

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OXA-1/N²⁶⁶ ve OXA-320/I²⁶⁶ β-LAKTAMAZ VARYANTLARININ
KARŞILAŞTIRMALI BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU
ve MUTASYONEL ANALİZİ (OXA/A²⁶⁶)

Fatma ÇALIK

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. CEMAL SANDALLI

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. YEŞİM AKTÜRK DİZMAN

YRD. DOÇ. DR. AYŞEGÜL SARAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

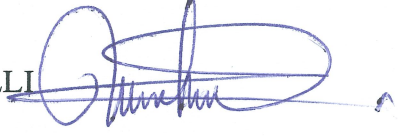


RİZE-2016

Her Hakkı Saklıdır

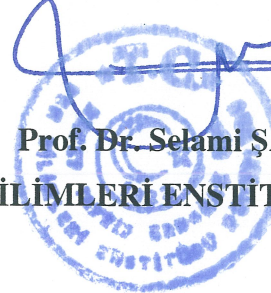
T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OXA-1/N²⁶⁶ ve OXA-320/T²⁶⁶ β-LAKTAMAZ VARYANTLARININ
KARŞILAŞTIRMALI BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU ve
MUTASYONEL ANALİZİ (OXA/A²⁶⁶)**

Doç. Dr. Cemal SANDALLI danışmanlığında, Fatma ÇALIK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından .../.../... tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı	Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: DOÇ. DR.	CEMAL SANDALLI	
Üye	: YRD. DOÇ. DR.	YEŞİM AKTÜRK DİZMAN	
Üye	: YRD. DOÇ. DR.	AYŞEGÜL SARAL	


Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

OXA-1/N²⁶⁶ ve OXA-320/I²⁶⁶ β-laktamaz varyantlarının karşılaştırmalı biyokimyasal karakterizasyonu ve mutasyonel analizi (OXA/A²⁶⁶) adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez aşamasının her anında ilgi, desteği ve hoşgörüsüyle her konuda yardımcı olan çok sevdiğim saygıdeğer danışman hocam sayın Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimin her aşamasında birlikte olduğum, hiç bir konuda yardımlarını, desteklerini, esirgemeyen ve enzim moleküler karakterizasyonun yapılabilmesi için her türlü desteği sağlayan Yrd. Doç. Dr. Ayşegül SARAL ve Yrd. Doç. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN'e; çok sevdiğim arkadaşlarım Emine Esra BUDAK ve Ahmet MİDİLLİ'ye ve yüksek lisans tez çalışmasında benden yardımlarını esirgemeyen Aytül UZUN olmak üzere tüm moleküler biyoloji araştırma laboratuvarı ailesine, yüksek lisans çalışmamın antibiyogram duyarlılık testi yapılabilmesi için yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK'e, E-test yönteminde bana yardım eden Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na, Western Blotlama analizinde benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yeşim AKTÜRK DİZMAN'a ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bende emeği bulunan değerli hocam Doç. Dr. Serdar ÜLKER'e,

Aldığım her kararda bana güvenen, koşulsuz destek olan, maddi ve manevi desteklerini sevgiyle benden esirgemeyen aileme, varlığı, sevgisi ve desteğini her zaman hissettiren sevgili arkadaşım Yasin TÜRK'e ve benim bugünlere gelmemi sağlayan değerli öğretmenim Rıdvan ATAN'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi TÜBİTAK tarafından 214Z295 nolu proje ile desteklenmiştir.

Fatma ÇALIK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan OXA-1/N²⁶⁶ ve OXA-320/I²⁶⁶ β-laktamaz varyantlarının karşılaştırmalı biyokimyasal karakterizasyonu ve mutasyonel analizi (OXA/A²⁶⁶) başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. .../.../...

Fatma ÇALIK

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

ÖZET

OXA-1/N²⁶⁶ ve OXA-320/I²⁶⁶ β-LAKTAMAZ VARYANTLARININ KARŞILAŞTIRMALI BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU ve MUTASYONEL ANALİZİ (OXA/A²⁶⁶)

Fatma ÇALIK

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

Bu tez kapsamında yakın zamanda tespit edilen D-Sınıfı β-laktamaz grubuna ait iki adet OXA alelinin (*bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320}) ekspresyon vektörlerinde rekombinant olarak ifade edilmesi ve hem minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MIK) hem saflaştırılan proteinlerin karşılaştırmalı olarak karakterizasyonu amaçlanmıştır. Böylelikle, OXA-tipi β-laktamazların allelik farklılıklarına bağlı olarak antibiyotik tedavilere cevap vermedeki değişimler araştırılmıştır. Her iki alel birbirinden tek bir aminoasit farklılık gösteren enzimleri kodlarlar. OXA-1 proteininde 266. pozisyonda asparajin (266N) aminoasiti mevcutken, OXA-320 proteininde aynı noktada izolösin aminoasiti (266I) bulunmaktadır. Her bir alelin MIK değerlerine bakılması için TOPO100 ekspresyon vektörüne ve kinetik karakterizasyonuna bakılması için pET28a vektörüne klonlanarak rekombinant olarak üretilmeleri sağlandı. Aynı zamanda 266. pozisyonundaki aminoasit varyasyonunun etkisini araştırmak için bu noktada alanin mutasyonu gerçekleştirildi. Rekombinant protein üretimi *E. coli* BL21 hücrelerinde gerçekleştirildi ve Ni-afinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılarak kinetik karakterizasyon deneylerinde kullanıldı. Kinetik sonuçlarına göre OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A enzimlerinin β-laktam antibiyotikleri hidroliz etmeleri açısından aralarında büyük farkların olmadığı gözlemlendi. Üç enziminde meropenem ve seftazidimi hidroliz etmedikleri, benzilpenisilini ve sefepimi çok az hidroliz ettiği, en iyi ise sefalotini ise iyi hidroliz ettiği belirlendi. MIC sonuçlarına göre, amoksisilin ve piperasilin antibiyotiğine OXA-1, OXA-320 ve OXA320/266A örneklerinin direnç sağladığı, monobaktam grubu antibiyotiğe ve karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç oluşturmadığı tespit edildi. MIC sonuçlarına paralel olarak OXA alelleri arasında β-laktam antibiyotiklere karşı katalitik etkide çok az farklılıklar görüldü.

2016, 104 sayfa

Anahtar Kelimeler: *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-320}, MIK

ABSTRACT

COMPARATIVE BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF OXA-1/N²⁶⁶ and OXA-320/I²⁶⁶ VARIANTS OF β -LACTAMASE and THEIR MUTATIONAL ANALYSIS (OXA/A²⁶⁶)

Fatma ÇALIK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cemal SANDALLI

In this master thesis, it was aimed to express of two *bla*_{OXA} alleles (*bla*_{OXA-1} and *bla*_{OXA-320}) classified in Class-D β -lactamase on expression vector and then to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and comparatively characterization of the purified recombinant protein. Thus, it was investigated the effect of amino acid changes in each variants related to enzyme activity. Each protein has a single amino acid changes from each other. While OXA-1 protein has asparagine (266N) at residue 266, OXA-320 protein has isoleucine (266I) at the same position. Each allele was separately cloned into TOPO-100 expression vector to determine the MIC and pET28a expression vector for kinetic characterization. Besides this, site-directed mutagenesis was used to make alanine mutation at residue 266 (266A) to evaluate the effect of mutation on enzyme activity. Recombinant protein was produced in *E. coli* BL21 cell and purified by Ni-affinity chromatography and they were used to kinetic characterization. According to kinetic results, there was no big difference about hydrolysis activity of each variant (OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A) on β -lactam antibiotics. It was found no hydrolysis on meropenem and seftazidime, weak hydrolysis on benzylpenicilline and sefepime and strong hydrolysis on sefalothin for each variant. According to MIC results, each variant generates resistance to piperacilline and they could not affect to monobactams and carbapenems. In accordance with MIC values, it was determined small differences among their kinetic activity on β -lactam antibiotics of these two OXA variants and their alanin mutant.

2016, 104 page

Keywords: *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-320}, , MIC

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IXX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Antibiyotik Direnci	2
1.2.1. Doğal (İntrensek) Direnç	3
1.2.2. Kazanılmış Direnç	3
1.2.3. Çapraz Direnç	5
1.3. Antibiyotiklere Karşı Oluşturulan Direnç Mekanizmaları	6
1.3.1. İlacın Bağlandığı Reseptör ya da Bağlanma Bölgesinde Oluşan Değişiklikler.....	6
1.3.2. İlacın Enzimatik İnaktivasyonu	6
1.3.3. Bakteriyel Membran Değişiklikleri	7
1.3.3.1. İç ve Dış Membran Permeabilitesinde Azalma	7
1.3.3.2. İlacın Dışarı Atılması (Aktif Pompa Sistemi).....	7
1.3.4. Alternatif Bir Metabolik Yolun Kullanılması.....	8
1.4. Gram Negatif Bakteri Hücre Duvar Yapısı ve Penisilin Bağlayan Proteinler8	
1.5. β -Laktam Antibiyotikler	9
1.5.1. Penisilinler	10
1.5.2. Sefalosporinler	13
1.5.3. Karbapenemler	15

1.5.4.	Monobaktamlar	17
1.6.	β -Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	17
1.6.1.	Penisilin Bağlayan Protein (PBP) Değişiklikleri	18
1.6.2.	Dış Zar Proteinindeki Değişiklikler	18
1.6.3.	β –Laktamazlar.....	19
1.6.3.1.	β -Laktamazların Adlandırılması	20
1.6.3.2.	β -Laktamazların Sınıflandırılması	21
1.6.3.3.	Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar (GSBL).....	36
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	45
2.1.	Çalışmada Kullanılan Enzimler, Vektörler ve Kitler, Kimyasallar, E-test Kartlar	45
2.2.	Çalışma Solusyonlarının Hazırlanması.....	46
2.3.	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	49
2.4.	Çalışmada Kullanılan Tamponların Hazırlanması.....	49
2.5.	Bakteri Suşlarının Canlandırılması ve Total DNA İzolasyonu.....	50
2.6.	<i>bla</i> _{OXA-1} ve <i>bla</i> _{OXA-320} alellerinin Champion™ pET100 TOPO® Vektörüne Klonlanması	51
2.7.	Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Nokta Mutasyonunun Yapılması	52
2.8.	266. Pozisyondaki Aminoasit Varyasyonun Enzim Aktivitesine Etkisinin E-Test Yöntemi ile Araştırılması.....	53
2.9.	VITEK Cihazı Kullanılarak Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması	54
2.10.	<i>bla</i> _{OXA-1} ve <i>bla</i> _{OXA-320} alellerinin pET28a Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	54
2.11.	<i>bla</i> _{OXA-1} Aleli Üzerinden 266. Pozisyonda Yönlendirilmiş Mutasyonu	55
2.12.	OXA Varyantlarının Rekombinant Üretimi ve Saflaştırması	56
2.13.	Diyaliz Uygulanması	58
2.14.	Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	59
2.15.	Ekspresyonun Western Blotlama Analizi ile Doğrulanması	59
2.16.	Rekombinant Proteinlerin Kinetik Karakterizasyonu	60
3.	BULGULAR.....	62
3.1.	<i>bla</i> _{OXA-1} ve <i>bla</i> _{OXA-320} Alellerinin TOPO100 Vektörüne Klonlanması ve Mutasyonlar	62
3.2.	OXA Varyantlarının MİK Değerlerinin Analizi.....	62

3.3.	OXA Varyantlarının VITEK Sonuçlarının Analizi	72
3.4.	<i>bla</i> _{OXA-1} ve <i>bla</i> _{OXA-320} Alellerinin pET28a Vektörüne Klonlanması ve Mutasyonlar	73
3.5.	Rekombinant Proteinlerin Üretilmesi ve Saflaştırılması	74
3.6.	Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	76
3.7.	Rekombinant Protein İfadelemesinin Western Blotlama Analizi	76
3.8.	Saf Proteinlerin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	77
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	82
5.	ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR		86
ÖZGEÇMİŞ		90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Gram negatif hücre duvar yapısı.....	8
Şekil 2.	Kimyasal yapılarına göre antibiyotikler.....	10
Şekil 3.	Oksasilin ve kloksasilinin moleküler yapıları.....	26
Şekil 4.	OXA'ların asetilasyon ve deasetilasyon şeması.....	34
Şekil 5.	pET100 TOPO® ekspresyon vektörüne klonlanan örneklerin markır ile yürütülmesi.....	62
Şekil 6.	Tikarsilin/Klavulanik asit antibiyotiği MİK çalışma sonuçları.....	64
Şekil 7.	Piperasilin antibiyotiği MİK sonuçları.....	64
Şekil 8.	Piperasilin/tazobaktam antibiyotiği MİK sonuçları.....	65
Şekil 9.	Sefoksitin antibiyotiği MİK sonuçları.....	65
Şekil 10.	Sefotaksim antibiyotiği MİK sonucu.....	66
Şekil 11.	Seftazidim antibiyotiğinin MİK sonucu.....	67
Şekil 12.	Sefepim antibiyotiğinin MİK sonucu.....	67
Şekil 13.	Aztreonam antibiyotiğinin MİK sonucu.....	68
Şekil 14.	Meropenem antibiyotiğinin MİK sonucu.....	69
Şekil 15.	İmipenem antibiyotiğinin MİK sonucu.....	69
Şekil 16.	Amoksisilin MİK sonuçları.....	70
Şekil 17.	Amoksisilin/klavulanik asit MİK sonucu.....	71
Şekil 18.	Gentamisin antibiyotiğinin MİK sonucu.....	71
Şekil 19.	OXA-1 proteininin sinyal dizisi.....	73
Şekil 20.	pET28a ekspresyon vektörüne klonlanan örneklerin markır ile yürütülmesi.....	74
Şekil 21.	Farklı IPTG oranlarında <i>bla_{OXA-1}</i> 'in SDS-Page görüntüsü.....	74
Şekil 22.	OXA-1 ve OXA-320 alellerinin SDS-Page görüntüsü.....	75
Şekil 23.	Saflaştırılan OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A örneklerinin markır ile yürütülmesi.....	76
Şekil 24.	OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A örneklerinin western blotlama analizi sonucu.....	77
Şekil 25.	OXA-1 ve OXA-320 varyantlarının aminoasit dizilerinin karşılaştırılması ve iki enzim varyantı arasında 266. pozisyonadaki aminoasit varyasyonu.....	83

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Penisilinlerin moleküler yapılarına göre sınıflandırılmaları.....	11
Tablo 2.	SHV-1 β -laktamazından mutasyonla oluşan SHV-2 enzimi.....	20
Tablo 3.	TEM-2 enziminden yalnız iki aminoasit farkı bulunan plazmid kaynaklı β -laktamaz.....	20
Tablo 4.	β -laktamazların adlandırılması.....	20
Tablo 5.	Güncellenmiş β -laktamaz grupları ve genel özellikleri.....	22
Tablo 6.	Ambler sınıflamasına göre grup A, C ve D β -laktamazlarda korunmuş 3 bölgenin karşılaştırılması.....	27
Tablo 7.	SDS-PAGE jelini hazırlamak için kullanılan solusyonlar.....	47
Tablo 8.	Ayrırma jeli ve yükleme jeline kullanılan solüsyonlar ve kullanılan miktarlar.....	48
Tablo 9.	SDS-PAGE' de yürütme ve yürütme sonrası kullanılan malzemeler.....	49
Tablo 10.	Çalışmada kullanılan tamponlar.....	50
Tablo 11.	Ekspresyon şartlarını belirlemek için yapılan deneyler.....	57
Tablo 12.	Saflaştırmada kullanılan tamponlar.....	58
Tablo 13.	Her substrat için kullanılan dalga boyları.....	61
Tablo 14.	Çalışma kapsamında farklı hücrelerde ifadelenen OXA varyantlarının E-test sonuçları.....	63
Tablo 15.	Çalışma kapsamında farklı hücrelerde ifadelenen OXA varyantlarının VITEK sonuçları.....	72
Tablo16.	OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A enzimlerinin moleküler ağırlıkları coefficients değerleri ve konsantrasyonları.....	76
Tablo 17.	OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A örneklerinin kinetik sonuçları.....	78
Tablo 18.	Benzilpenisilin antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.....	79
Tablo 19.	İmipenem antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.....	80
Tablo 20.	Sefalotin antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.....	80
Tablo 21.	Sefotaksim antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.....	81
Tablo 22.	Sefepim antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.....	81

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AK	Amikasin
Ala	Alanin
AML	Amoksisilin
AT	Aztreonam
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Baz çifti
BSA	Sığır serum albumin
C	Derece
CA	Klavulanik asit
CaCl ₂	Kalsiyum klörür
CAZ	Seftazidim
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu
CT	Sefotaksim
CTX-M	Sefotaksim hidroliz eden beta laktamaz
d H ₂ O	Distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FSB	Frozen storage buffer
FX	Sefoksitin
GES	Guiana Geniş spektrum
GM	Gentamisin
Gly	Glisin
GSBL	Genişlemiş spekturum beta laktamaz
His	Histidin
IP	İmipenem
IMP	İmipenem hidroliz eden metallo beta laktamaz
IPTG	İzopropiltiyo-beta-D-thiogalactopyranoside
Kb	kilo baz

KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilo dalton
K _m	Michaelis-Menten sabiti
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
L	Litre
LB	Lauria-Bertani
Lys	Lizin
M	Molar
MEM	Meropenem
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
Mg	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klörür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDM	New Delhi Metallo beta laktamaz
nm	Nanomolar
nm	Nanometre
OXA	Oksilinaz grup β-laktamaz
PAGE	Poli akrilamid jel elektroforezi
PER	<i>Pseudomonas</i> geniş direnç beta laktamaz
PBP	Penisilin bağlayan protein
PP	Piperasilin
PTC	Piperasilin/tazobaktam
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Direnç
Rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SHV	Sulphydryl tip beta-laktamaz
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit

TEM	Temoniera beta laktamaz
TLC	Tikarsilin/Klavulanik Asit
Tm	Erime sıcaklığı
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
PM	Sefepime
PTC	Piperasilin tazobaktam
VEB	Vietnam geniş spektrumlu beta-laktamaz
VIM	Verona-İmipenemaz Metallo-beta laktamaz
Vmaks	Maksimum hız
Zn	Çinko
ZnSO ₄	Çinko sülfat
X-Gal	5-Bromo-4-kloro-3-indol-b-D-galaktozid
XL	Amoksisilin/Klavulanik Asit
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Değişen koşullara hızlı uyum sağlayabilme yeteneklerinden dolayı mikroorganizmalar, yeryüzünün en eski canlıları olarak bilinmektedir. Bu yetenekleri dolayısıyla mikroorganizmalar, geliştirilen her yeni antibiyotikten kendini savunma yolu bulmaktadırlar. Sonuç olarak, infeksiyonlarla savaşta önemli bir engel teşkil eden antibiyotiklere direnç sorunu ile karşı karşıya kalınmaktadır. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç dünyada bütün insanlığı tehdit edecek düzeyde önemli sorun haline gelmiş bulunmaktadır (Bedir, 2006).

