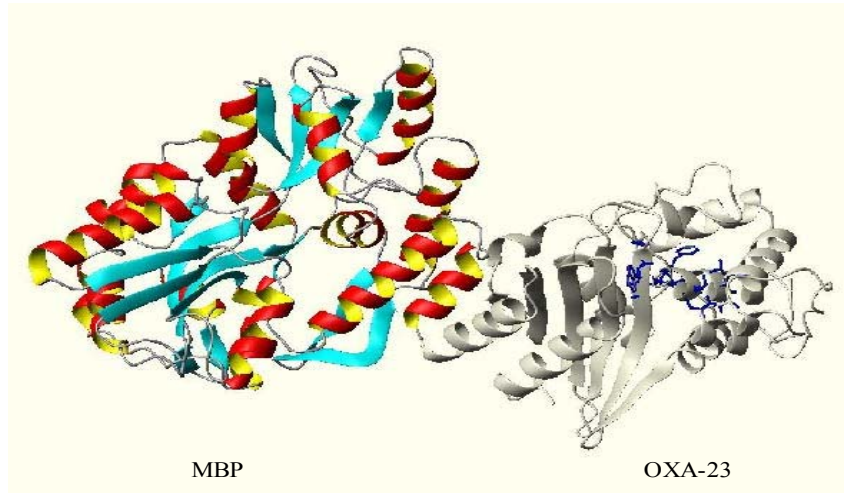
Bu çalışmada OXA-23, MBP-proteinine füzyon yolu ile bağlanmış ve rekombinant protein tek adımda saflaştırılmıştır. OXA-23'ün MBP'den ayrıştırılması amaçlı yapılan Faktör-Xa kesimi başarısızlıkla sonuçlanmış ve bu nedenle OXA-23'e ait kinetik parametreler füzyon proteini ile belirlenmiştir. Faktör-Xa'nın başarısızlığı bu proteine ait kesim bölgesinin füzyon sırasında erişimi zor bir noktaya katlanmasından kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle ortama NEB Lab. Inc.'ce tavsiye edildiği şekilde eklenen düşük miktardaki SDS, Faktör-Xa kesimini arttırmışsa da OXA-23 aktivitesini düşürdüğü için kullanılmamıştır. Literatürde MBP'nin proteinlerin aktivitesini etkilemediğine aksine ekspresyonu zor ve çözünürlüğü az proteinlerin çözünürlüğünü artırarak saflaştırılmalarını kolaylaştırdığı gösteren çok sayıda yayın mevcuttur (Sorensen and Mortensen, 2005)

MBP-füzyon sistemi ile yapılan çalışmalar bu proteinin kendisine füzyon edilen proteinlerin çözünürlüklerini artırdığını, aktivitelerini ise etkilemediği ve diğer tag sistemleri ile karşılaştırıldığında tercih edilmesi gerekli bir sistem olduğu vurgulanmıştır (Kapust and Waugh, 1999). Bu nedendir ki kristalizasyonu zor proteinler dahi bu proteine füzyon yapıldıktan sonra bu proteinle birlikte kristalize edilerek analiz edilmişlerdir (Kobe et al., 1999, Liu et al., 2001, Adikesavan et al., 2005). MBP'nin füzyon yapıldığı proteinlerin katlanmasını nasıl etkilediği araştırılmış ve MBP'ye şaperon protein karakteri atıf edilmiştir (Kapust and Waugh, 1999). İleri sürülen modele göre sentezi yapılan füzyon proteini önce bir ara form alır ve bu ara form üzerinden devam eden katlanma eğer "native konformasyonunda", yani doğru bir şekilde ise füzyon proteini hücrede çözünür şekilde aktivitesini ve yaşamını devam ettirir. Aksi takdirde, MBP yanlış katlanan füzyon proteini ile yüzeyinde bulunan hidrofobik amino asitler vasıtası ile etkileşerek yanlış katlanan proteinin çökmesini neden olur (Şekil 5.2).



**Şekil 5.2.** MBP'nin füzyon yapıldığı proteinlerin katlanmasını etkileyişi (Kapust and Waugh, 1999).

Sonuç olarak, bu çalışma ile MBP-füzyon sisteminin OXA tipi enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunda kullanılabilinecek iyi bir sistem olduğu ve diğer sistemlere göre bu enzimlerin native konformasyonunu daha iyi koruduğu için tercih edilme sebebi olabileceği gösterilmiş olmaktadır. Ayrıca MBP-OXA-23 füzyon proteininde MBP'nin OXA-23'ün aktif bölgesinden uzak oluşu, bu proteinin OXA-23 aktivitesini etkilemesinin düşük bir ihtimal dâhilinde olduğunu göstermektedir (Şekil 5.3).



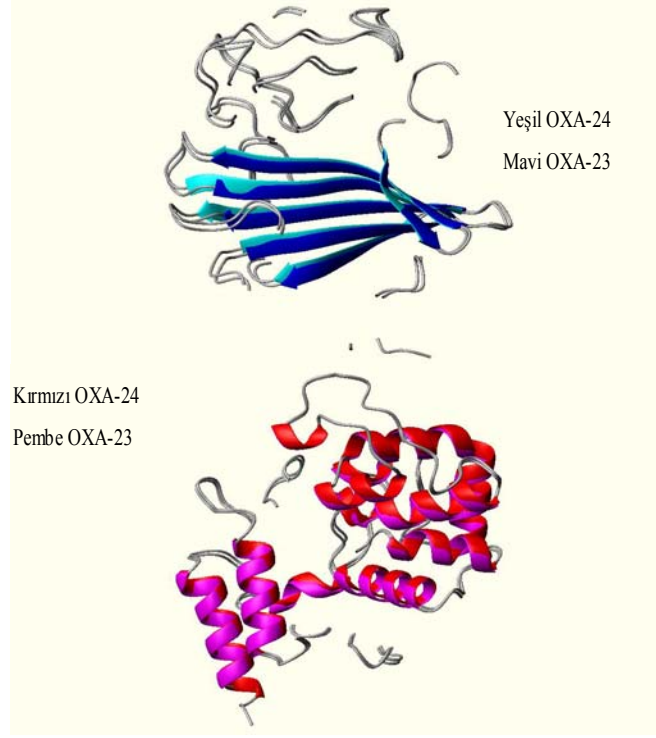
**Şekil 5.3.** MBP-OXA23 füzyon proteininin ikincil yapısı

Bu teorik yaklaşımları desteklemek amaçlı tasarladığımız deneyde üç farklı klonlardan elde edilen işlenmemiş protein çözeltilerinin nitrosetin hidroliz aktivitelerinin eşitlenmesini takiben yapılan imipenem ve meropenem hidrolizleri OXA-23-MBP füzyon proteininin diğer klonlardan eksprese edilmiş proteinlere oranla daha aktif olduğunu göstermiştir. Bu yüzden MBP-füzyon sistemi tercih edilen bir beta laktamaz ekspresyon sistemi olmalıdır.

## 5.2. OXA-23'ün Topolojik Özellikleri

OXA-23 modeli incelendiğinde bu proteinin üç boyutlu yapısının bugüne dek elde edilmiş karbapenemazlara yüksek seviyede benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. OXA-23'ün topolojisi alfa ve beta katlanmaları ile oluşturulmuş ikincil yapıların yanı sıra çok sayıda serbest rotasyonlar içermektedir. Merkezinde altı adet paralel veya antiparalel şekilde dizilmiş beta yapıları ile bu beta yapılarını saran kısa ve uzun alfa helix sekonder yapıları vardır. Yapılan çoklu dizi irdelemesinde OXA-23 benzeri proteinler arasında sadece katlanma bölgelerinde major farklılıklar olduğu gözlemlenmiş, proteinin topolojisini oluşturan ana sekonder öğelerin değişmeden kaldığının farkına varılmıştır. Modelimizi ana yapı olarak kullandığımız OXA-24 yapısı ile karşılaştırdığımızda, bu iki proteinin arasında yüksek derecede benzerlikler olduğu gözlemlenmiştir. Amino asit düzeyindeki düşük seviyedeki benzerliğin üç boyutlu yapıya yansımamış olması ilginçtir. (OXA-23 ile OXA-24 arasında % 60 oranında benzerlik vardır). Ancak, OXA-23 ile OXA-24 proteinlerinin süperimpozisyonu bu iki protein arasındaki minor farklılıkları ortaya koyma açısından önemlidir. Yapılan süperimpozisyonda OXA-23'ün OXA-24'den daha kısa beta yaprakçıkları içerdiği fark edilmiştir.