1929 yılında *Penicillium* küfü ile kontamine agar plağında stafilokokların üremesinin inhibe olduğunu gözleyen Sir Alexander Fleming ilk antibiyotiği keşfetmiştir (Akin vd., 2013). 1940 yılında Abraham ve Chain *E. coli*' den izole ettikleri ekstraktın penisilin etkisini ortadan kaldırdığını gözlemlemişler ve elde ettikleri enzime 'penisilnaz' ismini vermişlerdir. Kirby, disk duyarlılık testlerini geliştirdikten sonra 1944 yılında stafilokokların penisiline dirençli ve duyarlı suşlarını karşılaştırdığında penisiline dirençli olduğu gözlemlenen örneklerde bu enzimin bulunduğunu saptamış ve stafilokokların bu enzimi parçalayabildiğini göstermiştir. 1947 yıllarında ise hastaneden izole edilen stafilokok suşlarının çoğunluğu penisilinlere karşı dirençli hale gelmiştir.

Klinikte sıkça kullanılmaya başlanan antibiyotik zamanla ciddi yan etkiler ve bu antibiyotiklere direnç geliştiren bakteri problemleri görülmeye başlandı. Penisilin antibiyotiğinde değişiklikler yapılarak doğal penisilinlere ek olarak, yarı-sentetik penisilinler üretildi. Fakat penisilin molekülü değiştikçe mikroorganizmalar da direnç geliştirmeye devam ettiler. Araştırmacılar, buna karşın direnci inhibe edecek moleküller üreterek mikroorganizmalara karşı kısa süre de olsa üstünlük sağlamayı başardılar. Bugün de, bütün doğal ve yarı-sentetik şekilleri ile geniş bir mikroorganizma spektrumuna karşı altmış yılı aşkın bir süredir tıpta başarı ile penisilinler kullanılmaktadırlar (Bedir, 2006).

Penisilinin kullanıma girmesinden sonraki 40 yılda 20 antibiyotik sınıfı keşfedilmesine rağmen, 1980 yılından sonra az sayıda önemli antibiyotikler keşfedilmiştir. Direnç sorununu aşacak antibiyotiklerin geliştirilmesinin direnç gelişimine göre daha yavaş olması ve önemli miktarda ekonomik kaynak gerektirmesi konunun önemini ortaya koymaktadır (Akın vd., 2013).

Hastane ortamı antibiyotiklerin seçici baskısı nedeniyle Gram-negatif bakterilerin çoğalması için son derece uygundur. Hastane florasına hakim olan çok sayıda antibiyotiğe dirençli olabilen bu mikroorganizmalar, hem aşırı antibiyotik uygulanması hem de hastaların immün dirençleri nedeniyle, özellikle sağlık personeli veya solunum cihazları ile taşınarak hastalar arasında yayılmaktadır. Yayılan bu dirençle de pek çok direnç geni mutasyona uğrayıp farklı direnç genlerini meydana getirmektedir. Direnç genleri arasındaki mutasyonlar ve yeni direnç genlerinin keşfide karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda da netlik kazanmaktadır. Bu tez kapsamında yakın zamanda tespit edilen D-Sınıfı β -laktamaz grubuna ait iki adet OXA alelinin (*bla*_{OXA-320} ve *bla*_{OXA-1}) karşılaştırmalı olarak karakterizasyonu amaçlanmıştır. Her iki alel birbirinden tek bir aminoasit farklılık gösteren enzimleri kodlarlar. OXA-1 proteininde 266. pozisyonda asparajin aminoasiti mevcutken, OXA-320 proteininde aynı noktada izolösin aminoasiti bulunmaktadır. Ayrıca, 266. pozisyondaki aminoasit varyasyonunun etkisini araştırmak için bu noktada alanin mutasyonu yapılacaktır. Her bir alel sinyal sıralı olarak TOPO-100 ekspresyon vektörüne sinyal sırasız olarak pET28a vektörüne klonlanarak rekombinant olarak üretilmeleri amaçlanmıştır. pET28a vektörüne klonlanacak olan alellerden rekombinant enzim üretilecek, *K_m* ve *k_{cat}* değerlerinin belirlenerek aminoasit değişimlerinin substratların hidrolizindeki etkileri belirlenerek karakterize edilecektir. Ayrıca her bir aleli ifade eden hücrelerin, E-test yöntemi ve Vitek ile aminoasit değişimlerinin etkisinin fenotipik olarak ortaya konulması belirlenecektir. Sonuçlar, nokta mutasyonlar neticesinde oluşan farklı aleller arasındaki enzim kinetik farklılıklarının ve antibiyotik duyarlılıklarının anlaşılmasında rol alacaktır.

1.2. Antibiyotik Direnci

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç, hayatta kalma çabası antibiyotik direnci olarak tanımlanmakta ve duyarlı bakteriler bu durumda

elimine olmaktadır (Düzgün, 2015). Mikroorganizmaların antibiyotik direnci, olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için olabileceği gibi, aynı zamanda bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu da oluşabilmektedir (Torol, 2008). Günümüzde, bütün dünyada bir yandan hızla yeni antibiyotikler geliştirilmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları gün geçtikçe büyümektedir (Albayrak, 2008).

1.2.1. Doğal (İntrensek) Direnç

Bakteriler, antibiyotiklere karşı doğal direnç gösterebilirler. Doğal direnç, bakterinin temel özelliğidir ve ilaç kullanımı ile ilgisi yoktur, genetik değildir. Doğal direnç, bu mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşımamalarının ya da ilacın yapısal özelliğinden dolayı hedefini gerçekleştirememesinin bir sonucudur (Yüce, 2001). Genellikle ilaçların etkili olabilmesi için bakterinin aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Durgun haldeki mikobakteriler veya bakteri sporları gibi metabolik olarak inaktif mikroorganizmalar antibiyotiklere fenotipik olarak direnç gösterebilirler, fakat bunlardan oluşan yeni kökenler ilaçlara duyarlıdır (Torol, 2008). Bir diğer örnek olarak ise, β -laktam gibi hücre çeperi sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı doğal direnç gösteren hücre çeperine sahip olmayan *Mycoplasma* 'lardır (Düzgün, 2015).

Doğal direnç, mikroorganizmaların vahşi fenotipini belirler ve sonraki bütün kuşaklara dikey yolla geçirilir, yatay geçiş yoktur ya da çok az rastlanılır (Torol, 2008).

1.2.2. Kazanılmış Direnç

Bir mikroorganizma kalıtsal özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak geçmişte duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajandan etkilenmeyebilir. Bu durumda o mikroorganizma için direnç kazanmış diyebiliriz. Kalıtsal kaynaklı direnç, kromozomal veya kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir (Yüce, 2001).

Kromozomal direnç; bakteri kromozomunda mutasyonlar sonucu kendiliğinden (spontan) oluşur. Kendiliğinden gelişen mutasyonlar bazı fiziksel ve kimyasal

faktörlerle oluşabilir ve bakteri hücresinde yapısal değişimler oluşur. Böylece hücrenin antibiyotiğe permeabilitesi azalabilir ya da hücre içerisinde antibiyotik hedef bölgesinde değişiklikler olabilir. Kendiğinden gelişen kromozomal mutasyon oranı 10^{-7} ile 10^{-12} dir. Bu nedenle Kliniklerde bu tip direncin görülme olasılığı düşüktür ve nadiren sorun yaratır (Yüce, 2001).

Ekstrakromozomal direnç; birçok farklı yollarla aktarılan transpozon, integron ve plazmid adı verilen kalıtsal elemanlara bağlıdır (Yüce, 2001).

Transpozonlar, bakteri kromozomunun farklı yerlerine yerleşebilen ya da plazmidten plazmide, plazmidten DNA veya bakteriyofaja ve kromozomdan plazmide aktarılabilen; kendi kendilerine replike olamayan, bu nedenle plazmid bakteriyofaj veya kromozom gibi bir replikon üzerinde bulunan DNA dizileridir. Direnç genlerini taşıyan genetik materyal ve plazmidler bir bakteriden diğerine transpozisyon, transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon gibi farklı mekanizmalarla aktarılırlar. Plazmid ya da kromozom üzerindeki direnç genleri, bakterinin bölünmesi ile yavru hücrelere aktarılır (vertikal geçiş). Dirençli suşun ve direnç genlerinin yayılımı bu yeni hücrelerin çoğalması ile de gerçekleşir (klonal yayılım). Konjugasyon ile plazmidler yatay bir şekilde de aktarılabilirler (Yüce, 2001).

Konjugasyon, genetik elemanın iki bakteri hücresinin teması sonucunda aktarımıdır. Direnç plazmitleri; türler arası, Gram pozitif ve negatif bakteri türleri arasında da aktarılabilirler. Direnç genlerinin yeni konaklara aktarımında plazmid transferinden başka mekanizmalar da bulunmaktadır. Transpozisyon ile transpozon ya da transpozabl elementler diye bilinen kısa DNA dizileri aktarılabilir. Özellikle Gram-olumlu bakterilerde bulunan konjugatif transpozonlar, plazmid olmadan da gen aktarımını sağlayabilir. Direnç genlerinin son yıllarda özellikle transpozonlarca taşındıkları anlaşılmıştır. Bu tip aktarım olaylarının düşük yoğunluklu antibiyotik varlığında hızlanması önemli noktadır (Yüce, 2001).

Transformasyon, ortamda gelişigüzel bulunan DNA'nın bakteri hücresinin içerisine alınıp bu şekilde de direnç genlerinin aktarılabilmesidir. Transdüksiyon ise

direnç genlerinin bakteriyofaj aracılığı ile transferi olup, sıklıkla in vitro koşullarında direnç aktarımı için uygulanır (Yüce, 2001).

Plazmid ya da kromozom üzerindeki antibiyotik direnç genlerinin birbirleri ile bağlantılı olduğu ve başlangıç bölgesinin yakınında özel integrasyon birimlerinin olduğu gözlemlenmiş ve bu birimlere integron adı verilmiştir. Rekombinasyonun çok sık görüldüğü sıcak noktaları, integronlar oluştururlar (Yüce, 2001).

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen ekstrakromozomal DNA parçacıklarıdır ve bakterilerde antibiyotik uygulamasından daha önce de var olduğu öne sürülmektedir. Plazmid genleri, genellikle antibiyotikleri parçalayan enzimlerin üretilmesinden sorumludurlar (Yüce, 2001).

Bakterinin yaşaması için plazmidlerin taşıdığı genetik şifre mutlak gerekli değildir. Lakin, plazmidler antibiyotik direnci gibi bakteriye çevre şartlarına dayanmada üstünlük sağlayabilecek bazı özellikler kazandırabilirler. Bir plazmidde birden fazla antibiyotik grubuna karşı direnç gösterecek genetik şifre taşınabilir. Plazmidler, bir bakteriden diğer bakteriye transfer edilebilirler. Bu transfer sayesinde plazmid aracılığıyla sağlanan direnç kolay şekilde bakteriler arasında yayılabilmektedir (Yüce, 2001).

Plazmidler aracılığı ile sentezlenen β -laktamazlar endişe vericidir, çünkü; β -laktamaz genlerinin plazmid ve transpozonlar üzerinde yer alması demek bir grup bakteride yer alan bu enzimlerin en kısa zamanda diğer gruplarda da görüleceği anlamını taşır (Yüce, 2001).

1.2.3. Çapraz Direnç

Belli bir antibiyotiğe karşı direnç gösteren bazı bakterilerin, aynı ya da benzer mekanizma ile etki eden diğer antibiyotiklere karşı da dirençli olması halidir. Bu durum genellikle yapıları benzer antibiyotikler arasında gözlemlenir. Örnek olarak; eritromisin-oleandomisin, neomisin-kanamisin gibi. Fakat bazen tümüyle ilgisiz antibiyotikler arasında da görülebilir. Linkomisin-eritromisin arasındaki çapraz direnç buna örnek

olarak gösterilebilir. Çapraz direnç kromozomal ya da ekstrakromozomal orjinli olabilir (Yüce, 2001).

1.3. Antibiyotiklere Karşı Oluşturulan Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiklere karşı oluşturulan direnç mekanizmaları 3 grupta incelenir.

1.3.1. İlacın Bağlandığı Reseptör ya da Bağlanma Bölgesinde Oluşan Değişiklikler

Her ilacın bağlandığı hedef bölgesi farklıdır. Bunlar çeşitli enzimler ve ribozomlar olabilir. Bazen tek bir mutasyon sonucu ilaca bağlanma özelliği yeni bir hedef oluşturabilir. Örneğin, 30S ribozomal alt birimin S12 proteinindeki mutasyonlar, streptomisin direncine yol açar. Ribozomal hedefte değişiklik ile ilgili direnç en fazla makrolid grubu antibiyotiklerde gözlenir. Tek basamaklı bir değişim söz konusu olduğundan bu tip direnç hızla yayılır ve kolay kazanılabilir (Yüce, 2001).

Bazen de bir dizi mutasyon ya da yabancı DNA'nın kromozoma eklenmesi sonucu hedef bölgesi değişimi olabilmektedir (Yüce, 2001).

Hedef yapısındaki değişimler, β -laktam, kinolon, glikopeptid, makrolid, tetrasiklin ve rifampisine direnç gelişmesinde önemlidir (Yüce, 2001).

1.3.2. İlacın Enzimatik İnaktivasyonu

Gram olumlu-olumsuz bakterilerin birçoğu birçok antibiyotiği parçalayan enzimler sentezler. Antibiyotik direncinde en önemli mekanizmalardan biri de bu yoldur. Bu grupta, aminoglikozitlerin yapısını modifiye eden asetilaz, adenilaz, ve fosforilaz enzimleri, kloromfenikölü parçalayan kloromfenikol asetil transferaz, eritromisini inaktive eden eritromisin esteraz ve β -laktam antibiyotikleri parçalayan ve sayıları giderek artan β -laktamazlar örnek gösterilebilir (Yüce, 2001).

1.3.3. Bakteriyel Membran Değişiklikleri

Bakteriyel membran değişiklikleri iç ve dış membran permeabilitesinde azalma ve ilacın dışarı atılması mekanizmaları ile gerçekleşir.

1.3.3.1. İç ve Dış Membran Permeabilitesinde Azalma

İlacın hücre içine alımındaki azalmadan ya da hızla dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanan dirençtir. Antibiyotiklerin etkili olabilmesi için bakteri hücresine penetre olması gereklidir. Örneğin, β -laktam ajanların sitoplazmik zarın dış yüzüne ulaşması gereklidir. Gram-olumsuz bakterilerde görülen dış membran, lipidden zengin tabaka olup antibiyotiklerin hücreye girmesini önleyen bariyer görevi yapar ki, bu tabaka Gram-olumlu bakterilerde yoktur. Gram-olumsuz bakterilerde antibiyotiklerin hücre içine girmesi, dış membranda bulunan porinler aracılığı ile olur. Fakat bakteriler bazı koşullarda bulunduğu ortamın ozmolaritesine göre farklı porinler yapabilirler. Membran porin proteinlerindeki değişim sonucu geçirgenliğin azalmasını mutasyonlar yaparak dirençli suşlar ortaya çıkarabilirler (Yüce, 2001).

İç membran (sitoplazmik zar) permeabilitesindeki değişikliklerle kazanılan dirence aminoglikozidler örnek verebiliriz. Gerek Gram-olumlu gerekse olumsuz bakterilerde aminoglikozitlerin ribozomlara ulaşabilmesi için iç zarı geçmesi gerekmektedir. Aminoglikozitlerin sitoplazmik zarı geçmesi ise enerji ve oksijene bağımlı aktif transport mekanizması ile gerçekleşir. Hiperozmolarite, anaerop koşullar ve düşük pH bu evreyi engeller. Bu nedenle anaerop bakteriler aminoglikozidlere doğal dirençlidir (Yüce, 2001).

1.3.3.2. İlacın Dışarı Atılması (Aktif Pompa Sistemi)

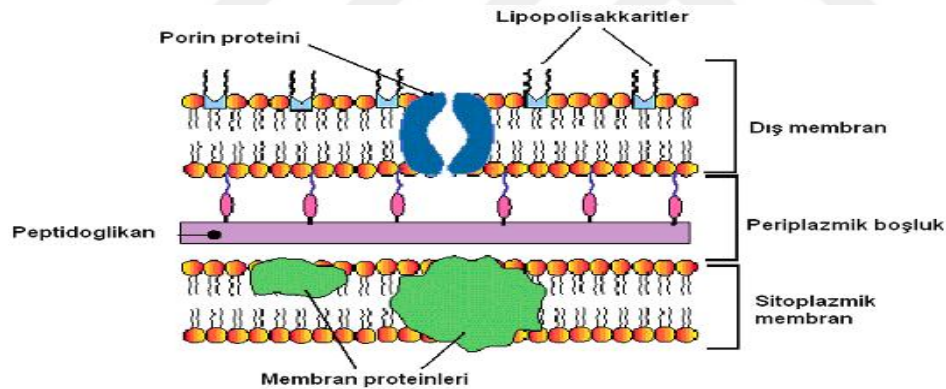
Aktif pompa sistemlerinin varlığı yaklaşık 20 yıl önce tetrasiklinler için belirlenmiştir. Tetrasiklin, hücre içinde birikemez ve aktif pompalama sistemi ile dışarı atılır. Bu tip direnç kromozom ya da plazmid kontrolündedir (Yüce, 2001).

1.3.4. Alternatif Bir Metabolik Yolun Kullanılması

Bakterilerin bazıları hedef değişimlerinden farklı olarak antibiyotiğe duyarlı hedefe gereksinimi ortadan kaldıracak yeni bir metabolik yol geliştirebilirler. Örneğin bakteriler folat sentez etme yerine ortamdan hazır folat alma özelliği kazanabilirler. Sülfonamid ve trimetoprim direncindeki durum buna örnektir (Yüce, 2001).

1.4. Gram Negatif Bakteri Hücre Duvar Yapısı ve Penisilin Bağlayan Proteinler

Gram negatif bakterilerin hücre çeperi sıkı ve çapraz bağlı peptidoglikanlardan oluşan ve yüksek iç ozmotik basıncına karşı hücre şeklini koruyabilen karmaşık yapıdadır. İçten dıőa doğru; iç zar, periplazmik aralık, peptidoglikan tabakası ve dış zar (lipopolisakkarit tabaka) şeklinde katmanlaőmıştır (Şekil 1). Dış zar ile hücre zarı arasında periplazmik aralık bulunur.



Şekil 1. Gram negatif hücre duvar yapısı. (URL-1)

Peptidoglikan, peő peőe 20-100 adet N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin oluşturduğu zincirlerin üç boyutlu ağı şeklindedir. Bakteriyel transpeptidazlar (penisilin bağlayan proteinler, PBPs) üç boyutlu ağı oluşturan en temel enzimlerdir. Bütün PBP'lerin glikoziltransferaz, transpeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitesi vardır. Fizyolojik rolleri, peptidoglikan sentezidir. Düşük moleküler ağırlıktaki PBP'ler karboksipeptidaz, yüksek moleküler ağırlıkta olanlar ise transpeptidaz olarak bilinirler. Yapısal olarak β -laktamazlara çok benzeyen PBP'ler, plazma zarına tutunmuşlardır ve periplazmik aralığa doğru çıkıntı yaparlar. Periplazmik boşlukta enzimin aktif bölgesi yer almaktadır. β -laktam ajanlar PBP'lerin substrat analoglarıdır. PBP'ler aynı β -

laktamazlar gibi β -laktam ajanlara bağlanır ve onları hidroliz ederler. Hidroliz olayı çok düşük olduğundan olay geri dönüşmez açıl-enzim ara kompleksi oluşmasına, açıl ara türevinden ayrılmayan enzimin hücre çeperi sentezindeki görevi yapamamasına, hücre çeper sentezinin durmasına ve yapım-yıkım dengesinin yıkım yönünde bozulmasına neden olur. β -laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir mekanizma hedef PBP'lerin yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanmaması şeklindedir. Farklı PBP'lerin farklı β -laktam ajanlara bağlanma afiniteleri ve etkilendikleri antibiyotik düzeyleri birbirinden farklıdır. Bu durum β -laktam antibiyotiğinin antibakteriyel etkinliklerinin neden birbirinden ayrı olduğunu kısmen açıklayabilmektedir. PBP'lerin amino asit dizileri birbirinden çok farklı olmasına rağmen genel olarak yapıları birbirine benzemektedir. β -laktam antibiyotiklerin aynı anda birden fazla PBP'yi inaktive etmesi bakteri için ölümcül bir sonuç doğurmaktadır (Torol, 2008).