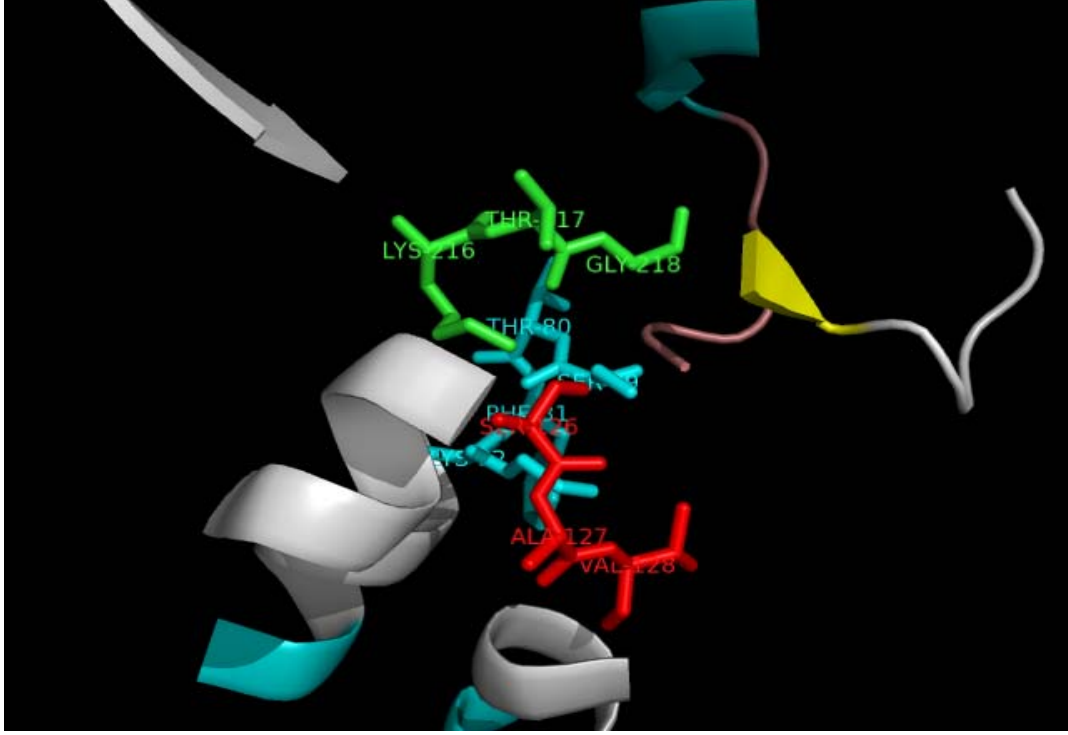
**Şekil 5.4.** OXA-23 ve OXA-24 proteinlerinin ikincil yapılarının üst üste bindirilmiş karşılaştırmaları

Alfa sırt karbon superimpozisyonunu takiben hesaplanan RMSD değeri bu iki proteinin sırt karbonu seviyesinde aynı şekilde düzenlendiğini ve uzayda aynı pozisyonları işgal ettiğini göstermektedir (RMSD karbon alfa = 0,07).

OXA-23 ve OXA-24 her ne kadar topolojik seviyede benzer olsa da bu iki proteinin aktif bölgelerini incelemeyen proteinler arasındaki aktivite farklılıklarını açıklamak veya bu konuda herhangi bir yorumda bulunmak doğru değildir. OXA-24 üzerinde aktif bölgede üç element bulunmaktadır. Bu elementlerden ilki proteinin N-ucuna yakın bir bölgede bulunan 3. helix üzerinde olup Ser81-Thr82-Phe83-Lys84 amino asit grubunu içine alır. Bu element penisilin bağlayan proteinlerde ve beta-laktamazlarda katalitik serin olarak tarif edilen ve Ser-XX-Lys motifi ile formülize edilen Ser81 içerir. İkinci aktif bölge elementi Ser128-Ala129-Val130 amino asitleri tarafından oluşturulmuş ve 4.ve 5. alfa heliks bölgeleri üzerinde yer alan bölgedir. Bu bölge Ser128-X-Val-Ile motifinin varlığı ile karakterize edilir. Bu bölgedeki serin, çevresindeki diğer aktif bölge amino asitleri ile hidrojen bağları oluşturur. Bu hidrojen bağlarının varlığı ve sayısı oksasilinazlar arasındaki karakteristik farkların doğmasında önemli rol oynar. Son aktif bölge elementi ise beta laktam

antibiyotiklerinin penisilin bağlama proteinlerine bağlanabilmesi için oldukça önemlidir ve Lys218 - Ser219 - Gly220 amino asitlerinden oluşmuştur.