1.5. β -Laktam Antibiyotikler

Bu grup antibiyotikler, 1929 yılında Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum*' un antibakteriyel etkisinin gözlenmesi ve 1940'lı yıllarda Florey (Oxford) grubunun kristalize penisilini üretmeleri ile kliniğe girmiştir (Akın vd., 2013). Gram negatif ve Gram pozitif bakteri infeksiyonlarında kullanılmaktadırlar (Düzgün, 2015). β -laktam antibiyotikler, dünyada en yaygın olarak kullanılan antibakteriyel ajandır (Hamança, 2009). Etkinlikleri, kimyasal modifikasyonlar ile aktivitelerinin artırılabilir olması ve de güvenilir olmaları bu antibiyotik grubunun sıklıkla tercih edilme sebepleridir (Sarı, 2014).

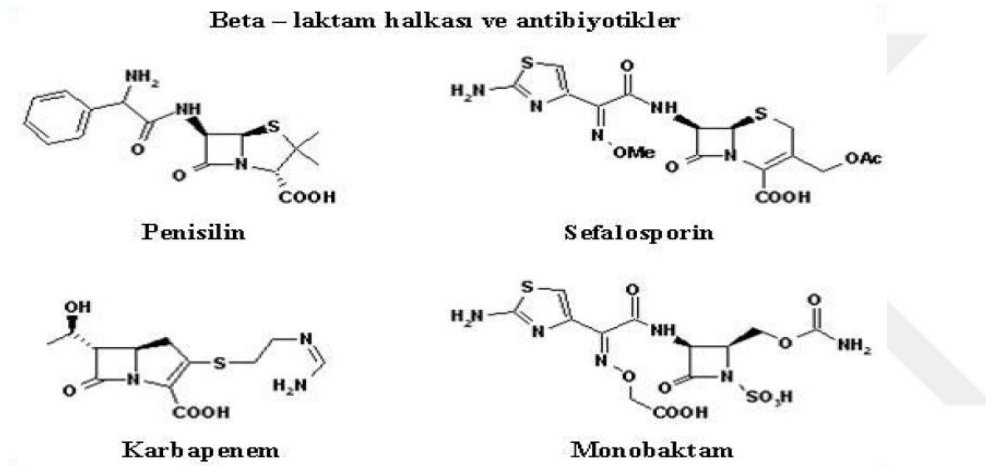
β -laktam antibiyotikler eklenmiş yan karboksil gruplarından dolayı asidik yapıdadırlar, porinleri kullanarak periplazmik boşluğa geçerler ve suda kolayca çözünürler. Gram negatiflerde dış zarı en iyi geçen β -laktam, en etkili antibiyotiktir (Torol, 2008). β -laktamlar bakterisidal etkilidirler (URL-2).

β -laktam antibiyotikler; antibakteriyel etkiden sorumlu çekirdek kısmında β -laktam halkası içeren antibiyotiklerdir. β -laktam halkası bir azot ve üç karbon içeren doymuş bir halkadır (Akın vd., 2013). Bunlardan monobaktamlar (β -laktam halkası tek

başına bulunur.) dışında grubun öteki üyelerinde β -laktam halkası beş ya da altı üyeli bir başka halkayla birleşmiş durumdadır (Düzgün, 2015).

β -laktam antibiyotikler kimyasal yapılarına göre 4 grupta toplanırlar (Şekil 2).

- Penisilin grubu β -laktamlar
- Sefalosporin grubu β -laktam antibiyotikler
- Karbapenemler
- Monobaktam grubu β -laktamlar (Öncül, 2002).



Şekil 2. Kimyasal yapılarına göre antibiyotikler. (Hamaçça, 2009).

Ayrıca, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam da yapılarında β -laktam halkası bulundurulur. Bu ajanların penisilinlere direnç gelişmesinde önemli rolü vardır ve β -laktamaz enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler.

1.5.1. Penisilinler

Tıp alanında kullanılan en eski antibiyotiklerdir (Öncül, 2002). Penisilinlerin genel olarak temel yapısı β -laktam halkasına eklenmiş bir thiazolidine ve C6 pozisyonunda bir yan zinciri içerir. Genel olarak Gram-pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösterirler (Düzgün, 2015). Buna karşın, verem basiliyle Gram-negatif basillere tesirli değildirler. Konakta çok düşük toksik etkiye sahip olduklarından dolayı bakteri toksinleriyle meydana gelen hastalıklara karşı da etkileri yoktur (tetanos, şarbon, difteri gibi) (Akın vd., 2013).

Penisilin grubu antibiyotikler, bakterinin hücre çeperi sentezi sırasında transpeptidasyon aşamasında görevli olan ve transpeptidaz ismi ile de anılan PBP'lere bağlanarak sentez aşamasında enzimin baskılanmasına neden olur. Enzimin baskılanmış olması peptidoglikan tabakalarına sağlam peptidoglikan monomerlerinin eklenmesini engelleyerek çeper bütünlüğünün bozulmasına ve bakterinin dış ortama karşı direncinin kaybına yol açar, sitoplazma zarının parçalanmasına ve hücrenin ölmesine neden olur.

Penisilinlerin farmakodinamik etkinliği ve dokulara dağılımı, moleküler yapılarına ve proteine bağlanma oranlarına göre değişiklik gösterirler. Penisilinler moleküler yapılarına göre; doğal penisilinler, penisilinaza dirençli penisilinler, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve β -laktamaz inhibitörlü penisilinler olmak üzere 6 grupta sınıflandırılması Tablo 1' de verilmiştir (Öncül, 2002).

Tablo 1. Penisilinlerin moleküler yapılarına göre sınıflandırılmaları.

Doğal Penisilinler	Penisilin G (benzilpenisilin) Kristalize penisilin G Prokain penisilin G Benzatin penisilin G Penisilin V (fenoksimetil penisilin)
Penisilinaza Dirençli Penisilinler	Metisilin Nafsilin Isoksazolil penisilinler Oksasilin Kloksasilin Dikloksasilin Flukloksasilin
Aminopenisilinler	Ampisilin Amoksisilin Ampisilin esterleri Bakampisilin Pivampisilin Talampisilin
Karboksipenisilinler	Karbenisilin Tikarsilin
Üreidopenisilinler	Mezlosilin Azlosilin Piperasilin Amoksisilin-klavulanik asit
β - Laktamaz İnhibitörleri	Ampisilin-sulbaktam Tikarsilin-klavulanik asit Piperasilin-tazobaktam

Doğal Penisilinler: Diğer penisilin türlerine göre molekül yapıları daha sade olan gruptur. Gram-pozitif mikroorganizmalara en fazla etki gösteren penisilin grubudur. Penisilinaz salgılayan Bacteriodes kökenleri dışında anaerobik bakterilere ve Listeria monocytogenes'e de etkilidirler. Giderek artış gösteren penisilin direnci nedeniyle pnömokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanımı giderek azalmıştır (Öncül, 2002).

İlk bulunan kristalize penisilin G'dir. Prokain penisilin ve benzatin penisilin penisilin G'nin depo türevleridir (Akın vd., 2013). Penisilin V (Fenoksimetilpenisilin) oral kullanımı olan tek doğal penisilindir. Penisilin G'ye benzerliği Gram-pozitif bakterilere karşı etkinliğidir (Öncül, 2002).

Penisilinaza Dirençli Penisilinler: Penisilinaz enzimi üreten stafilkoklar için geliştirilmiş β -laktam antibiyotiktir. Doğal penisilinlerin etkili olduğu bakterilerden stafilkoklar dışındaki bakterilere daha az etkili veya etkisizdir. Buna karşın stafilkokların büyük çoğunluğuna etkili penisilin türleridir. Metisilin klinik olarak kullanıma giren penisilinaza dirençli semisentetik penisilinlerin ilkidir. Nafsilin ve oksasilin metisilin yerini alan ve aynı etkide kullanılan diğer antibiyotiklerdendir. İsozazolil penisilinlerden olan oksasilin bu grubun en düşük oranda oral absorbe edilen antibiyotığıdır (Öncül, 2002).

Aminopenisilinler: Ampisilin, amoksisilin, ve bakampisilin bu grupta yer alır. Penisilin grubu β -laktam antibiyotikleri arasında en fazla kullanılan gruplardan biridir. Bu grup Gram-pozitif ve negatif bakterilerin β -laktamaz enzimlerine dayanıklı değildir. Aminopenisilinlere β -laktamaz inhibitörlerinin eklenmesi ile bu bakterilere karşı güçlü bir etkinlik oluşturulmaktadır (Öncül, 2002).

Karboksipenisilinler: Grupta yer alan karbenisilin ve tikarsilin, P. aeruginosa da dahil birçok aerop Gram negatif çomağa etkili olan fakat Klebsiella türlerine etkisiz penisilin türleridir. İndol Proteus türlerine de etkilidir. Bu antibiyotiklere karşı gelişen β -laktamaz türü dirençler nedeni ile ampirik tedavide kullanımları pek yaygın değildir (Öncül, 2002).

Üreidopenisilinler: Grupta, azlosilin, mezlosilin ve piperasilin bulunmaktadır. Yalnızca parenteral kullanılabilir. Aminoglikozidlerle kombine edildiklerinde ciddi Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olan geniş spektrumu sağlarlar (Öncül, 2002).

β -Laktamaz İnhibitörlü Penisilinler: β -laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin kullandıkları en yaygın direnç mekanizması bu antibiyotikleri inaktive eden β -laktamaz enzimlerinin üretimidir. Bu enzimler penisilin, sefalosporin, monobaktam ya da karbapenem gruplarından birini veya birkaçını enzimatik hidroliz yoluyla etkisiz hale getirebilirler. Değişik bakteriler tarafından plazmid veya kromozom kontrolünde sentezlenen çok sayıda ve farklı yapıda β -laktamaz enzimleri bulunmaktadır ve klinik olarak giderek daha önemli bir sorun oluşturmaktadırlar. Bu amaçla β -laktamaz inhibitörleri geliştirilmiştir. Fakat, inhibitörlerin de tüm enzim tiplerine karşı etkili olmadığı bilinmektedir (URL-2).

Diğer penisilinlere göre daha geniş bakteri spektrumu ile enfeksiyonların tedavisinde hemen her yaş grubunda güvenle kullanılan antibiyotiklerdir. Bu grupta bulunan antibiyotikler pek çok β -laktamaz enzimi üreten bakterilere karşı etkilidirler (Öncül, 2002).

1.5.2. Sefalosporinler

1945 yılında ilk sefalosporin, mantar *Cephalosporium acremonium*'un kültüründen elde edilmiştir. Parental kullanım için ilk sefalosporin; kimyasal olarak modifiye edilmiş sefalosporin-C olan sefalotin'dir (Düzgün, 2015). Birbirinden farklı özellikleri ve moleküler yapıları ile günümüzde dördüncü kuşak sefalosporinlere kadar farklı grupları kullanımdadır (Öncül, 2002).

Tüm sefalosporinler 7-amino sefalosporinik asit çekirdeğinden türetilmişlerdir. Yapılan yan zincir ilaveleri ile antibakteriyel aktivite ve farmako kinetiklerinde değişimler elde edilmiştir. Sefalosporinler için çeşitli sınıflamalar yapılmış ancak bunlardan en yaygın olanı Gram-negatif basillere karşı etki spektrumlarına göre kuşak veya jenerasyon sınıflamasıdır. Birinci kuşak sefalosporinlerin spektrumu dardır ve

Gram-pozitif koklara etkileri belirgindir. Enterokoklar ve metisiline dirençli stafilkoklar hariç Gram-pozitif kokların çoğuna etkilidirler. Ayrıca *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* gibi bazı Gram-negatif basillere de etkilidirler. İkinci kuşak sefalosporinlerin Gram-pozitif koklara etkileri değişmekle birlikte Gram-negatif bakterilere etkileri artmıştır. Özellikle *Haemophilus influenzae*'ya karşı etkilidirler. İkinci kuşaklar içinde yer alan sefamisinler anaeroblara en etkili sefalosporinlerdir. Üçüncü kuşakta yer alan sefalosporinler Gram-negatif bakterilere çok etkili iken stafilkoklara etkinlikleri azdır. Dördüncü kuşak sefalosporinler ise *Pseudomonas aeruginosa* dahil Gram-negatif bakterilere ve Gram-pozitif koklara etkilidir (Akın vd., 2013).

Sefalosporinlerin ortak kimyasal özelliği, altı üyeli dihidrotiyazin halkası ve buna bağlı dört üyeli β -laktam halkasıdır. B-laktam halkasının 7. konumundaki farklılıklar antibakteriyel etkinin, 3. konumundaki farklılıklar ise farmakokinetik ve toksik özelliklerinin belirlenmesinde rol oynar. Sefalosporinlere direnç başlıca üç mekanizma ile gelişmektedir. Bunlar antibiyotiğin peptidoglikan tabakadan geçişinin engellenmesi, PBP'lerin ilaca afinitelerinin azalması veya β -laktamaz enzimi ile antibiyotiğin parçalanmasıdır (Öncül, 2002).

1. Kuşak sefalosporinler: Bu grupta sefalotin, sefazolin ve sefasetril gibi parenteral, sefalekssin, sefadroksil ve sefaloglisin gibi oral ve sefradin gibi hem parenteral, hem de oral kullanılabilen bileşikler bulunmaktadır. Özellikle *Staphylococcus aureus*'un salgıladığı β -laktamazlara dirençlidirler. Gram negatif mikroorganizmaların β -laktamazları tarafından inaktive edilirler. *Haemophilus*'lara çok az etkinlikleri vardır. Duyarlı *Streptococcus* ve *Staphylococcus* tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda kullanılırlar (Akın vd., 2013).

2. Kuşak sefalosporinler: Sefaklor ve sefprozil gibi oral, sefamandol, sefmetazol, sefoksitin, sefonisid ve sefotetan gibi parenteral, sefatamet ve sefuroksim gibi hem parenteral hem oral kullanılan sefalosporinleri içerir. Gram-negatif bakterilere etkinlikleri birinci jenerasyondan daha fazladır fakat *Staphylococcus* ve *Streptococcus* üzerine etkinlikleri daha azdır. β -laktamazlara kısmen dayanıklıdır (Akın vd., 2013).

3. *Kuşak sefalosporinler*: Sefpodoksim oral, sefiksim hem oral hem parenteral, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim ve sefodizim yalnız parenteral kullanılan ve ülkemizde bulunan 3. kuşak sefalosporinlerdir. Bu grup sefalosporinlerin en etkili olduğu bakteriler Gram-negatif çomaklardır. Gram-pozitif bakterilere karşı etkinlikleri 1. kuşaklara oranla oldukça azdır (Akın vd., 2013).

4. *Kuşak sefalosporinler*: Bu grupta sefepim ve sefpirol bulunmaktadır. Gram-negatif bakterilere karşı etkinliği mükemmeldir. Sadece parenteral kullanılır. Kullanım alanları 3. kuşak sefalosporinler gibidir (Akın vd., 2013).

1.5.3. Karbapenemler

Karbapenemler ilk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen bir bileşik olan tienamisin türevleridir. Temel yapı olarak penisilinin laktam halkasına benzemektedir. Fakat bu yapıda, 1. pozisyondaki sülfür yerine karbon bulunmakta ve beş üyeli halkadaki 2. ve 3. karbon atomları arasında doymamış bağ yer almaktadır. Karbapenem grubu antibiyotiklerin birçok β -laktamaz enzimine dayanıklılığı, hidroksietil yan zincirindeki farklı trans konfigürasyonundan kaynaklanmaktadır (Demir, 2013). Bu yan zincir, penisilin ve sefalosporinlerin cis konfigürasyonundan farklı olarak karbapenemlerde trans konfigürasyonundadır. Bu farklılık karbapenemlere diğer β -laktamazlara oranla daha güçlü bir β -laktamaz aktivitesi kazandırır (Öncül, 2002). Ayrıca hidroksiasetil yan zinciri bütün karbapenemlerde ortak olmakla birlikte, oral biyoyarlanımı olan faropenem, 1. pozisyondaki sülfür nedeniyle diğer karbapenem sınıfındaki üyelerden farklılık göstermektedir. Bu nedenle son olarak CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) karbapenem sınıfı ilaçları “karbapenemler” ve “penemler” olarak iki alt gruba ayırmıştır. Penemler alt grubunda sadece faropenem yer almaktadır. İmipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem ise karbapenem alt grubunda bulunmaktadır (Demir, 2013).

Karbapenemler, günümüzde mevcut antibiyotikler içerisinde en geniş etki alanına sahip olan gruptur. İmipenem ve meropenem klinik alanda kullanılan karbapenemlerdir (URL-2).

Karbapenemler, bugüne kadar geliştirilen en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif aerob ve anaerob bakterilere karşı etkilidirler. Karbapenemler, böylesine geniş spektrumlarına rağmen *E.faecium* ve metisiline dirençli *S.aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P.cepacia* gibi bakterilere etkisizdir. Bunların dışında karbapenemler hücre içine giremediklerinden hücre içi parazitlere de etkili değildirler (Öncül, 2002).

İmipenem: İmipenem bütün β -laktam antibiyotiklerin yeni grubu karbapenem sınıfı antibiyotiklerin ilkidir (Akın vd., 2013). İmipenem bilinen en geniş spektrumlu antibiyotik olarak bilinmekte ve Gram-pozitif, Gram-negatif, aerob ve anaerob mikroorganizmaları içine alan çok geniş bir etkinlik kapsamı vardır. İmipenem, insan renal tübüllerinde bulunan dehidropeptidaz-1 (DHP-1) adlı enzim tarafından hidrolize uğratılmaktadır ve bu nedenle, DHP-1 inhibitörü olan silastatinle verilmesi gerekmektedir (Demir, 2013).

Meropenem: İmipenemden farklı olarak DHP-1 enzimine karşı dayanıklı olduğu için tek başına parenteral kullanılır. Etki süresi imipeneme göre daha uzundur. İmipenem gibi aynı antibakteriyel spektruma sahiptir. Genellikle Gram-pozitiflere karşı etkisi imipenem'e göre daha düşük, Gram negatif bakterilere etkisi ise daha yüksektir. İmipenem ile kıyaslanacak olursa direnç gelişimi daha güç olur (Demir, 2013).

Menenjit tedavisinde; meropenemin en az sefotaksim kadar etkili olduğunu ve iyi tolere edildiği araştırılmıştır (Demir, 2013).

Ertapenem: Birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif aerobik ve anerobik bakterilere karşı aktivitesi vardır. Genellikle toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Demir, 2013).

DHP-1 inaktivasyonuna karşı imipenemden daha dayanıklıdır ve bundan dolayı silastatin ya da betamipron gibi bir DHP-1 inhibitörü ile birlikte verilmesi gerekmez. Ertapenem, β -laktamlara karşı diğer karbapenemlere göre daha az dayanıklıdır. Ertapenem diğer karbapenemlerin sahip olduğu birçok yararlı yapısal özelliklere sahiptir, fakat ertapenemi diğer karbapenemlerden ayıran en önemli özellik dış

membranında benzoik asid yerine meta grubunun yer almasıdır ki bunun sonucunda molekülün plazma proteinlerine bağlanma kapasitesi artar. İmipenem'in proteine bağlanma kapasitesi % 20 iken ertapenemin proteine bağlanma kapasitesi % 95'tir. Bu yüksek protein bağlanma kapasitesi sonucunda ertapenemin serbest ya da bağlanmamış kısmı azalır ve plazma yarılanma zamanı uzar (Demir, 2013).

Doripenem: Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumda aktivitesi olan parenteral-1 β -metil karbapenemdir. DHP-1'e karşı stabildir. Gram-negatif bakterilere meropenem kadar etkinliği var Gram-pozitif bakterilere de imipenem kadar etkidir. *P.aeruginosa*'ya karşı etkili en güçlü karbapenem grubudur (Demir, 2013).

1.5.4. Monobaktamlar

Monobaktamlar içeriğinde bulunan monosiklik yapıdaki çekirdek nedeniyle diğer β -laktamlardan farklılık gösteren β -laktam antibiyotiklerdir. Bu monosiklik β -laktamlar, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Gluconobacterium*, *Flexibacterium* ve *Pseudomonas* gibi toprakta yaşayan değişik bakteriler tarafından üretilir (Öncül, 2013). Klinikte kullanılan tek monobaktam aztreonamdır (Sykes vd., 1981). Aztreonam, *Chromobacter violaceum*'dan elde edilmiştir (Öncül, 2013).

Aztreonam tamamen sentetik olarak elde edilmektedir (Akın vd., 2013). Güçlü Gram-negatif etkinliğe sahiptir. Fakat, Gram-pozitif bakteriler ve anaerob bakterilere karşı etkinliği yoktur. Dar spektrumlu antibiyotiktir (URL-2)

1.6. β -Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde antibiyotiklere direnç gelişiminde genellikle 3 mekanizma vardır (Demir, 2013).

1.6.1. Penisilin Bağlayan Protein (PBP) Değişiklikleri

Antibiyotikler kendilerine özgü bağlanma bölgelerini tanırlar ve bağlanırlar. Antibiyotiklerin bakteri hücrelerindeki hedefleri, hücrenin üremesi ve devamı için yaşamsal öneme sahip proteinlerdir. Bu hedef bölgedeki tek bir mutasyon bu etkileşimi değiştirebilmektedir. β -laktam antibiyotikler kendilerine özgü PBP'yi tanıyıp bağlarlar. PBP üzerinde meydana gelen değişiklikler sırası ile; PBP'nin aşırı sentezi, duyarlı bir PBP'nin daha dirençli olanlar ile rekombine olması, PBP'nin afinitesinde azalmaya yol açacak nokta mutasyonların β -laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşturması şeklinde özetlenebilir (Torol, 2008).

PBP'lerdeki değişikliklere bağlı gelişen direnç *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ve *Pseudomonas* spp.'de gözlenmiştir. *Streptococcus pneumoniae*'de gözlemlenen penisilin direnci yalnızca bu mekanizma ile oluşmaktadır. Değişmiş bu PBP'lerin DNA segmentlerinin arasında büyük olasılıkla dirençli başka bir konaktan alınan DNA segmentleri bulunmaktadır (Hamaçça, 2009).

1.6.2. Dış Zar Proteinindeki Değişiklikler

Antibiyotiğin hücre içine alınımındaki azalmadan ya da hızla dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanan bir direnç söz konusudur. Hedefe ulaşan antibiyotik miktarında azalma bakteriyel dış zar proteinlerindeki değişiklik ile gerçekleşmektedir (Torol, 2008). Gram-negatif bakterilerde, β -laktam molekülleri dış membranı "outer membrane protein (Opr)" adı verilen, porin proteinlerden oluşan porlar yolu ile geçmektedirler (Hamaçça, 2009). Örneğin, *E.coli*'de OprC ve OprF değişimleri ile β -laktamlara, *P. aeruginosa*'da özel bir kanal proteini olan OprD kaybı ile karbapenemlere direnç gelişir (Yüce, 2001). Bakterilerdeki porinlerin sayısı, özellikleri (çözünürlük, yük ve büyüklük) ve antibiyotiğin özellikleri antibiyotiğin hücre içine giriş hızını belirlemektedir. Özgül porinlerin kaybedilmesi sonucu β -laktam antibiyotiklere direnç oluşabilmektedir (Hamaçça, 2009).

Birçok sefalosporin ve geniş spektrumlu penisilinler moleküler yapılarındaki uzun yan zincirler nedeniyle porinlerden yavaş geçerler. İmipenem diğer β -laktam

antibiyotiklere göre daha düşük moleküler ağırlıkta olduğundan porinlerden daha hızlı geçiş yapar (Demir, 2013).

Aktif pompa sistemleri ile antibiyotiğin hücre içerisinde birikimi engellenebilir. Aktif pompa sistemi her tür hücrede bulunmakta, antibiyotik gibi amfilik ilaçlardan hücreleri korumaktadır. Aktif pompa sistemlerini ilacı hücre dışına atabilen proton-motor gücünü kullanan transmembran proteinleri oluşturur (Torol, 2008). Örneğin, *E. coli* suşlarında marRAB operonunda mutasyon oluşması sonucunda; kinolon, kloromfenikol, tetrasiklin ve β -laktam direnci gelişebilir (Yüce, 2001).

1.6.3. β -Laktamazlar

β -laktamlara karşı direnç geliştirmelerinin temel nedeni; bakterilerin hidrolitik enzimler üretmeleridir. Bu hidrolitik enzimler, β -laktamazlar olarak isimlendirilirler ve β -laktam halkasındaki amid bağına parçalayarak β -laktamları inhibe ederler. β -laktamazlar, Gram pozitif bakterilerde ya sitoplazmik membrana giderler ya da ekstraselüler yüzeye atılırlar (Düzgün, 2015).

β -laktamazlar yapısal olarak penisilin bağlayan proteinlerle (PBP) ilişkilidirler. İlk β -laktamazlar; 1940 yılında penisilinlerin klinik kullanımı olmadan önce *Escherichia coli* de rapor edilmiştir. Daha sonra β -laktamazlar Gram negatif, Gram pozitif ve *Mycobacteria*'da rapor edilmiştir (Düzgün, 2015).

1960'lardan sonra semisentetik penisilinler, metisilin ve ampicilin, 1. kuşak sefalosporinlerden sefaloridin ve sefalotinin geliştirilmesi ile Gram negatif çomaklarda bulunan β -laktamazlar önemli bir direnç mekanizması haline gelmişlerdir. Gram negatif bakterilerde çok kısa sürede dirençte artış gözlenmesinin nedeni, çok daha fazla çeşitte β -laktamaz bulundurması ve plazmid kontrolünde sentezleyebildiğindedir. β -laktamazlarla hidrolize olmayan yeni β -laktamların geliştirilmesi, 1980'li yıllarda 3. kuşak sefalosporinlerin yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Daha sonra 1983 yılında Almanya'da *Klebsiella pneumoniae* suşunda plazmid kaynaklı bir β -laktamazın, 3. kuşak sefalosporinleri de parçaladığı bulunmuştur (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Bu yeni β -laktamaz *Klebsiella spp.* türlerinde sıkça bulunan SHV-1 β -laktamazından mutasyonla oluşan SHV-2 β -laktamazıdır (Tablo 2).

Tablo 2. SHV-1 β -laktamazından mutasyonla oluşan SHV-2 enzimi.

SHV-1: 227.....IADKTGA^G²³⁴ERGARG.....240
SHV-2: 227.....IADKTGA^S²³⁴ERGARG.....240

Ardından, Fransa'da *K. Pneumoniae* suşlarında seftazidime dirençli TEM-2 enziminden yalnızca iki aminoasit farkı bulunan plazmid kaynaklı TEM-3 β -laktamaz belirlenmiştir (Tablo 3) (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Tablo 3. TEM-2 enziminden yalnız iki aminoasit farkı bulunan plazmid kaynaklı β -laktamaz.

TEM-2: 30..KVKDAED^Q³⁷LGARVGYL..45..96..SQNDLVE¹⁰²YSPVTEKH.....110
TEM-3: 30..KVKDAED^K³⁷LGARVGYL..45..96..SQNDLVK¹⁰²YSPVTEKH.....110

1.6.3.1. β -Laktamazların Adlandırılması

β -laktamazlar çeşitli şekillerde adlandırılması Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. β -laktamazların adlandırılması (Demir, 2013; Yapar, 2007).

Etkiledikleri substratlara göre	OXA (oksasilin), IMP (imipenem), CARB (karbenisilin),
Biyokimyasal özelliklerine göre	SHV (aktif bölgesinde serin vardır)
İlk izole edildikleri eyaletlere göre	OHIO
İlk izole edildikleri bakterilere göre	AER (Aeromonas), PSE (Pseudomonas)
İlk izole edildikleri suşlara göre	P99
İlk izole edildikleri hasta isimlerine göre	TEM (Temioniera), BIL (Bilal)
İlk izole edildikleri hastahaneye göre	MIR (Miriau Hospital in Providence) DHA (Dhahran Hospital in Saudi Arabia)
Lokale oldukları genlere göre	AmpC, CepA

1.6.3.2. β -Laktamazların Sınıflandırılması

Şimdiye kadar 1000' den fazla β -laktamaz rapor edilmiştir (Düzgün, 2015). β -laktamazlar; Ambler'in moleküler sınıflaması ve Bush-Jacoby-Mederios fonksiyonel sınıflaması olarak 2 gruba ayırabiliriz.

Ambler sınıflamasına göre β -laktamazlar 4 gruba ayrılmaktadır (A,B,C,D). Bu sınıflandırmada aminoasit benzerliklerine bakılır ancak, fenotipik özelliklere bakılmaz (Hamaçça, 2009). A, C ve D sınıfı β -laktamazlar serin bulunur ve serin β -laktamazlar olarak adlandırılır; B sınıfı β -laktamazlar ise çinko bulundurur ve metallo β -laktamazlar olarak adlandırılır (Albayrak, 2008; Dağlar ve Öngüt, 2012).

Bush-Jacoby-Medeiros tarafından 1995 yılında geliştirilmiş olan ikinci sınıflandırma ise biyokimyasal özellikleri (substrat profilleri ve β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi) esas kriter alınarak yapılan sınıflandırmadır (Demir, 2013). Güncellenmiş β -laktamaz grupları ve genel özellikleri Tablo 5 de verilmiştir.

Tablo 5. Güncellenmiş β -laktamaz grupları ve genel özellikleri.

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

CA: klavulanik asit; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic asit; G-S: Genişlemiş-Spektrum; E:Evet; H:Hayır; \pm : kısmen inhibe ediliyor.

Grup 1 β -laktamazlar: Genellikle kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilirler (Hamaa, 2009). AmpC enzimleri olarak da bilinen bu sınıfa ait enzimler *Acinetobacter* kökenli sefalosporinazlar olarak da isimlendirilirler (Sarı, 2014).

Yüksek miktarda enzim üreten mutanlara rastlanılmaktadır. Sulbaktam ve klavulanik asitle inhibe olmazlar (Bedir, 2006). Bu enzimler, 1.,2.,3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilirler (Hamaa, 2009). Sefalotini ve sefaloridini penisilinlerden daha hızlı bir şekilde hidrolize ederler (Bedir, 2006). Sefalosporin grubundan olan sefepim ise grup 1 kromozomal enzimlerin etkilerine göreceli olarak dayanıklıdır. Karbapenem grubu antibiyotiklere etkileri son derece az olmasına rağmen, bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştğinde karbapenem grubu antibiyotiklere direnç gösterebilmektedir (Hamaa, 2009). Kloksasilin ve aztreonam antibiyotikleri ile inhibe olurlar. Yedinin üzerinde izoelektrik noktaya sahiptirler (Bedir, 2006). Gram negatif çubukların çoğunluğında bulunmaktadır, fakat bunların miktarı, dirençteki rolleri ve sentez yolu birbirinden farklıdır. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, MIR-1, LAT-1 ve BIL-1 β -laktamazları da bu grupta yer alır. Moleküler sınıf olarak sınıf C'de yer alırlar (Hamaa, 2009).

Günümüzde 136 tane CMY tipi β -laktamaz aleli, 5 tane ACC aleli, 38 ACT aleli, 1 tane CFE aleli, 23 tane DHA aleli, 12 tane FOX aleli, 1 tane LAT aleli, 18 tane MIR aleli ve 11 tane MOX alelinin olduğu bilinmektedir (URL-3).

Grup 2 β -laktamazlar: Bu grubun tümü moleküler sınıflandırmaya göre sınıf A ve D'de yer almaktadır. Penisilinleri, sefalosporinleri, karbapenemleri, karbenisilini, kloksasilini ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre çeşitli alt gruplara ayrılır (Demir, 2013).

Grup 2a β -laktamazlar: Klavulanik asite duyarlı, penisilini hidroliz eden enzimlerdir (Bedir, 2006). Gram pozitif bakterilerde bulunan penisilinazların birçoğu bu grupta yer almaktadır. Penisilini sefalosporinlerden daha hızlı hidroliz eden enzimler bu grupta yer almaktadır. β -laktamaz enzimlerinin en sık bulunduğu gram pozitifler stafilokoklardır (Hamaa, 2009). *Staphylococcus aureus*'un enzimleri bu grupta

bulunmaktadır. Ayrıca, *Basillus cereus*'un kromozomal β -laktamazları da bu grupta yer almaktadır (Bedir, 2006). Bunlarda bulunan β -laktamazlar plazmid kontrolündedir ve benzilpenisilin, aminopenisilinler ve karboksipenisilinlere karşı aktiftir. Buna karşın, isoksazolil penisilinler, nafsilin ve metisilin bu enzime dayanıklıdır (Hamaa, 2009).

Grup 2b β -laktamazlar: Klavulanik asit ile inhibe olan penisilinazları ve sefalosporinazları içermektedirler. Plazmid kontrolünde bulunan ve yaygın olarak görülen TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu grupta bulunur. Dar spektrumlu sefalosporinlere düşük düzeyde direnç gözlenir (Hamaa, 2009). Yeni kuşak sefalosporinler, aztreonam ve imipenem'e karşı düşük hidrolitik aktivite göstermektedirler (Bedir, 2006). Piperasilin-tazobaktam ve sefaperazon-sulbaktam etkili inhibitör kombinasyonlarıdır. *Haemophilus influenzae*'nin enzimi olan ROB-1 enzimi de bu gruptadır (Hamaa, 2009).

Enterobakterilerde plazmid kaynaklı enzimlerin en yaygını TEM-1'dir ve *E. coli* izolatlarının yaklaşık %50'sinde görülen ampisilin direncinin %90'undan bu enzim sorumludur. Ayrıca bu enzim *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* cinslerinde giderek artan miktarda görülen penisilin ve ampisilin direncinden de sorumludur. SHV-1 en çok *K. pneumoniae* kökenlerinde bulunmakla birlikte *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da da SHV-1 enzimlerine rastlanılmıştır. TEM tipi β -laktamazların aksine SHV-1 β -laktamazlarının nispeten daha az sayıda türevi vardır (Yapar, 2007).

Grup 2be β -laktamazlar: Geniş spektrumlu β -laktamazları (GSBL) kapsayan gruptur. GSBL'ler penisilinler, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksiimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidrolize etmektedir (Hamaa, 2009). Klavulanik asitle inhibe olurlar (Bedir, 2006). Sefamisinler ve karbapenemler bu enzimlere karşı dayanıklıdırlar. Bu enzimler *Klebsiella spp.* ve *E. coli*'lerde daha sık bulunmakla birlikte *Salmonella spp.* ve *Shigella flexneri* de dahil, birçok enterik bakteride grldği bildirilmiştir (Hamaa, 2009). Bu grupta yer alan enzimlerden biri de ilk kez türk izolatlarında izole edilen PER-1 enzimidir (Bedir, 2006).

Günümüzde 172 tane CTX-M, 8 tane PER ve 16 tane VEB 3 tane BEL tipi β -laktamaz aleli bulunmaktadır (URL-3).

Grup 2br β -laktamazlar: Klavulanik asitten etkilenmeyen, GSBL'yi kapsar (Bedir, 2006). TEM ve SHV enzimlerinin inhibitörlere dirençli mutantları bulunmaktadır. İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu TEM türevidir. İnhibitörlere Rezistan TEM (IRT) olarak isimlendirilmiştir (Hamaçça, 2009). Ancak daha sonra köken aldıkları TEM veya SHV'de sıralamaya girmiştir. Örneğin IRT-1 TEM-31, IRT-2 TEM-44 olarak yeniden numaralanmıştır. Günümüzde en az 19 farklı IRT bulunmaktadır. IRT'ler esas olarak *E. coli* izolatlarında bulunmuş, ancak *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* ve *C. freundii*'nin bazı kökenlerinde de gösterilmiştir. IRT'ler klavulanik asit ve sulbaktam ile inhibisyona dirençli olmakla birlikte tazobaktam ve sonradan kullanılan piperasilin/tazobaktam kombinasyonuna duyarlıdır. TEM-50 ve TEM-68 gibi nadir örnekler dışında IRT'ler üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir (Yapar, 2007).

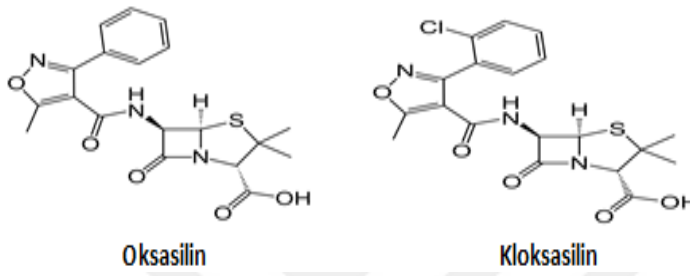
Grup 2c β -laktamazlar: Klavulonik asitle inhibe olur, kloksasilin ve aztreonama zayıf afinite gösterir ve karbenisilini hidroliz eder (Bedir, 2006; Hamaçça, 2009). Moleküler sınıf A'ya girer (Bedir, 2006). PSE-1, PSE-3, PSE-4 enzimleri, *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal AER-1 enzimi bu grupta yer almaktadır (Hamaçça, 2009).

PSE-1 ve PSE-4 β -laktamazları klasik TEM tiplerine benzer direnç paterni göstermekte olup gram negatif bakterilere etkili tüm penisilinler, sefoperazon ve sefsulodin bu enzimlere karşı duyarlıdır. Bu enzimlere sahip *P.aeruginosa* izolatları sıklıkla inhibitör kombinasyonlarına dirençlidir (Yapar, 2007).