OXA-23 ile OXA-24 arasında yapılan dizi irdelemesi ilk iki aktif bölge elementlerinin birebir korunduğunu ancak üçüncü bölgedeki Ser219'un yerini Thr219'un aldığını göstermiştir (model üzerinde Thr217 olarak verilmiştir).



**Şekil 5.5.** OXA-23 aktif bölgesi ve korunmuş dizilerdeki Thr217 konumlanması

Bu tip bir aktif bölge OXA-10'da da gözlemlenmiş olup OXA-10 aktif bölgesinin OXA-24'e oranla daha zor erişilebilir bir yapıya sahip olmasına sebep olmaktadır (Paetzel et al., 2000). Ancak eldeki bilgiler ışığında kesin bir yapı-fonksiyon ilişkisi kurmak mümkün değildir. Daha önce OXA-10 ve OXA-24 ile yapılan kristal yapı çalışmaları aktif bölgenin çapını ölçerek substratın aktif bölgeyi çevreleyen boşluğa sığıp sığmamasına göre tahminde bulunmuştur (Paetzel et al., 2000, Santillana et al., 2007). Ancak bu proteinlerin esneklik değerlerinin bilinmeyişi yapılan tahminlerin aslında doğruyu ifade etmekte eksik kaldığını göstermektedir. Bu nedenle OXA-23, OXA-24 ve OXA-10 proteinlerinin esnekliklerini incelemek gerekmektedir. Yapılan FLEX WEB simülasyonunda OXA-24'ün OXA-23'e oranla 1,5 kat daha esnek bir protein olduğu (OXA-23 için toplam esneklik derecesi % 37 iken OXA-24 için % 54'dür) görülmüştür.

### 5.3. OXA-23'ün Kinetik Özellikleri

Bu çalışmada üç tip beta laktam grubunu temsil eden antibiyotik kullanılmıştır. Antibiyotik grup 1 penisilin grubu olup penisilin G, ampisilin ve piperasilin ile temsil edilmiştir. OXA-23 piperasiline düşük seviyede ilgi göstermiştir ( $K_m$  302  $\mu M$ ). Ampisilin ve penisilin G antibiyotikleri ile elde edilen yüksek  $K_m$  değerlerinden dolayı penisilin grubu antibiyotiklerin OXA-23'ün zayıf substratları olduğunu göstermiştir. Elde edilen  $K_m$  ve  $k_{cat} / K_m$  değerleri göstermiştir ki (Çizelge 4.9.) OXA-23 ampisilin, penisilin G ve piperasilin substrat olarak tercih etmemesine rağmen bu maddeleri etkili bir şekilde hidroliz edebilir.

Antibiyotik grup iki sefalosporin grubu olup seftazidim ve sefepimi ile temsil edilmiştir. Seftazidim OXA-23 için çok zayıf bir substrattır ve bu çalışmada hidrolizi ölçülemeyecek derecede düşüktür. Benzer şekilde OXA-27, OXA-40, OXA-69 ve OXA-20 için seftazidim hidrolizi belirlenememiştir (Heritier et al., 2003, Heritier et al., 2005, Afzal-Shah et al., 2001, Keith et al., 2005). OXA-23'ün sefepimi düşük seviyede hidrolizi seftazidim hidrolizinin olmayışı ile ilişkilendirildiğinde, bu enzimin genel anlamda sefalosporinleri hidrolizinin yok denecek kadar az olduğu söylenebilir.