Grup 2d β -laktamazlar: Genel olarak klavulanik asit ile inhibe olan kloksasilini penisilinden daha hızlı hidrolize eden β -laktamazları içerir (Hamaçça, 2009). OXA enzimleri bu grupta yer almaktadır.

OXA Ailesi: Fonksiyonel gruplandırmada 2d' de yer alan, moleküler sınıflandırmada sınıf D'de yer alan ve OXA-tipi karbapenemazlar olarak bilinirler. Bu

enzimlerin OXA tipi karbapenemazlar olarak adlandırılmasının nedeni, izoksazolipenisilin (isoxazolypenisillin) oksasilini klasik penisilinlere göre daha hızlı bir şekilde hidroliz edebilmeleri ve klavulanik asit ve EDTA ile inhibe olmamaları sebebiyle olmuştur. Ancak bu tanımlama günümüzde geçerliliğini yitirmiştir çünkü son yapılan araştırmalara göre OXA enzimleri kloksasilin ve oksasilini zayıf olarak inaktive ederken tümü amino ve karboksipenisilinlere karşı oldukça aktiftirler (Torol, 2008). Oksasilin ve kloksasilinin moleküler yapıları Şekil 3' de verilmiştir.



Şekil 3. Oksasilin ve kloksasilinin moleküler yapıları. (URL-4; URL-5).

2012-2014 yılı genel makale taraması yapıldığında OXA-tipi enzimlerin benzilpenisilin, ampisilin, tikarsillin, seftriakson, seftazidim, sefpirom, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefepim, sefuroksim, aztreonam, meropenem, ertapenem, imipenem, amoksisilin, oksasilin, ofloksasin, tobramisin, gentamisin, piperasilin, kolistin, siprofloksasin, streptomisin, kloromfenikol, tetrasiklin, tigesiklin, moksalaktam, fosfomisin ve nalidiksik asit antibiyotiklerine direnç sağladığı tespit edildi.

NaCl'nin inhibitör etkisi vardır. A ve C grubu β -laktamazlara %16 benzerlik gösterirler. Plazmitle taşınması veya integron üzerinde bulunması OXA genlerinin yayılımını kolaylaştırır (Torol, 2008).

Çoklu alignment analizi çalışmalarına göre OXA tipi karbapenemazlar yüksek oranda korunmuş üç aktif bölge elemanı ile tanımlanmaktadır (Sarı, 2014). Bu korunmuş bölgeler enzim reaksiyonları sırasında substrat-enzim etkileşimini kararlı hale getirmede görev alan hidrojen bağlarının ve diğer kovalent olmayan bağların oluşumunda görev aldığı bilinmektedir (Torol, 2008). Bunlardan ilki Ser70-X-X-Lys oluşumlu bir tetrattır (bu yapıda X herhangi bir aminoasitin olabileceğini ifade ederken,

70. Pozisyonadaki serin aktif bölge amino asitini oluşturmaktadır (Sarı, 2014). İkincisi ise Ser118-X-Val/Ile oluşumudur. Üçüncüsü de Tyr/Phe144-Gly-Asn triadı ile birlikte Trp232-X-X-Gly tetradı ile temsil edilmektedir ve A sınıfı enzimlerde veya AmpC enzimlerinde herhangi bir analogu yoktur (Sarı, 2014). Ambler sınıflamasına göre grup A, C ve D β -laktamazlarda korunmuş 3 bölgenin karşılaştırılması Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. Ambler sınıflamasına göre grup A, C ve D β -laktamazlarda korunmuş 3 bölgenin karşılaştırılması.

Ambler Sınıflaması	Element	Element	Element
Grup A	Ser ⁷⁰ -X-X-Lys ⁷³ (S-X-X-K)	Ser ¹³⁰ -Asp ¹³¹ - Asn ¹³² (S-D-N)	Lys/Arg ²³⁴ - Thr/Ser ²³⁵ -Gly ²³⁶ (K-T-G, K-S-G, R-S-G, R-T-G)
Grup C	Ser ⁶⁴ -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 ⁷⁰ -X-X-Lys (S-T-F-K)	Ser ¹¹⁸ -X-Val/Ile (S-X-V)	Tyr/Phe ¹⁴⁴ -Gly- Asn (Y-G-N yada F- GN)

OXA Tip β -laktamazların Alt Grupları: OXA tipi β -laktamazlar temel olarak 4 ana gruba ayrılır. Bunlar; OXA-23, OXA-24, OXA-51 ve OXA-58'dir (Gördebil, 2011). Günümüzde ise *A. baumannii*'de tanımlanan OXA tipi karbapenemazlar enzimleri filogenetik olarak 5 ana grupta toplanmıştır; OXA-23 benzeri, OXA-40/24 benzeri, OXA 58 benzeri ve OXA-143 benzeri enzimler. 2013 yılında yapılan bir çalışmada ise bu 5 gruba ait olmayan ve yeni bir grup oluşturduğu düşünülen OXA-235 enzimi tanımlanmıştır (Sarı, 2014).

OXA-23 ve OXA-24 gruplarının arasında < % 60 amino asit benzerliği bulunmakta, OXA-51 grubunun ise OXA-23 ve OXA-24 gruplarıyla amino asit benzerliği < % 63, OXA-58'in diğer oksasilinazlar ile amino asit benzerliği < % 50' dir (Torol, 2008).

OXA-23 benzeri enzimler: İlk olarak 1985 senesinde İskoçya'nın başkenti olan Edinburgh'da imipeneme dirençli bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır ve ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) olarak adlandırılmıştır (Gördebil, 2011; Sarı, 2014). Daha sonra Singapur ve Çin'de *A. baumannii* izolatlarında tanımlanan ve OXA-27 ve OXA-49 diye isimlendirilen ve OXA-23 enzimi ile %99 aminoasit benzerliğine sahip iki farklı enzim tanımlanmıştır. Sonrasında ise *A. radioresistens*'ten izole edilen OXA-23 benzeri enzim grubunda yer alan OXA-102, -103, -105, -133 ve -134 tanımlanmıştır (Sarı, 2014).

OXA-23 benzeri enzim grubuna ait enzimler oksasiline ve aminopenisiline hidrolize ederken, oksimino-sefalosporinleri ve karbapenemleri zayıf olarak hidrolize ederler. OXA-27 ve OXA-23 enzimlerinden OXA-23'ün karbapenemlere karşı düşük sefaloridin ve oksasiline karşı ise daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. İn vivo olarak OXA-23 β -laktamazı amoksasiline, tikarsiline, meropenem ve imipeneme karşı direnç yol açmaktadır. *bla*OXA-23 geni duyarlı ve bu geni içermeyen alıcı suşa transfer edildiğinde enzimin karbapenemlere karşı orta derecede veya düşük direnç sebep olduğu, RND-tipi AdeABC efflux pompasının arttırılmış ekspresyonu ile birleştiğinde ise bu direncin yüksek seviyelere ulaştığı gösterilmiştir (Sarı, 2014).

OXA-23-benzeri enzimler birçok *Acinetobacter* türü dışında *Proteus mirabilis* izolatlarında da tanımlanmıştır. Bu enzimleri kodlayan genler çeşitli plazmitler üzerinde de bulunabildikleri gibi kromozomal da olabilirler (Sarı, 2014).

*bla*OXA-23-benzeri genlerin G+C içeriği %37,6 - %37,9 arasında değişmektedir. OXA-23 enzimine sahip izolatlar bütün dünyadan sıklıkla özellikle hastane infeksiyonlarıyla ilişkili salgınlarda bildirilmektedir. Ülkemizden ilk kez 2008 yılında bildirilmiştir (Sarı, 2014).

OXA-40/24 benzeri enzimler: İlk olarak OXA-24 olarak isimlendirilmiş olan OXA-40 enzimi 1997 senesinde İspanya'dan *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır. Daha sonra Belçika ve İspanya'dan bildirilen OXA-25 ve -26 enzimleri OXA-40/24 enzimi ile % 99'un üzerinde aminoasit benzerliğine sahip olduğu bildirilmiş ve bu

enzim ailesi içine dahil edilmiştir. 2004 yılında Tayland’ da izole edilen % 99 aminoasit benzerliği olan OXA-72 enzimi *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır (Sarı, 2014).

OXA-40/24, OXA-25 ve OXA-26 enzimleri ile yapılan kinetik çalışmalarda penisilinleri hidrolizleyebildikleri, karbapenemlere düşük aktivite gösterdikleri ve de bazı sefalosporinlere karşı ise çok düşük aktivite gösterdikler bildirilmiştir. Üç enzim de imipenem ve meropenemi iyi hidrolize ederken en iyi hidroliz yeteneğine sahip olan OXA-40/24 enzimidir. Heritier ve ark. yaptığı çalışmada *in vivo* olarak OXA-40/24 enziminin karbapenem direncine yol açmakla birlikte penisilin ve sefalosporinlere karşı da yükselen MİK değerlerine sebep olduğu göstermiştir. Bunun yanında, duyarlı referans *A. baumannii* suşuna transfer edildiğinde enzim sadece orta düzeyden düşük düzeye dirence sebep olmuştur ki yüksek düzey direnç AdeABC efflux pompasının ekspresyonundaki artışla sağlanmaktadır (Sarı, 2014).

*bla*OXA-40/24-benzeri genler *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında da tanımlanmış, plazmit ve kromozom üzerinde bulunabilirler (Sarı, 2014).

*bla*OXA-40/24-benzeri genleri G+C içeriği % 33,9-34,3 arasında değişmektedir. Bu enzimleri kodlayan izolatlar Asya, Belçika, Amerika, İspanya ve Portekiz ile birlikte ilk kez Türkiye’ de de 2013 yılında bildirilmiştir (Sarı, 2014).

OXA-51 benzeri enzimler: *A. baumannii* türleri tarafından üretilen ve doğal β -laktamaz olan gruptur (Çiftçi ve Aşık, 2011). Bu ailenin tanımlanarak ilk enzimi olan OXA-51 enzimi 1996 senesinde Arjantin’ de izole edilen *A. baumannii* izolatında tanımlanmış ve sonrasında birçok sayıda ilişkili enzim bildirilmiştir. Günümüzde OXA-51 benzeri enzimler β -laktamazlar arasında 68 üyesiyle en geniş enzim ailelerinden biridir ve 1-15 aminoasit farklılığıyla çeşitlenmiş enzimlerdir (Sarı, 2014).

Bu enzimlerin tümü zayıf karbapenemaz aktivite gösterir ve ampisilinden daha zayıf substrat olan sefaloridin hariç sefalosporinlerin hiçbirisi bu enzimlerle hidrolize olmaz. Bu genler ve ilişkili enzimlerin ekspresyon seviyesinin düşük olduğu incelenmiştir. Bu grupta yer alan OXA-69 enzimi karbapenemler dahil tüm β -laktamlara dirençte etkin rol oynamaktadır. OXA-51 benzeri enzim analizleri, tüm izolatlarda

blaOXA-51 benzeri gen bulunmasına rağmen sadece *ISAbal1* ile komşu olan *blaOXA-51* benzeri genleri taşıyan suşların karbapenem dirençli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *ISAbal1 blaOXA-51* için düzenleyici gibi görünmektedir (Çiftçi ve Aşık, 2011).

bla_{OXA-51} benzeri genler genellikle kromozom üzerinde tanımlanmıştır ve transfer edilmemektedirler. Bununla birlikte yapılmış olan bir çalışmada kalıp olarak plazmit DNA' nın kullanıldığı PZR sonucunda *bla_{OXA-51}* benzeri gen bölgesi pozitif bulunmuştur. Ayrıca ülkemizden yapılan bir çalışmada da bir *bla_{OXA-51}* benzeri geni *Escherichia coli* izolatına aktarılmıştır (Sarı, 2014).

OXA-51 benzeri enzimleri kodlayan genler arasında *bla_{OXA-138}* geni dışında tümü *A. baumannii* izolatlarında tanımlanmıştır. *bla_{OXA-138}* geni ise bir *Acinetobacter* genomik tür 13TU' da tanımlanmış olup bu veri *bla_{OXA-51}* benzeri genlerin de hareketli ve taşınabilir olabileceğini düşündürmektedir (Sarı, 2014).

Bu grup, bilinen diğer oksasilinazlardan farklı olarak % 63' e varan aminoasit homolojisi gösteren enzim kümesi oluşturur (Çiftçi ve Aşık, 2011). *bla_{OXA-51}*-benzeri genlerin G+C içeriği *A. baumannii* genomu ile benzerdir (Sarı, 2014).

En yaygın tanımlanan enzimler OXA-66 kümesindedir ve özellikle Güney Amerika ve Asya' dan bildirilmiştir. OXA-69 kümesinden olan enzimler de yaygındır ve daha çok Doğu Avrupa' dan bildirilmektedir (Sarı, 2014).

OXA-58 benzeri enzimler: İlk olarak Fransa' da izole edilen bir *A. baumannii* izolatında OXA-58 enzimi tanımlanmıştır. 30 kb' lık bir plazmit üzerinde bulunmuştur. Bu enzim ailesi içerisinde yer alan diğer iki enzimden OXA-96 enzimi (OXA-58 enziminden 161. pozisyondaki bir metiyonin-izolösin aminoasit yer değişimi ile farklılaşmıştır) ilk olarak Singapur' dan ve OXA-97 enzimi (OXA-58 enziminden 53. pozisyonda bir glisin-alanin aminoasit yer değişimi ile farklılaşmıştır) Tunus' tan bildirmiştir (Sarı, 2014).

A. junii'de bulunan OXA-58 ve IMP-4 β -laktamazları birlikte karbapenemaz aktivitesi göstermektedir (Gördebil, 2011).

OXA-58 enziminin kinetik analiz çalışmaları *A. baumannii*'nin diğer OXA tipi enzimleri ile benzer özellikte olduğunu göstermiştir. Saflaştırılmış enzim penisilinlere ve imipeneme karşı zayıf aktivite, meropeneme karşı çok zayıf aktiviteye ve sefalotin ve sefpiroma karşı bazen aktivite gösterirken, seftazidim ve sefotaksime karşı aktif değildir. Ayrıca OXA-58 enzimi imipenemi OXA-40/24 enzimine göre iki kat daha iyi hidroliz etmektedir. *bla*_{OXA-58} geni taşıyan bir plazmit iki duyarlı *A. baumannii* referans suşuna transfer edildiğinde amoksasilin ve tikarsiline karşı MİK değerleri önemli ölçüde artarken karbapenemlere karşı az miktarda artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte klinik bir izolattan elde edilen *bla*_{OXA-58} geni taşıyan bir plazmit aynı referans suşlarına transfer edildiğinde karbapenem için olan MİK değeri AdeABC efflux pompasını yüksek düzeyde eksprese eden suşta önemli ölçüde artmıştır (Sarı, 2014).

OXA-58 enzimi, diğer *Acinetobacter* türlerinde de görülmektedir. Bu türlerde de genellikle plazmit kökenlidir fakat kromozomal lokasyon da bildirilmiştir. *bla*_{OXA-58} geninin G+C içeriği % 37,4- 37,5 arasındadır (Sarı, 2014).

OXA-58 ilk olarak Fransa'da salgın sırasında tanımlandığı bildirilmiştir (Gördebil, 2011). *bla*_{OXA-58} geni taşıyan izolatlar, sıklıkla Avrupa'dan bildirilmiştir. Ayrıca Güney Amerika, Kuzey Amerika, Asya ve Avustralya'dan da bildirilmiştir. Ülkemizden ise ilk olarak 2006 yılında bildirilmiştir (Sarı, 2014).

OXA-143 enzim ailesi: OXA-143 enzimi, 2004 yılında Brezilya'da izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii*'de belirlenmiş, 2009 yılında da Higgins ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. 30 kb'lık bir plazmit üzerinde tanımlanan enzim OXA-40 enzimi ile %88, OXA-23 enzimi ile %63 ve OXA-58 enzimi ile %58 aminoasit sekans benzerliğinde bulunmuş böylece yeni bir alt grup olarak tanımlanmıştır (Sarı, 2014).

OXA-235 enzim ailesi: 2013 senesinde Amerika ve Meksika'dan izole edilen *A. baumannii* izolatlarında tanımlanan OXA-235 enzimi OXA-23, -24, -58 ve -143 enzimleri ile %54-%57 arasında, OXA-51 enzimi ile ise %56 oranında aminoasit benzerliğine sahiptir. Bu nedenle yeni bir alt grup olarak tanımlanmıştır ve aynı

çalışmada iki izolatta ise tek aminoasit değişimi ile bu enzim ailesine ait olan OXA-236 ve OXA-237 enzimleri tanımlanmıştır. Bu üç enzim de plazmit üzerinde ve olarak gen bölgesinin her iki yönünde de IS*Aba1* elemanı ile bitişik olarak saptanmıştır (Sarı, 2014).

Günümüzde bakıldığında 498 tane OXA tipi β -laktamaz aleli bulunmaktadır (URL-3).

OXA Tip Karbapenemazları Kodlayan Genlerin Genetik Çevresi: D sınıfı oksasilinazlar, klinik örneklerde yaygın olarak plazmit üzerinde integron gen kasetleri şeklinde bulunmaktadırlar. *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-27} genlerinin taşınımı insersiyon dizileri (IS) ile ilişkilidir. IS*Aba1* *bla*_{OXA-58}'i de içine alan kompozit bir transpozondur. Sekans çalışmaları *A. baumannii* 6B92'de *bla*_{OXA-23} geninin ön tarafındaki dizinin % 99,3 oranında IS*Aba1* dizisi ile benzerliğini göstermiştir. IS*Aba1* antibiyotik direnç genlerinin ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Torol, 2008).

Metallo β -laktamazlar ile karşılaştırıldıklarında OXA tipi karbapenemazların karbapenemleri hidroliz etmede daha düşük aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (100-1000 kat daha düşük). *Acinetobacter baumannii*' de karbapenem direncinin en yaygın sebebi olarak OXA tipi karbapenemazlar bilinmektedir. Bu enzimlerin önemli karbapenemazlar olmalarını sağlayan neden olarak IS*Aba1* gibi IS (insersiyon sekansları) elemanlarını gen bölgesinin üst kısmında taşınmaları durumunda yeniden düzenlenmesi olarak bilinmektedir. *A. baumannii*'de tanımlanan insersiyon sekansları artan ekspresyon ile ilişkili hibrit promotör sekanslar olarak işlev görmekte ve bu enzim grubunun karbapenemlere karşı ciddi bir şekilde direnç oluşumunu sağlayan ya da azalan duyarlılığa sebep olduğu düşünülmektedir (Sarı, 2014).