Antibiyotik grup üç karbapenem grubu olup imipenem ve meropenem ile temsil edilmiştir. OXA-23'ün imipenem ( $K_m$  6,26 $\mu M$ ) ve meropeneme ( $K_m$  17 $\mu M$ ) ilgisi çalışılan diğer antibiyotiklere göre daha fazladır. Bu da enzimin karbapenem grubu antibiyotiklere yüksek ilgisi olduğunu göstermektedir. OXA-23'de dâhil tüm OXA tip karbapenemazlar diğer beta laktam antibiyotiklerine oranla imipeneme düşük  $K_m$  değerinden dolayı yüksek afinite göstermektedirler (Girlich et al., 2004, Bou et al., 2000, Heritier et al., 2003). OXA-23 meropenemi imipeneme göre daha düşük oranda hidroliz etmektedir. Birçok OXA tipi karbapenemazlarda olduğu gibi OXA-23'de düşük  $k_{cat}$  değeri ve yüksek afinitenin kombinasyonu sonucu imipenem hidrolizini gerçekleştirir (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006).

## 6. SONUÇ ve ÖNERGELER

Bir karbapenamaz türü olan beta-laktamaz OXA-23 enzimi karbapenem türü antibiyotikleri (IPM ve MEM) substrat olarak tercih etmekte ve etki bir şekilde hidroliz etmektedir.

OXA-23 enziminin elektrostatik yüzey yük dağılımı sonucunda enzim yüzeyinin yoğun oranda nötral amino asitlerce kaplandığı gösterilmiştir. Anyon ve katyon değişim kromatografi metodları ile saflaştırmanın yerine hidrofobik amino asit içeriğinin fazla olmasından dolayı hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilebilir. Gelecek çalışmalarda hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan OXA-23'ün çalışmada kullanılan beta-laktam antibiyotikleri ile hidroliz değerleri belirlenerek MBP ile füzyon yapılarak hesaplanmış kinetik değerleri karşılaştırılabilir.

## KAYNAKLAR

- ABRAHAM, E. P. & CHAIN, E. (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*, 10, 677-8.
- ADIKESAVAN, N. V., MAHMOOD, S. S., STANLEY, N., XU, Z., WU, N., THIBONNIER, M. & SHOHAM, M. (2005) A C-terminal segment of the VIR vasopressin receptor is unstructured in the crystal structure of its chimera with the maltose-binding protein. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 61, 341-5.
- AFZAL-SHAH, M., WOODFORD, N. & LIVERMORE, D. M. (2001) Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 583-8.
- AKTAŞ, F. (2004 ) Gram negatif Bakterilerin Hastane İnfeksiyonlarındaki Rolü ve Epidemiyolojisi. *Önemli ve sorunlu Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonları*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi.
- AMBLER, R. P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289, 321-31.
- ARDA, N. & ERTAN, H. (2004) Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması. IN GÜLER TEMİZKAN, N. A. (Ed.) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitapevleri
- BABIC, M., HUJER, A. M. & BONOMO, R. A. (2006) What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*, 9, 142-56.
- BAHAR, H. & ESEN, N. (2002) İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. IN TOPÇU AW., S. G., DOĞANAY M. (Ed.) *Acinetobacter ve Diğer Gram Negatif Nonfermentatif Basiller*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- BAŞTÜRK, S. (2005) *Escherichia Coli, Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeruginosa ve Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması. *Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği*. İstanbul, Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi.
- BERGOGNE-BEREZIN, E. & TOWNER, K. J. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 9, 148-65.
- BONNET, R., MARCHANDIN, H., CHANAL, C., SIROT, D., LABIA, R., DE CHAMPS, C., JUMAS-BILAK, E. & SIROT, J. (2002) Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2004-6.
- BOO, T. W., WALSH, F. & CROWLEY, B. (2006) First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. *J Antimicrob Chemother*, 58, 1101-2.
- BOU, G., OLIVER, A. & MARTINEZ-BELTRAN, J. (2000) OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1556-61.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