IS*Aba1*, IS terminolojisine göre 1180 baz uzunluğunda olup IS4 ailesine ait terminal 16 baz serisinin ters tekrarlarını taşır. IS*Aba1* *Acinetobacter* türlerinde birkaç kopya olarak bulunduğu halde, *Enterobacter* veya *Pseudomonas aeruginosa* gibi diğer organizmalarda şu ana kadar gösterilememiştir. Çalışmalarda IS4 ailesine ait IS*Aba1*'in her zaman *bla*_{OXA-23} genine yakın bir bölgede yer aldığı gösterilmiştir. Bu durum

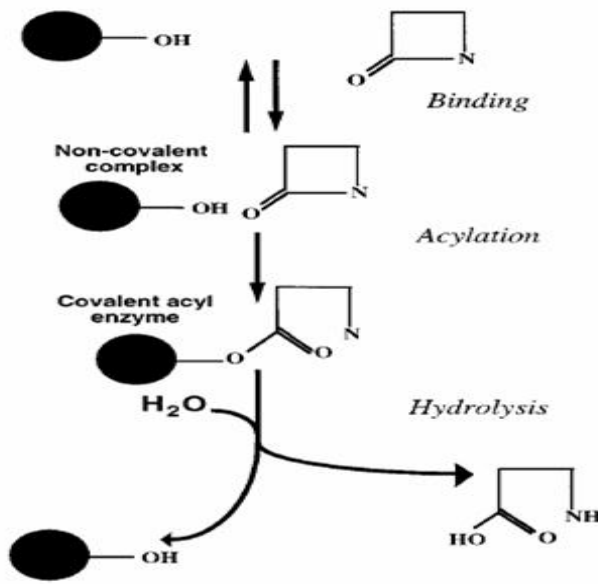
ISAbal'in düzenleyici rol oynadığını ve *bla*_{OXA-23}'ün ekspresyonunda ve muhtemelen kazanılmasında kilit rol aldığını düşündürmüştür. Benzer şekilde IS982 ailesine ait ISAbal'ün de ISAbal gibi *bla*_{OXA-23}'e yakın bir bölgede yer aldığı bildirilmiş, rolü hakkında bilgi verilmezken önemi vurgulanmıştır (Çiftçi ve Aşık, 2011).

Farklı çalışmalarda ISAbal'in OXA-51 dışındaki genlerin de yukarı bölgesine yerleşip karbapenemaz üretimini indüklediği gösterilmiştir. ABD'de Higgins ve arkadaşlarının yaptıkları, beş kıtadan izole edilen 492 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının karbapenemaz genleri ve moleküler epidemiyolojisinin araştırıldığı bir çalışmada bütün izolatların OXA-51 kodlayan gen taşıdığı, 304 izolatın ayrıca OXA-23, OXA-58 ve OXA-40 genlerinden birini taşıdığı; ISAbal'in 193 izolatta OXA-51 geninin upstreaminde yer aldığı fakat 5 izolatta OXA-40, 3' ünde OXA-23, 2' sinde OXA-58 kodlayan gen içeren izolatlarda ve direnç geni gösterilemeyen 183 izolat ve karbapenem duyarlı 7 izolatta da bulunduğu tespit edilmiştir (Gördebil, 2011).

OXA Tip Karbapenemazların Orijini: Doğal seleksiyon nedeni ile organizmalar orijinallerinde karbapenemaz aktivitesine sahip enzim içermektedirler veya bu genleri diğer bakterilerden plazmitler aracılığıyla almaktadırlar. İlk olarak 1985 senesinde 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. D grubu OXA allelerinin dağılımı Gram negatif bakterilerde limitlidir ancak 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 sene önce Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ayrıştığı düşünüldüğünde D grubu genleri içeren plazmitin yaklaşık 116±25 milyon sene önce, bir sonrakinin 42±9 milyon sene önce son zaman diliminin ise çok daha yakın bir geçmişte olduğunu göstermektedir (Torol, 2008).

OXA Tip Karbapenemazların Biyokimyası: OXA tip karbapenemazlar 243 ile 260 amino asitten oluşabilmektedirler. Moleküler ağırlığı 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. OXA'ların asetilasyon ve deasetilasyon kapsayan basit üç aşamalı model ile çalışmaktadır. Enzim öncelikle antibiyotik ile non-kovalent bir kompleks oluşturmaktadır. Enzim aktif bölgesinde bulunan serinin yan zincirinin serbest hidroksil grubu β -laktam halkasındaki karbonil karbona nükleofilik atak yapmaktadır ve kovalent açil ester ara form oluşmaktadır. Ester bağının hidrolizi ile aktif enzim ve hidrolize olmuş inaktif antibiyotik oluşmaktadır. Bu mekanizma A ve C grubu β -laktamazlarda da görülmektedir (Torol, 2008) (Şekil 4).



Şekil 4. OXA'ların asetilasyon ve deasetilasyon şeması.

Serin aktif β -laktamazların bu üç aşamalı asetilasyon-deasetilasyon mekanizması aynıdır fakat B grubu β -laktamazlar çinko iyonuna ihtiyaç duyduklarından A, C ve D grubu β -laktamazlardan farklıdır. Asetilasyon hızı yani açil 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. Sonuçta β -laktamazların β -laktam antibiyotiklerini hidrolizi k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin analizi sonucunda belirlenir (Torol, 2008).

Bir enzimin substrata karşı olan ilgisi K_m , enzim tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına turnover sayısı denir ve kısaca k_{cat} sembolü ile gösterilir, enzimin katalitik etkinliği k_{cat}/K_m olarak ölçülebilir. Bu kinetik parametreler;

hidroliz için substratlar, aktif bölge yapısı, Zn^{+2} iyonları ve rezidüslerin aktif bölgeye yakınlığı tarafından etkilenmektedir (Düzgün, 2015).

β -laktam hidrolizinde oldukça düşük *kcat* değerine sahip enzimin *in vivo* hidroliz miktarı yüksek olabilir. Bunun ana nedeni organizmanın oldukça yüksek periplazmik konsantrasyonda (1 mM'a kadar) β -laktamaz üretebilmesidir. β -laktam degradasyonunun maksimum hızı (V_{max}) *kcat* ve enzim konsantrasyonuna bağlıdır. ($V_{max} = kcat \cdot [E]_0$). Düşük *kcat* değeri yüksek enzim konsantrasyonuyla dengelenebilmektedir (Torol, 2008).

Klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam β -laktamazların en iyi bilinen inhibitörleridir. β -laktamazlar bu inhibitörler ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olurlar. Genellikle D sınıfı β -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 (Torol, 2008).

Grup 2e β -laktamazlar: Bu grupta yer alan β -laktamazlar klavulanik asitle inhibe edilen sefalosporinazları içerir (Bedir, 2006). *Stenotrophomonas maltophilia*'nın kromozomal L-2 enzimi, *Bacteroides fragilis*'in CepA enzimi, *B. uniformis* ve *B. vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA enzimi *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S. maltophilia*'nın L2 *Y. enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimleri ve *Proteus vulgaris*'in kromozomal enzimleri bu grupta yer alır (Kurşun, 2008; Gördebil, 2011).

Grup 2f β -laktamazlar: Bu grup enzimler karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (Gördebil, 2011). *E. cloacae*'nin IMI-1 ve NMC-A enzimleri ve *S.marcescens*'in Sme-1 enzimi bu gruptadır (Kurşun, 2008; Gördebil, 2011).

Günümüzde 11 tane IMI, 24 tane KPC ve 27 tane GES 5 tane SME tipi β -laktamaz aleli olduğu bilinmektedir (URL-3).

Grup 3 β-laktamazlar: Enzimatik aktiviteleri için metal iyonlara gereksinim duyan, klavulanik asit ile inhibe olmayan, EDTA ile inhibe olan, aktivite gösterebilmeleri için çift valentli metal iyonuna (Zn^{+2}) ihtiyaç duyan ve moleküler sınıf B' de yer alan enzim grubudur (Bedir, 2006; Kurşun, 2008). Bu grupta yer alan enzimler diğer β-laktam antibiyotiklere göre karbapenemler üzerine zayıf etki gösterirler. Güçlü sefalosporinaz aktivite gösterirler. Bu enzim grubu geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler de dahil sefalosporinleri çok yüksek oranda hidroliz etmesiyle diğer alt gruplardan ayrılmaktadır (Gördebil, 2011).

Metallo-β-laktamazlar, metallo-hidrolaz süper familyasına aittirler. İlk MBL enzimi, 1966 da *Bacillus cereus* (BcII) de tanımlanmıştır. İlk başlarda MBL'ler çevresel ve fırsatçı Gram-negatif bakterilerde bulunmuş fakat, yaklaşık 20 yıl kadar sonra MBL'ler klinik olarak önemli birçok patojen bakterilerde görülmüştür. MBL genleri bazı çevresel inhabitant bakterilerde sıklıkla bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar MBL genlerinin ya horizontal gen transferi tarafından kazanılmış (kazanılmış MBL'ler) olarak ya da kromozomlar üzerinde doğal olarak bulunduğunu göstermiştir. MBL'ler son 50 yılda β-laktamlara karşı direncin en önemli faktörü olmuştur. Dahası, MBL'ler monobaktam olan aztreonam hariç tüm β-laktam sınıf antibiyotikleri hidroliz edebilirler ve geniş-spektrum aktivite gösterirler (Düzgün, 2015).

Günümüzde 53 tane IMP, 15 tane IND, 46 tane VIM ve 16 tane NDM tipi β-laktamaz aleli olduğu bilinmektedir (URL-3).

Grup 4 β-laktamazlar: Klavulanik asitle inhibe olmayan çeşitli penisilinazları içerir. Molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir (Bedir, 2006). *A. faecalis*, *B. fragilis*, *C. jejuni*'den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E.coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 β-laktamazı ve *Pseudomonas cepacia*'daki β-laktamazlar da bu grupta yer alır (Gördebil, 2011).

1.6.3.3. Genişlemiş Spektrumlu β-Laktamazlar (GSBL)

1980'li yıllarda genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin geliştirilmesinden kısa bir süre sonra β-laktamazlara dayanıklı, nozokomiyal infeksiyonlardan izole edilen

Klebsiella pneumoniae suşlarında plazmid kontrolünde olan çeşitli β -laktamazlar tanımlanmış ve bunlara GSBL adı verilmiştir (Hamaçça, 2009). Daha etkili ve daha geniş spektrumlu ajanlar geliştirildikçe, özellikle Gram-negatif bakterilerden çok çeşitli β -laktamazlar bildirilmeye başlandı. GSBL'ler ilk tanımlandıklarında, TEM ve SHV gibi plazmid kaynaklı β -laktamazların bir varyantı olarak bildirilmelerine rağmen, Türkiye'de PER-1 varyantı, batı Avrupa'da ise CTX-M varyantı olan pek çok GSBL bulunmaktadır (Bedir, 2006).

GSBL'ler Genel Özellikleri: GSBL'ler Bush-Jacoby-Medeiros grup 2be ve 2d sınıfında yer almaktadırlar (Hamaçça, 2009). Oksiimino sefalosporinleri ve monobaktamları hidroliz ederek etkisiz hale getirirler. Genel olarak sefamisinlere ve karbapenemlere duyarlıdırlar. Buna karşın klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleriyle olan kombinasyonlar her zaman etkili değildir. Enzim fazla miktarda sentezleniyorsa, birden çok enzim varsa ya da permeabilitede porin kaybına bağlı bir azalma söz konusu ise bazı GSBL içeren bakteriler bu kombinasyonlara dirençli olabilirler. Ayrıca infekte eden bakteri miktarı, ilacın dozu ve var olan GSBL'nin tipine göre de β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonunun etkisi farklılık gösterebilir (Yapar, 2007).

GSBL'lerin Neden Olduğu Sorunlar: GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu problemlerin başında direnç sorunu gelmektedir. Bu enzimlerden birini sentezlediği saptanan Gram-negatif bakteri; penisilinlere, tüm sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli kabul edilmelidir. Diğer yandan bu enzimleri kodlayan plazmidler aynı zamanda birçok β -laktam dışı antibiyotiğe karşı da kalıtım materyali taşımaktadırlar. Bu nedenle GSBL sentezleyen bakteriler aynı zamanda başta aminoglikozidler olmak üzere kinolonlar, tetrasiklin, kloramfenikol ve sülfonamidlere karşı da direnç gösterebilirler (Yapar, 2007).

Antimikrobiyal ilaçlara karşı geniş bir direnç spektrumuna neden olan GSBL üretimi, hem tedavide kullanılacak antibiyotiklerin sayısını sınırlamakta hem de bu ilaçların etkilerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenlerle GSBL üreten bakterilerle meydana gelen infeksiyonların tedavisinde seçeneklerin kısıtlanmasına neden olmaktadır (Kurşun, 2008).

GSBL'lerin Sınıflandırılması: Genel olarak aktif bölgesinde serin molekülü içerir ve Ambler moleküler sınıflamasına göre sınıf A'da (Bush sınıflamasına göre Grup 2be), oksasilini hidrolize eden β -laktamazlar ise moleküler sınıf D'de (Bush sınıflamasına göre Grup 2d) yer alırlar. Evrimsel ve yapısal özellikler açısından GSBL'ler 9 farklı grup içinde sınıflandırılmaktadır (Yapar, 2007). Bu gruplar TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, BEL, SFO, ve OXA'dır (Yapar, 2007; Hamaçça, 2009).

TEM: TEM tipi GSBL'ler TEM-1 ve TEM-2'den türemiştir. TEM-1 ilk olarak 1965'te Atina'da Temoneria isimli bir hastadan üretilen *E. coli* türünde bildirilmiştir. TEM-1 ampisilini karbenisilin, oksasilin veya sefalotinden daha iyi hidrolize eder. Klavulanik asitle inhibe edilir (Hamaçça, 2009). Beta-laktamaz inhibitörleriyle çoğunun etkisinin azaldığı araştırılmıştır. GSBL'in izoelektrik nokta aralıkları 5,2-6,5 arasındadır (Yapar, 2007).

GSBL fenotipi gösteren ilk TEM türevi TEM-3'tür. TEM-3 1987 senesinde bildirilmiştir. O günden başlayarak TEM grubu β -aktamazların çeşidinde ve sayısında büyük bir artış olmaktadır. GSBL fenotipi oluşturma yönünden bazı aminoasit değişiklikleri daha önemlidir. Örneğin; 104. pozisyonda glutamat yerine lizin, 164. pozisyonda arjinin yerine serin veya histidin, 238. pozisyonda glisin yerine serin ve 240. pozisyonda glutamat yerine lizin girmesi gibi. Aminoasitlerdeki değişiklikler sonucunda GSBL'lerin fenotiplerinde önemli değişiklikler olmakta, örneğin belirli oksiminio sefalosporinleri hidrolize etme özellikleri veya izoelektrik noktaları değişebilmektedir (Hamaçça, 2009).

Pseudomonas aeruginosa' da TEM-4, TEM-21, TEM-24 ve TEM-42 GSBL bulunmaktadır (Albayrak, 2008).

TEM grubu β -laktamazlar *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* ve *Salmonella* spp. gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sıkça bulunmaktadır. *Enterobacter aerogenes*'teki TEM-24 gibi yeni TEM tipi GSBL varyantları Fransa, İtalya, İspanya,

Belçika ve Portekiz’de gösterilmiştir. İdrar yolu infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* ve *Salmonella*’da bulunan TEM-52, Avrupa’da oldukça yaygındır (Hamaçça, 2009).

Günümüzde 223 tane TEM grubu genişlemiş spektrumlu β -laktamaz aleli bulunmaktadır (URL-6).

SHV: SHV grubu enzimlerin köken aldığı SHV-1 enzimi en sık *K. pneumoniae*’da bulunmaktadır ve çoğunlukla kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır. Oksimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (Hamaçça, 2009). Sadece SHV-10 inhibitör dirençli özelliktedir (Yapar, 2007).

Aminoasit değişikliği olan pozisyonlar TEM grubu GSBL’lere kıyasla daha azdır (Yapar, 2007). SHV türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türü 1983 yılında bulunmuş olan SHV-2 enzimidir. GSBL fenotipi gösteren SHV türlerinin çoğunda karakteristik değişiklik, 238. pozisyonda glisin aminoasiti yerine serin amino asiti girmesidir. Bunun dışında 179., 205. ve 240. pozisyonlardaki aminoasit değişimleri GSBL fenotipi için önemlidir (Hamaçça, 2009). SHV-5 ilişkili pek çok tür 240. pozisyonda glutamat amino asiti yerine lizinin amino asiti gelmesiyle oluşur. Her iki pozisyondaki aminoasit yer değişikliğinin TEM tipi β -laktamazlarda da görülmesi ilginçtir (Yapar, 2007).

SHV grubu enzimler *K. pneumoniae*’dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*’de de bildirilmiştir. SHV-12 en yaygın olan SHV enzimlerinden biridir ve bütün dünyada *K. pneumoniae*’de bildirilmiştir ayrıca yakın zamanda toplum kaynaklı *E. coli* infeksiyonlarında bildirilmektedir. SHV-12, TEM, GES, ve CTX-M gibi diğer GSBL’leri sentezleyen izolatlarda bu enzimlerle birlikte bulunabilmektedir (Hamaçça, 2009).

Bazı ülkelerde SHV türlerinin bazılarının daha yaygın olduğu bildirilmektedir. Örneğin Yunanistan’da SHV-5 enzimi daha yaygındır. Ülkemizde *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında SHV-5 ve SHV-12 bildirilmiştir (Kuşun, 2008).

Günümüzde 223 tane SHV grubu genişlemiş spektrumlu β -laktamaz aleli bulunmaktadır (URL-7).

CTX-M: Bu gruptaki enzimler substrat olarak sefotaksimi tercih etmektedir. CTX-M tipi β -laktamaz ilk olarak Almanya'da 1989 senesinde *E.coli* suşunda saptanmıştır. Daha sonra, *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde üretimi gösterilmiştir. Günümüzde yaklaşık 80'den fazla CTX-M enzimi bildirilmiştir (Dağlar ve Öngüt, 2012).

CTX-M enziminin kaynağı TEM ve SHV enzimlerinden farklıdır. SHV ve TEM tip GSBL'ler öncül enzimlerden aminoasit değişiklikleriyle oluşurken, CTX-M tip GSBL'ler konjugatif plazmid veya transpozon aracılığıyla başka bakteriden horizontal gen transferiyle oluşurlar (Dağlar ve Öngüt, 2012).

CTX-M enzimleri en yaygın plazmid aracılı TEM ve SHV beta-laktamazları ile %40 veya daha az homoloji gösterir. Bilinen aminoasit dizileriyle %70-75 arasında olan en iyi benzerlik oranı *K.oxytoca*, *Proteus vulgaris* ve *C.diversus*'un sefalosporinleri hidrolize eden kromozomal enzimleri ile gözlenir. CTX-M tipi β -laktamazların genişlemiş spektrumlu aktivitesinde anahtar role CTX-M enzimlerinde değişmeden var olan 237. pozisyondaki serin rezidüleri katkıda bulunmuştur. Tazobaktam bu enzimlere karşı klavulanata göre yaklaşık 10 kat daha fazla inhibitör etkiye sahiptir (Yapar, 2007).

CTX-M enzimlerini üreten mikroorganizmaların çoğunlukla hastane infeksiyonlarından izole edilmelerine karşın TEM ve SHV enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella spp.* ve *Shigella spp.* gibi toplum kaynaklı infeksiyon etkenlerinde de bildirilmektedir. Seftriakson ve sefotaksim antibiyotiklerinin toplumda yaygın kullanımının CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülmektedir. CTX-M grubu enzimlerin sayısı hızla artmaktadır (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Genellikle *Enterobacteriaceae* izolatlarında saptanan bu enzimler, dünyanın birçok yerinden rapor edilmiştir (Dağlar ve Öngüt, 2012). En sık salgınlar Doğu Avrupa'da gözlenmiş, ayrıca Güney Amerika, Japonya'da da bu enzimin sebep olduğu salgınlar bildirilmiştir. Günümüzde dünya üzerinde CTX-M beta-laktamazların geniş yayılım gösterdiği 3 ana bölge vardır; Güney Amerika, Uzak Doğu, Doğu Avrupa.