- BROWN, S. & AMYES, S. (2006) OXA (beta)-lactamases in Acinetobacter: the story so far. *J Antimicrob Chemother*, 57, 1-3.
- BROWN, T. A. (2002) How to Obtain a Clone of a Specific Gene. *Gene Cloning and DNA Analysis*. forth edition ed., Blackwell Science publishing
- ÇAKIR, N. (2004) Gram-Negatif Etkili Antibakteriyel Ajanlar ve Klinik Kullanımları. *Önemli ve Sorunlu Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonları*. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi.
- DALLA-COSTA, L. M., COELHO, J. M., SOUZA, H. A., CASTRO, M. E., STIER, C. J., BRAGAGNOLO, K. L., REA-NETO, A., PENTEADO-FILHO, S. R., LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. (2003) Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*, 41, 3403-6.
- DONALD, H. M., SCAIFE, W., AMYES, S. G. & YOUNG, H. K. (2000) Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in Acinetobacter baumannii 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 196-9.
- ELKINS, C. A. & NIKAIDO, H. (2002) Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of Escherichia coli is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol*, 184, 6490-8.
- ESSACK, S. Y. (2001) The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm Res*, 18, 1391-9.
- FOURNIER, P. E., VALLENET, D., BARBE, V., AUDIC, S., OGATA, H., POIREL, L., RICHET, H., ROBERT, C., MANGENOT, S., ABERGEL, C., NORDMANN, P., WEISSENBAACH, J., RAOULT, D. & CLAVERIE, J. M. (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *PLoS Genet*, 2, e7.
- FRERE, J. M. (1995) Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol*, 16, 385-95.
- GACAR, G. G., MIDILLI, K., KOLAYLI, F., ERGEN, K., GUNDES, S., HOSOGLU, S., KARADENIZLI, A. & VAHABOGLU, H. (2005) Genetic and enzymatic properties of metallo-beta-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of Enterobacter cloacae. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 4400-3.
- GIRLICH, D., NAAS, T. & NORDMANN, P. (2004) Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 2043-8.
- GOLDSTEIN, F. W., LABIGNE-ROUSSEL, A., GERBAUD, G., CARLIER, C., COLLATZ, E. & COURVALIN, P. (1983) Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter. *Plasmid*, 10, 138-47.
- GÜLAY, Z. (2005a) Beta-laktamlara Direnç Mekanizmaları. IN ULUSOY, S. (Ed.) *Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi*. Ankara.
- GÜLAY, Z. (2005b) İndüklenebilir Beta-laktamazlar, Özellikleri, Epidemiyolojisi ve Klinik Önemi. IN ULUSOY, S. (Ed.) *Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi*. Ankara.
- GÜR, D. (2004) Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları. IN ULUSOY, S., LEBLEBICIOĞLU, H. & ARMAN, D. (Eds.) *Önemli ve sorunlu Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonları*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi.
- GÜR, D. (2005a) Genişletilmiş Spektumlu Beta-laktamazlar. IN ULUSOY, S. (Ed.) *Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi*. Ankara.

- GÜR, N. (2005b) Beta-laktamazlar. IN ULUSOY, S. (Ed.) *Beta-Laktamazlar ve Klinik Önemi*. Ankara.
- HALL, B. G. & BARLOW, M. (2004) Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat*, 7, 111-23.
- HELFAND, M. S. & BONOMO, R. A. (2003) Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 3, 9-23.
- HERITIER, C., POIREL, L., AUBERT, D. & NORDMANN, P. (2003) Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 268-73.
- HERITIER, C., POIREL, L., FOURNIER, P. E., CLAVERIE, J. M., RAOULT, D. & NORDMANN, P. (2005) Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 4174-9.
- HOLLAND, S. & DALE, J. W. (1984) Improved purification and characterization of the OXA-2 beta-lactamase. *Biochem J*, 224, 1009-13.
- JACOBY, G. A. (2006) Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1123-9.
- JEHL, F., CHOMARAT, M., WEBER, M. & GERARD, A. (2004 ) Antibiyotikler ve Antibiyotiklere Bakteriyel Direnç. *Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye*. Biomerieux yayınları.
- JEON, B. C., JEONG, S. H., BAE, I. K., KWON, S. B., LEE, K., YOUNG, D., LEE, J. H., SONG, J. S. & LEE, S. H. (2005) Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in korea. *J Clin Microbiol*, 43, 2241-5.
- KAPUST, R. B. & WAUGH, D. S. (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 8, 1668-74.
- KASAP, M. (2007) *Escherichia coli*'den Rekombinant Protein Yapılımı (Ekspresyonu) ve Ni-NTA Saflaştırılması. IN DURMAZ, R. (Ed.) *IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu*. Malatya, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti-Bakteri Genetiği Çalışma Grubu Malatya Moleküler ve Klinik Mikrobiyoloji Derneği
- KEITH, K. E., OYSTON, P. C., CROSSETT, B., FAIRWEATHER, N. F., TITBALL, R. W., WALSH, T. R. & BROWN, K. A. (2005) Functional characterization of OXA-57, a class D beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1639-41.
- KOBE, B., CENTER, R. J., KEMP, B. E. & POUMBOURIOS, P. (1999) Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4319-24.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAILER, K. J. (1993) Chemical Spectroscopy. *Physical Chemistry*. Oxford University Press.
- LIU, Y., MANNA, A., LI, R., MARTIN, W. E., MURPHY, R. C., CHEUNG, A. L. & ZHANG, G. (2001) Crystal structure of the SarR protein from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6877-82.

- LIVERMORE, D. M. (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8, 557-84.
- LIVERMORE, D. M. (1998) Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*, 41 Suppl D, 25-41.
- LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. (2006) The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol*, 14, 413-20.
- MADRI, P. P. (1967) Isolation of *Acinetobacter anitratus* (DeBord) Brisou and Prevot, from room areas and a human subject in a controlled activity facility. *Aerosp Med*, 38, 799-800.
- 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*.
- NAAS, T., LEVY, M., HIRSCHAUER, C., MARCHANDIN, H. & NORDMANN, P. (2005) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*, 43, 4826-9.
- ÖZTÜRK, R. (2002) Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi ve Günümüzde Direnç Durumu. *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar*. İ.Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri.
- PAETZEL, M., DANIEL, F., DE CASTRO, L., MOSIMANN, S. C., PAGE, M. G. & STRYNADKA, N. C. (2000) Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol*, 7, 918-25.
- PANNEK, S., HIGGINS, P. G., STEINKE, P., JONAS, D., AKOVA, M., BOHNERT, J. A., SEIFERT, H. & KERN, W. V. (2006) Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. *J Antimicrob Chemother*, 57, 970-4.
- POIREL, L. & NORDMANN, P. (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 12, 826-36.
- POOLE, K. (2004) Resistance to beta-lactam Antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 2200-2223.
- RIBERA, A., ROCA, I., RUIZ, J., GIBERT, I. & VILA, J. (2003) Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 52, 477-80.
- ROLINSON, G. N. (1998) Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother*, 41, 589-603.
- SANTILLANA, E., BECEIRO, A., BOU, G. & ROMERO, A. (2007) Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5354-9.
- SEGAL, H., GARNY, S. & ELISHA, B. G. (2005) Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*, 243, 425-9.
- SORENSEN, H. P. & MORTENSEN, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 115, 113-28.



- TURTON, J. F., KAUFMANN, M. E., GLOVER, J., COELHO, J. M., WARNER, M., PIKE, R. & PITT, T. L. (2005) Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*, 43, 3074-82.
- VILA, J., MARTI, S. & SANCHEZ-CESPEDES, J. (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 59, 1210-5.
- WALTHER-RASMUSSEN, J. & HOIBY, N. (2006) OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, 57, 373-83.
- YÜCE, A. (2001) Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik*.

[http://molbio.edu.ru/eng/scripts/h01\\_04.html](http://molbio.edu.ru/eng/scripts/h01_04.html)

<http://www.swiss-model.expasy.org>

<http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>

<http://www.expasy.org/spdv/>

<http://pymol.sourceforge.net/>

<http://firstweb.asu.edu>

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

## **ÖZGEÇMİŞ**

SİNEM TOROL

Y. Sultan Mah. Aydınlar Sok. Kültür Sit. A-1 No:6 İzmit / KOCAELİ

Cep: (535)5567121

E-mail: sinemtorol@yahoo.com

### **Kişisel Bilgiler:**

Uyruğu	TC
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	05 Haziran 1980

### **İş Deneyimi:**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı Kocaeli, 01 Temmuz - 01 Eylül 2003, Stajyer

Memorial Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Genetik Laboratuvarı İstanbul, 13-22 Eylül 2004, Stajyer

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Proje Araştırma Laboratuvarı Kocaeli, 10 Eylül 2004– 20 Aralık 2005

### **Eğitim Bilgileri:**

2005-2008 Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı, Araştırma Görevlisi

2005 Bahar Dönemi- Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji, Yüksek Lisans Programı

2004-1999 İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans

1994-1998 İzmit Süper Lisesi