Yakın zamanda da Çin ve Hindistan'da CTX-M kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (Hamaçça, 2009).

PER: PER enzimleri ile TEM ve SHV tipi GSBL'ler DNA baz dizileri bakımından %25-27 oranında homoloji gösterirler. Kromozomal bir enzimdir (Yapar, 2007). İlk olarak, *P. aeruginosa* suşunda Fransa'da bir Türk hastadan izole edilmiştir. PER-1 enzimi penisilin ve sefasporinleri hidrolize eder. Klavulanik asit ile inhibe olur (Dağlar ve Öngüt, 2012).

P. aeruginosa dışında *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *A. faecalis* ve *P. mirabilis* suşlarında da bildirilmiştir. Türkiye'de nozokomiyal kaynaklı *Acinetobacter spp.* kökenlerinin %46'sında, *P. aeruginosa* kökenlerinin %11'inde PER-1 enzimi bulunmuştur (Dağlar ve Öngüt, 2012; Hamaçça, 2009).

PER-1 ile %86 homoloji gösteren PER-2 enzimi sadece Güney Afrika'dan bildirilmiştir (Dağlar ve Öngüt, 2012). *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* ve *Vibrio cholerae* da bildirilmiştir (Hamaçça, 2009).

VEB: VEB-1 ilk olarak Vietnam'da bir *E. coli* suşunda saptanmış, hemen arkasından Tayland'da bir *P. aeruginosa* kökeninde bulunmuştur (Hamaçça, 2009). VEB-1 enzimi, PER-1 ve PER-2 enzimleriyle %38 oranında homoloji gösterir. Aztreonam, sefotaksim ve seftazidim antibiyotiklerine yüksek düzeyde direnç gösterirler ve klavulanik asit ile inhibe olurlar (Dağlar ve Öngüt, 2012). Fransa, Kuveyt ve Çin'de de bu enzime rastlanmıştır (Hamaçça, 2009).

GES: GES-1 ilk olarak Fransa'da *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır (Dağlar ve Öngüt, 2012). Plazmid aracılı β -laktamazlarla yakın ilişkili değildir fakat *P. mirabilis*'teki karbenisilinaz enzimiyle %36 oranında yapısal homoloji gösterir (Hamaçça, 2009).

TLA: TLA-1; Meksika'da bir hastadan izole edilen bir *E. coli* kökeninde bulunmuştur (Hamaçça, 2009). Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Dağlar ve Öngüt, 2012).

BES: BES-1; Ambler moleküler sınıf A grubunda, fonksiyonel grup 2be β -laktamazlar içinde yer alır. Brezilya'da *S. marcescens* kökeninde izole edilmiştir. Tazobaktamla zayıf hidroliz olur (Hamaçça, 2009). Geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme özelliğine sahiptir (Dağlar ve Öngüt, 2012).

BEL: BEL-1; 2004 yılında Belçika'da bir *P. aeruginosa* kökeninde izole edilmiştir. BES-1 gibi tazobaktamla zayıf inhibe olur (Hamaçça, 2009).

SFO: SFO-1; Seyrek rastlanan bir GSBL türüdür ve bir *Serratia fonticola* kökeninde saptanmıştır. Ambler moleküler A sınıfı β -laktamazlara dahil edilmiştir. Sentezi karbapenem grubundan olan imipenem tarafından indüklenir. SFO β -laktamazı kodlayan geni taşıyan plazmid aynı zamanda AmpR düzenleyici genini de taşır. SFO-1 beta-laktamazlar sefamisinleri hidrolize edemez ve klavulanik asitle kolayca inhibe olabilirler (Hamaçça, 2009).

OXA: Oksasilini hidrolize etme yeteneklerinden dolayı OXA β -laktamazlar ismini alan bu grup, oksasilin ve kloksasilini benzilpenisilinden %50 daha fazla hidrolize ederler (Hamaçça, 2009). Bu grup enzimler fonksiyonel grup 2d ve moleküler sınıf D'de yer almalarıyla TEM ve SHV enzimlerinden ayrılırlar (Dağlar ve Öngüt, 2012). Çoğu OXA tipi β -laktamaz genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri önemli ölçüde hidrolize etmez (Hamaçça, 2009).

En sık *P. aeruginosa*'da bulunmakla birlikte *Enterobacteriaceae*' yi de içeren diğer Gram-negatif bakterilerde de saptanmaktadır (Hamaçça, 2009).

Birçok OXA tipi GSBL, OXA-10'dan (OXA-11, OXA-14, OXA-16 ve OXA-17) ya da OXA-10'dan dokuz aminoasit farklılığıyla ayrılan OXA-13'ten (OXA-19 ve OXA-28) türemişlerdir. OXA-15 ve OXA-32 tipi GSBL'ler ise OXA-2 β -laktamazdan türemişlerdir (Hamaçça, 2009).

OXA-18 ve OXA-45 tipi GSBL'ler ise herhangi bir geniş spektrumlu OXA enzimiyle ilişkilendirilememiştir (Hamaçça, 2009).

OXA-18 %42 homoloji ile en yakın benzerliği OXA-9 ile göstermektedir. OXA-14 OXA-10'dan tek aminoasit kalıntısıyla, OXA-11 ve OXA-16 iki aminoasit kalıntısıyla ayrılmıştır. OXA-19 ve OXA-28 OXA-10'dan on aminoasit OXA 13'ten iki aminoasit değişikliğiyle ayrılmıştır. OXA-15 ve OXA-32 OXA- 2'den tek aminoasit değişikliğiyle ayrılır. OXA-10'dan sekiz aminoasit değişikliğiyle ayrılan OXA 35'in OXA-13 varyantlarının progenitörü olduğu dűřünlmektedir (Hamańa, 2009).

OXA-11, 14, 15 ve 16 seftazidim direncine yol ańarken, OXA-17 sefotaksim ve seftriaksona direnç gösterir (Dađlar ve ngűt, 2012; Hamańa, 2009). OXA-31 enzimi ise sefepime direnç oluřturmakta, seftazidime ise duyarlıdır. Birçok OXA tipi GSBL β -laktamaz inhibitörlerine direnç gösterirken, OXA-18 ve OXA-45 klavulanat tarafından inhibe edilir (Hamańa, 2009).

En yaygın olanı OXA-1 β -laktamazıdır ve *E. coli* suşlarının %1-10'unda bulunmaktadır. Bu enzimlerin OXA-1 den OXA- 10'a kadar olanları dar spektrumlu olup substrat olarak oksasilin ve kloksasilini tercih ederler. TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz etme yeteneklerinden dolayı geniş spektrumlu enzimler olarak gelişmişlerdir (Dađlar ve ngűt, 2012).

OXA tipi GSBL'lerin cođrafik dađılımı hakkında çok az veri bulunmaktadır. Çođunluđunu OXA-10 tűrevlerinin oluřturduđu OXA tipi GSBL'ler bařlangıńta Ankara'da Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında gűrűlműřtir. OXA tipi GSBL' ler Tayvan ve Kore' de izole edilen seftazidim dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında sırasıyla %2.9 ve %0.4 oranında bulunmuřlardır. Fransa'da, birkaç *P. aeruginosa* izolatında OXA-13 tűrevi enzimler (OXA-19 ve OXA-28) ve OXA-18 enzimi saptanmıřtır. Amerika'da bir *P. aeruginosa* izolatında OXA-45 enzimi bulunmuřtur (Hamańa, 2009).

OXA tipi GSBL'lere ek olarak, GSBL olmayan OXA tűrevleri de bulunmaktadır. Karbapenemaz özelliđi gűsteren OXA-23, OXA-24, OXA-27, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-72 enzimleri bunlara örnek olarak verilebilir (Hamańa, 2009). OXA-24 enzimi ayrıca karbapenemaz aktivitesi gűstermektedir. Bu enzimlerin

önemi, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olmaları ve hemen daima hastane infeksiyonlarından soyutlanan kökenlerden saptanmalarıdır (Dağlar ve Öngüt, 2012).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Enzimler, Vektörler ve Kitler, Kimyasallar, E-test Kartlar

Çalışma boyunca kullanılan enzimler: NdeI (NEB), XhoI (NEB), DpnI (Fermantas), EcoRI (Fermantas), Taq DNA Polimeraz (GoTaq, Promega), T4 DNA ligaz (Fermantas), lizozim (Sigma), RNaz (Fermantas).

Çalışma kapsamında kullanılan kitler: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (USA), DNA Ladder (New England Biolabs, Evry, France), pGEM-T Easy Vector TA Cloning Kit (Promega), pET100 TOPO® (Life Technologies), pET-28a (Novagen).

Çalışmada kullanılan kimyasallar: Benzilpenisilin (Santa Cruz Biotechnology), imipenem (Cayman Chemical Company), meropenem (Sigma), sefalothin (sigma), sefotaksim (sigma), seftazidim (sigma), sefepim (sigma), ampisilin (USB), kanamisin (USB), IPTG (Sigma), X-gal (Sigma), MHB (Merck), MHA (Merck), agaroz (Sigma), gliserol (sigma), MgCl₂ (Promega), dNTP (Promega), etidyum bromür (BioRad), etanol (Sigma), metanol (Sigma), SDS (Merck), NaCl (Fluka), yeast (Merck), Tris (Merck), agar (Merck), temed (Sigma), H₂SO₄ (Sigma), akrilamid (Sigma).

Çalışmada Kullanılan E-test kartlar: Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC) değerlerini belirlemek için kullanılan E-test kartlar:, Tikarsilin/KLA (Biomérieux), Piperasilin (Bioanalyse), Piperasilin+TZBa (Bioanalyse), Sefoksitin (Bioanalyse), Sefotaksim (Bioanalyse), Seftazidim (Biotests), Sefepim (Bioanalyse), Aztreonam (Bioanalyse), Meropenem (Biotests), İmipenem (Bioanalyse), Amoksisilin (Diagnostic L10filchem), Amoksisilin+KLA (Biomérieux), Gentamisin (Biomérieux).

2.2. Çalışma Solusyonlarının Hazırlanması

Besiyerlerin hazırlanması: Müller-Hinton Agar (MHA) besiyeri, Ampisilinli MHA, Müller-Hinton Broth (MHB) besiyeri ve Luria Broth-Agar besiyerlerinin hazırlanması aşağıda verilmiştir.

Müller-Hinton Agar (MHA) besiyeri: Moleküler ağırlığı 38 gr/L olan toz halindeki MHA'dan 38 gr alınarak distile su ile 1000ml'e hacime tamamlandı. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra yaklaşık olarak 45-50 °C'ye kadar soğutuldu. Steril ortamda; plastik petrilere, derinliği 3 mm olacak şekilde döküldü ve katılaşmaya bırakıldı.

Ampisilinli MHA: Antibiyotik etkinliğinin inhibe olmaması için besiyeri yaklaşık olarak 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril ortamda ampisilin (50 mg/ml) ilave edildi. Karışım sağlandıktan sonra katı besiyeri plastik petrilere 3 mm olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakıldı. Bu besiyeri E-test yöntemi için kullanıldı.

Müller-Hinton Broth (MHB) besiyeri: Toz halindeki MHB'den 21 gr alınarak distile su ile 1000ml'e hacime tamamlandı. Besiyerine otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilizasyon işlemi uygulandı. +4 °C de saklandı. Besiyeri E-test yöntemi için kullanıldı.

Luria Broth-Agar: 1 litre besiyeri için; 10 gr tripton, 5 gr yeast extract, 5 gr NaCl, 15 gr agar kullanılarak otoklavda sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra besiyeri kullanılabilir duruma getirildi.

Agaroz jellerin hazırlanması ve Elektroforezi: %1 agaroz içeren jel yapmak için 100 ml 1 X TAE içine 1 gr agaroz konularak mikrodalga fırında 3-4 dakika kadar kaynatıldı. Sıvı durumunda olan jelin içerisine 10 µg/ml etidyum bromürden 4 µl eklenerek elektroforez tankında polimerleşmesi sağlandı. Elektroforez; 1 X TAE tamponu içerisinde 100 V da 20-60 dakika arası DNA örnekleri eksi (katod) den artı (anod) ya doğru yürütme yapıldı. Görüntüleme transilüminatör üzerine alınarak UV ışığında DNA'ların görüntülenmesi sağlandı.

SDS-PAGE Hazırlanması ve Elektroforezi: SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmaktadır. SDS-Page jelini hazırlamak için kullanılan solusyonlar Tablo 7’ de verilmiştir.

Tablo 7. SDS-PAGE jelini hazırlamak için kullanılan solusyonlar.

% 30 Akrilamid	29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid, 100 ml saf suda çözüldü. Filtre edilerek +4°C’ de saklandı.
% 10 Amonyum persülfat (APS)	1 g APS, 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edilerek +4°C’ de saklandı.
% 10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	1 g SDS, 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edilerek +4°C’ de saklandı
1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	18,5 g Tris Base, Bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH: 8,8’ e ayarlandı. Son hacim 100 ml’ ye tamamlandı. +4°C’ de saklandı
1 M Tris-HCl (pH: 6,8)	12,11 g Tris Base, Bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH: 6,8’ e ayarlandı. Son hacim 100 ml’ ye tamamlandı. +4°C’ de saklandı
N,N,N’, N’-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	Ticari olarak satılan firmadan satın alındı. Merck

SDS-PAGE jeli, ayırma jeli ve yükleme jeli olmak üzere iki aşamada gerçekleşti. Ayırma jeli için % 15’ lik karışım hazırlandı. Ayırma jeli ve yükleme jeline kullanılan solusyonlar ve kullanılan miktarlar Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. Ayırma jeli ve yükleme jelinde kullanılan solüsyonlar ve kullanılan miktarlar.

	Ayırma Jeli	Yükleme Jeli
Deiyonize su:	1,10 ml	1,40 ml
% 30 Akrilamid:	2,50 ml	0,33 ml
1.5 M Tris-HCl (pH: 8.8):	1,30 ml	0,25 ml (1 M Tris-HCl (pH: 6,8))
% 10 SDS:	0,05 ml	0,02 ml
% 10 APS:	0,05 ml	0,02 ml
TEMED:	0,002 ml	0,002 ml

İki ucu açık dikdörtgen şeklindeki cam levhalar üst üste konularak jel dökme aparatına takıldı. Hazırlanan ayırma jeli camın 4/5' i dolacak şekilde döküldü. Geri kalan kısmına su dökülerek jelin polimerleşmesi beklendi. Polimerleşmesi gerçekleşen jelden su alındı ve hazırlanan yükleme jeli polimerleşen ayırma jelinin üzerine döküldü ve tarak yerleştirildi. Tekrardan yükleme jelinin de polimerleşmesi beklendi. Polimerleştiği anlaşılan jelden tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve polimerize olan jel tanka yerleştirildi. Daha sonra 10 X' lik hazırlanan yürütme tamponu 1 X olacak şekilde hazırlandı yürütme tankına döküldü. SDS-PAGE' de yürütülecek olan proteinler 95°C' de 5 dakika kaynatılarak ve kaynadıktan sonra 5 dakika bekletilip yükleme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra doğru kutupların üst üste gelmesine dikkat edilerek güç kablolarını taşıyan kapak kapatıldı. Jel yürütülmesi proteinlerin yükleme jelini geçene kadar 100 V' ta ayırma jeline geçtiği anlaşılan proteinlerin yürütülmesi ise 160 V' da gerçekleşti. Yaklaşık olarak 2 saat yürütüldükten sonra jel alındı ve cam levhalar açılarak jel çıkartıldı. Jeldeki proteinlerin görünür olmasını sağlayan SDS-PAGE yürütme boyası kullanıldı. 1 saat boyunca SDS-PAGE yürütme boyasında bekletildikten sonra su ile yıkanarak proteinler görüldü SDS-PAGE de yürütme ve yürütme sonrası kullanılan malzemeler Tablo' 9 da verildi.

Tablo 9. SDS-PAGE' de yürütme ve yürütme sonrası kullanılan malzemeler

SDS - Page Yürütme Boyası	1 M Tris pH:6,8 % 10 SDS Gliserol 2-β-Merkaptoetanol Bromofenol Blue
10X SDS - Page Yürütme Tamponu	72 g glisin 15 g Tris - Base 50 ml SDS
SDS – Page Jel Boyası	250 ml metanol 50 ml asetik asit 0,625 g Coomassie- Brillant Blue R-250 (CBB)

2.3. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

E.coli'nin DH5α, BL21 soylarını kompetent hale getirmek için ekildiği LB-Agar üzerinden rastgele koloni alınarak 3 ml LB besiyerine ekilerek 37 °C' de 18- 20 saat üretildi. Üretilen örnekten 500 µl alınarak 50 mL LB besiyerine tekrardan pasaj atılarak 37 °C' de yaklaşık 2-3 saat OD₆₀₀=0,4'e ulaşınca kadar büyütüldü. Büyütüldükten sonra pasaj 5 dakika buzda bekletildi ve falkon tüplere alınarak +4 °C' de 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi, süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 7,5 ml soğuk FSB (Frozen storage buffer: 100 mM KCl, 50 mM CaCl₂.2H₂O, %10 gliserol, 1 M KCO₂CH₃) tamponunda çözüldükten sonra 2 saat buzda bekletildi ve 10 dk 6000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılıp tekrar 2 ml soğuk FSB tamponunda pellet çözüldü. Ependorf tüplere 100 µL dağıtıldı ve hazırlanan hücreler -80 °C de saklandı.

2.4. Çalışmada Kullanılan Tamponların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bütün tamponlar Tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 10. Çalışmada kullanılan tamponlar.

Tampon Adı	Tampon Bileşenleri
FSB	100 mM KCl, 50 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, % 10 gliserol, 1 M KCO ₂ CH ₃
50X TAE	242 g Tris Base, 57,1 mL glacial asetik Acid, 100 mL 0,5 M EDTA
Tris-H ₂ SO ₄	50 mM Tris, (H ₂ SO ₄ ile pH; 7,4' e ayarlandı)
Kinetik tamponu	50 mM NaPi, 25 mM NaHCO ₃ , pH;7,4
AP tamponu	0,1 M TRIS-HCL, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH; 9,5
10 X PBS	80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14,4 gr Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O, 2,4 gr KH ₂ PO ₄ , (1 L) pH; 7,4
Elektroblotting tampon	48M Tris, 39 mM glisin, 0,0375% (w/v) SDS

2.5. Bakteri Suşlarının Canlandırılması ve Total DNA İzolasyonu

Proteus mirabilis TRP41 (*bla*_{OXA-320} taşıyıcı) (Çiçek vd., 2014) ve *E. coli* FD8ba izolatları (*bla*_{OXA-1} taşıyıcı) (Çolakoğlu vd., 2010), Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma laboratuvarında gliserol stoktan canlandırılarak çoğaltılmıştır ve DNA izolasyonu için kullanılmıştır. -80 °C'de %20 gliserol içinde saklanan bakteri hücreleri LB agar besiyerlerine ekildi ve 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. Elde edilen kolonilerden bir tanesi seçilerek, 3 mL sıvı LB besiyerine aktarıldı ve 37 °C çalkalayıcı da 16 saat inkübe edildikten sonra 1,5 mL'si santrifüj tüpüne alınarak 14000 rpm' de 2 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet DNA izolasyonu için kullanıldı. DNA izolasyonu kiti kullanılarak üretici firma protokolü doğrultusunda DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep). DNA örnekleri %0,7' lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi ve PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20 °C' ye saklandılar.

2.6. *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} alellerinin Champion™ pET100 TOPO® Vektörüne Klonlanması

E-test analizleri için her bir OXA aleli önce Champion™ pET100 TOPO® ekspresyon vektörüne klonlandı ve sonrasında bir tanesi üzerinden 266A mutasyonu oluşturuldu. Bu amaçla önce her bir gen OXA-TOPO-FW 5'-CACCATGAAAAACACAATACATAT -'3 ve OXA-TOPO-RW 5'-TTATAAATTTAGTGTGTTTAG-'3 primerleri kullanılarak genomik DNA'lardan çoğaltıldı. PZR reaksiyonu 50 µL son hacim olacak şekilde; 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega), 3µl 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 4 mM dNTP, 2 µl her bir primer stoku (25 pmol/µL), 1,5 ünite DNA polimeraz I (GoTaq, Promega), 5 µl DNA ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon programı başlangıç denatürasyonu 95°C'de 3 dk, 95°C'de 20 sn, 45°C'de 1 dk, 72°C'de 70 sn olmak üzere 20 döngü ve son sentez 72°C'de 5 dk olacak şekilde Thermal Cycler'da (BİO-RAD) yapıldı. Amplifikasyon ürünü %1' lik agaroz jelde 100 voltta 45 dakika yürütülerek görüntülendi.

PZR ürünü 100 µL hacimde DpnI restriksiyon endonükleaz ile kesildi. Kesim için 2 µL DpnI, 10 µL 1X DpnI tamponu, 40 µL PZR ürünü ve son hacim steril deiyonize su ile 100 µL'ye tamamlanarak reaksiyon 37 °C de 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Kesim sonrası %1'lik agaroz jelde görüntüledikten sonra, PZR temizleme kiti ile temizlendi. Saf PZR ürünü pET100 TOPO® vektörüne ligasyonu sağlandı. Bu amaçla kit prosedürü kullanıldı. Özetle; ligasyon reaksiyonu toplam 3 µl hacimde; 0,5 µl pET100 TOPO^R, 0,5 µl tuz solüsyonu ve 2 µl PZR ürünü kullanılarak 25 °C'de 7 dk olarak gerçekleştirildi. Ligasyon ürününe 7 µl steril deiyonize su ile seyreltikten sonra ligasyon ürününün 5 µl' si *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Transformasyon sonucu belli sayıda koloni rastgele seçilerek içerisinde 3 ml sıvı ampisilinli besiyeri bulunan steril tüplere pasaj atılıp 37 °C' de 18-20 saat büyütüldü. Plazmit izole edildi ve OXA-spesifik PZR'ler ile plazmitlerin *bla*_{OXA} genlerini taşıdıkları doğrulandı. Hem *bla*_{OXA-1} hem de *bla*_{OXA-320} pozitif klonlardan birer tanesi sekans ile doğrulandı (Macrogen, Europe).

2.7. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Nokta Mutasyonunun Yapılması

MacroGene gönderilip sekans sonucu gelen pET100 TOPO® vektörüne klonlanan örneğin değerlendirilmesi Blast URL-8 ve Expasy URL-9 programlarıyla gerçekleştirildi. Dizin analiz sonucuna göre pET100 TOPO® vektörüne klonlanan alellerin *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} olduğu doğrulandı.

OXA-320 varyantında 266. pozisyonundaki izolosin amino asit mevcut iken OXA-1 varyantında 266. pozisyonunda asparajin aminoasit mevcuttur. *bla*_{OXA-320} aleli klonlanmış vektör üzerinden yönlendirilmiş mutasyon yapılarak 266. pozisyonda alanin mutasyonu (266A) gerçekleştirildi. Bu yönlendirilmiş mutasyonların 266. pozisyonundaki amino asit farklılıklarının MİK değerindeki değişimlere etkisinin olup olmadığını araştırmak için yapıldı. OXA-320 aleli üzerinden gerçekleştirilmesi istenilen yönlendirilmiş mutasyon için iki adet primer dizayn edildi 266AFw: ATAGAGAACATGTATCTAGCAGATCTGGATAATAGT, 266ARw: ACTATTATCCAGATCTGCTAGATACATGTTCTCTAT. Mutasyon için PZR toplam 50 µl hacimde şu bileşenler kullanılarak hazırlandı; 1,5 ünite Q5® High Fidelity DNA Polimeraz (Biolabs), 4 µL plazmit DNA, 10 µl DNA polimeraz tamponu (5X) (MgCl₂'lü), 5 µl Q5® High GC Enhancer tamponu, 2,5 µl dNTP (4 mM) ve 1 µL (25 pmol/µL) her bir primer stoku ve steril deiyonize su. Mutasyon PZR için döngü şartları: Başlangıç denatürasyonu 94°C 4 dk, 94°C 1dk, 52°C 1 dk, 72°C 16 dk olmak üzere 20 döngü ve son sentez 72°C 20 dk' da gerçekleştirildi.

PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntüledikten sonra restriksiyon endonüklez enzimi olan *DpnI* ile kesildi. Kesim: 2 µL *DpnI*, 10 µL 1X *DpnI* tamponu, 40 µL PZR ürünü ve son hacim steril deiyonize su ile 100 µL' ye tamamlanarak reaksiyon 37 °C de 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Kesim gerçekleştirildikten sonra PZR temizleme kiti ile temizlendi ve temizlendikten sonra *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi. Petrilerde oluşan kolonilerden plazmitler izole edilerek DNA dizi analizi için MacroGen firmasına gönderildi.

2.8. 266. Pozisyondaki Aminoasit Varyasyonun Enzim Aktivitesine Etkisinin E-Test Yöntemi ile Araştırılması

DNA dizi analizi için gönderilen örneklerin sekans sonucuna Blast ve Expassy programı ile bakıldıktan sonra yönlendirilmiş mutasyonun gerçekleştiği doğrulandı. *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA1/266N) (1), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA-320/266I) (2), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA/266A) (3), *Proteus mirabilis* TRP41 (-80 °C %20 gliserol stok) (4), *E. coli* FD8bA (-80 °C %20 gliserol stok) (5) ve *E. coli* TOP10 (-80 °C %20 gliserol stok) (6) hücrelerinin minimum inhibisyon konsantrasyonunu değerlendirip karşılaştırmak için E-test yöntemi uygulandı.

E-test yapılacak olan hücrelerin her birinin gliserol stoğundan 200 µL alınarak 2 mL LB' ye konularak 37°C' de 9 saat canlandırıldı. Sonrasında MHA' lı petrilere çizgi ekim yapıldı ve gece boyu 37 °C' de büyütüldü. TOPO' ya klonlanmış olan aleller *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA1/266N), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA-320/266I), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA/266A) ampisilinli besiyerinde büyütülürken, *Proteus mirabilis* TRP41, *E. coli* FD8bA ve *E. coli* TOP10 antibiyotiksiz besiyerinde büyütüldü. Gece boyu büyütülen örneklerin her birinden eküvyon çubuk ile benzer morfolojiden 4-5 koloni alınarak içerisinde MHB bulunan tüpe alındı ve McFarland'ı 0,5 standardına göre ayarlandı. Taze dökülmüş 4 ml MHA plaklara 100 mM IPTG'den 40 µL steril baget yardımı ile sürüldü. 0.5 McFarland' a ayarlanan süspansiyondan eküvyon çubuk yardımı ile alınarak tüm agar yüzeyine, plak dört kere aynı yönde 60° çevrilerek sürüldü. Daha sonra steril pens ile ambalajından yüzeyi boyunca belli oranlarda değişen antimikrobiyal ajanlar ile emdirilen E-test stribi alındı ve stripin üst yüzeyi cetvel yazısı olacak biçimde agar yüzeye bırakıldı. Stribin tüm yüzeye temas etmesi sağlandı. Plaklar düz vaziyette 37°C' de 18-20 saat inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra strip ile elips inhibisyon zonun kesiştiği noktadan MİK değeri okundu. MİK belirlenmesinde kullanılacak olan antibiyotikler; tikarsilin/klavulanik asit, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefepim, aztreonam, meropenem, imipenem, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit ve gentamisin' dir.

2.9. VITEK Cihazı Kullanılarak Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması

Sekans sonucuna göre *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA1/266N), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA-320/266), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA/266A) olan varyantlar API 32GN sistemi (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) (CLSI, 2013) kullanılarak tanımlandı. Minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri, VITEK cihazı kullanılarak belirlendi. VITEK kartları üretici firmanın belirlediği şekil doğrultusunda kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi için; ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefepim, ertapenem, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, tobramisin, siprofloksasin, tigesiklin, kolistin, trimetoprim/sülfametaksazol antibiyotikleri kullanıldı ve CLSI 2013' e göre değerlendirildi.

2.10. *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} alellerinin pET28a Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

*bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} alellerini amplifiye etmek ve pET28a vektörünün *NdeI* ve *XhoI* bölgesine klonlanması için uygun primerler OXA-pET28a-Fw: 5'-CATATGTCAACAGATATCTCTACTGTTGC-3' ve OXA-pET28a-Rw: 5'-CTCGAGTTATAAATTTAGTGTGTTTAG-3' dizayn edildi. Primerler dizayn edilirken gene ait sinyal peptid sırasının var olup olmadığı *SignalP 4.1 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) programı kullanılarak bakıldı. Sinyal dizisi dışarıda bırakılacak şekilde primerler dizayn edildi. PZR reaksiyonu 50 µL son hacim olacak şekilde; 5 µl polimeraz tamponu (10X), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1 µl her bir primer stoku (25 pmol/µL), 1,5 ünite DNA polimeraz I, 5 µl DNA ve steril deiyonize su. Amplifikasyon programı başlangıç denatürasyonu 94°C' de 4 dk, 94°C' de 45 sn, 57°C' de 1 dk, 72°C' de 90 sn (20 döngü), ve son sentez 72°C de 5 dk gerçekleştirildi. PZR ürünü görüntüledikten sonra PZR ürünlerinin pGEM-T Easy plazmitine (Promega) ligasyonu sağlandı. Reaksiyon toplam 3 µl hacimde 0,15 µl pGEM-T easy (10 ng), 1,5 µl ligasyon tamponu (2X), 0,15 µl T4 DNA ligaz (0,6 ünite/ µl) ve 1,2 µl PZR ürünü kullanılarak 16 °C'de gece boyu gerçekleştirildi. *bla*_{OXA} genlerini taşıyan pGEM-T easy plazmitleri, *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Daha sonra hücreler IPTG ve X-gal içeren ampisilinli plaklarda mavi-beyaz renk oluşumuna bakılarak ayrıldı. Rastgele seçilen

beyaz kolonilerden ve mavi koloniden plazmit izole edildi ve doğrulamak amacıyla *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. PZR ürünü ve geni taşımayan hücre ile yürütülerek görüntülendi.

DNA dizi analizi için gönderilen örnekte, pGEM-T easy vektörüne bla_{OXA} alellerinin klonlandığı doğrulandı. Pozitif vektörlerden birer tane kullanılarak toplam 200 µL hacimde aşağıdaki bileşenler kullanılarak kesim reaksiyonu gerçekleştirildi; 90 µL plazmit, 20 µL *NdeI* ve *XhoI* ortak tamponu, 20 ünite *NdeI*, 20 ünite *XhoI* ve steril deiyonize su. Kesim reaksiyonu 37°C’de 2 saat gerçekleştirildi. Kesim sonrası %1 lik temiz jelde 45 dakika yürütülerek bla_{OXA} fragmentleri QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak jelden izolasyonu yapıldı. Her iki restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan yeni alel fragmenti ve daha önceden kesilmiş olan pET-28a vektörünün ligasyonu sağlandı. Ligasyon toplam 10 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon 1 µl T4 DNA ligaz tamponu (10X’den), 1µl T4 DNA ligaz (10 unite/µl), 4 µl ekspresyon vektörü (*NdeI* ve *XhoI* ile kesilmiş pET-28a) ve 4 µl jelden izole edilen bla_{OXA-1} fragmenti ürünü kullanılarak 16°C’de gece boyu gerçekleştirildi. Ligasyonu sağlanan plazmit, *E. coli* DH5a hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonrası seçilen rastgele kolonilerin kültürü atılarak büyütüldü ve kimyasal yöntemle izolasyonu yapıldı. Örnekler marker, pGEM-T’ ye klonlanmış bla_{OXA-1} aleli, boş pET-28a vektörü ile yürütüldü. Doğrulamak için tekrardan *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon endonüklez enzimleri ile toplam 10 µL hacimde; 8 µL plazmit, 1 µL *NdeI* ve *XhoI* tamponu, 0,5 µL *NdeI*, 0,5 µL *XhoI* 37°C’ de 1 saat kesildi ve %1 lik agaroz jelde PZR ürünü ve marker ile yürütüldükten sonra doğrulanan örneklerden bir tanesi DNA dizi analizine gönderildi. Sekans sonucu doğrulanan örneğin ekspresyonu için *E. coli* BL21 hücrelerine aktarıldı (Maniatis vd.,1989).

2.11. bla_{OXA-1} Aleli Üzerinden 266. Pozisyonda Yönlendirilmiş Mutasyonu

OXA-1 varyantında 266. pozisyonunda asparajin aminoasit mevcuttur. bla_{OXA-1} aleli pET28a’ ya klonlanmış vektör üzerinden yönlendirilmiş mutasyon yapılarak 266. pozisyonda alanin mutasyonu (266A) gerçekleştirildi. Yönlendirilmiş mutasyonun yapılmasındaki amaç 266. pozisyonundaki amino asit farklılıkların enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olup olmadığını araştırarak literatüre katkı sağlanmasıdır.

266. pozisyonundaki Asparajin aminoasitini Alanin aminoasitine dönüştürmek için 266A_Fw: ATAAAAGCCAAGAAAGCTGCGATCACCATTCTA-‘3 ve 266A_Rw: 5’TAGAATGGTGATCGCAGCTTTCTTGGCTTTTAT-‘3 primerleri dizayn edildi. Mutasyon için PZR toplam 50 µl hacimde şu bileşenler kullanılarak hazırlandı; 1,5 ünite Q5® High-Fidelity DNA Polimeraz (Biolabs), 4 µL plazmit DNA, 10 µl DNA polimeraz tamponu (5X) (MgCl₂’lü), 5 µl Q5® High GC Enhancer tamponu, 2,5 µl dNTP (4 mM) ve 1 µL (25 pmol/µL) her bir primer stoku ve steril deiyonize su. Mutasyon PZR için döngü şartları: Başlangıç denatürasyonu 94°C 2 dk, 94°C 40 sn, 54°C 1 dk, 68°C 12 dk olmak üzere 20 döngü ve son sentez 68°C 20 dk’ da gerçekleştirildi. PZR ürünleri QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak temizleme işlemi gerçekleştirildi. Temizlenen PZR ürünleri toplam 100 µL hacimde; 2 µl *DpnI* restriksiyon endonükleaz enzimi, 10 µl 1X *DpnI* buffer, 85 µl temizlenen PZR ürünü ve son hacim 100 µl’ ye tamamlanacak şekilde steril deiyonize su ile tamamlanarak 37°C’ de 2 saat süre ile kesildi. Kesim sonrası tekrardan QIAquick Gel Extraction Kit kullanılarak temizleme işlemi gerçekleştirilerek %1’ lik agaroz jelde görüntülendi. Daha sonra *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Oluşan kolonilerden rastgele koloni seçilip plazmit izole edilerek DNA dizi analizine gönderildi. Sekans sonucu doğrulanan örneğin ekspresyonu için *E. coli* BL21 hücrelerine aktarıldı (Maniatis vd.,1989).

2.12. OXA Varyantlarının Rekombinant Üretimi ve Saflaştırması

E. coli pET28a-OXA1/266N, *E. coli* pET28a-OXA-320/266I, *E. coli* pET28a-OXA/266A hücrelerinin ekspresyonunu gözlemek ve ekspresyon şartlarını belirlemek için deneylere başladı ve uygun ekspresyon şartı belirlenerek Ni-afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ekspresyon şartlarını belirlemek için yapılan deneyler tabloda gösterilmiştir (Tablo 11).

E. coli pET28a-OXA1/266N, *E. coli* pET28a-OXA-320/266I, *E. coli* pET28a-OXA/266A hücreleri *E. coli* BL21 hücrelerine transforme edilerek rastgele tek bir koloni seçildi ve ekspresyon için kullanıldı. Koloniler 3 ml kanamisinli (60 mg/ml) LB besiyerinde gece boyu büyütüldü. Daha önce yapılan deneylerde ekspresyonun hangi

şartlarda yapılacağı belirlendi. 200 mL sıvı kanamisinli LB' ye ekim yapılarak 37 °C' de O.D 0,6-0,7 olana kadar inkübe edildi. Daha sonra 0,1 mM IPTG (izopropil β-D-1-Tiyogalaktopiranozit) ile indüklenerek, 28 °C de 5 saat büyütüldü. Hücreler 6000 g' de 15 dk santrifüjle çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet gece boyu -20°C' de bekletildi. Gece boyu bekletilen pellete 50 mM Tris-H₂SO₄ (pH: 7,4) ve 20 mg/mL lizozim enzimi konularak 1 saat boyunca buzda bekletildi. Daha sonra sonikatör yardımıyla hücreler yarım saat patlatıldı. Sonikatör sonrasında 40 dakika 9000 rpm de soğutmalı santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı ayrı bir falkon tüpüne alınarak %15' lik SDS-PAGE' de markır ile yürütülerek proteinin büyüklüğü doğrulandı.

Tablo 11. Ekspresyon şartlarını belirlemek için yapılan deneyler.

Sıcaklık değerleri	IPTG Konsantrasyonu	İnkübasyon süresi
28°C	0,01 mM	5 saat
28°C	0,05 mM	5 saat
28°C	0,1 mM	5 saat
28°C	0,5 mM	5 saat
28°C	1 mM	o/n
37°C	0,01 mM	5 saat
37°C	0,05 mM	5 saat
37°C	0,1 mM	5 saat
37°C	0,5 mM	5 saat
37°C	0,1 mM	o/n
37°C	1 mM	3 saat

Kinetik karakterizasyon için üretilen proteinler Ni-afinitite kromatografisi ile saflaştırıldı. OXA proteinlerinin ekspresyon için klonlandığı pET28a plazmiti, N-terminal bölgesinde 6 Histidin kodonu içermektedir. Bundan dolayı, *E.coli*'nin diğer proteinlerinden OXA proteinlerini ayırmak için afinitite kromatografisi kullanılmıştır. Histidinin kobalt ve nikel iyonuna karşı afinitesi vardır. İçerisinde nikel bulunan bir kolondan proteinler geçirildiği zaman 6 Histidin bulunduran protein kolona bağlanır ve istenmeyen diğer proteinler kolondan akar gider. Kolona bağlanmış proteini kolondan ayırmak için ise imidazol kullanılır çünkü imidazolun nikel karşı yüksek afinitesi vardır (Düzgün, 2015).

Safılaştırma işlemi 4° C’ de soğuk odada yapıldı. Safılaştırma boyunca kullanılan tamponlar Tablo 12’ de verilmiştir. Nikel kolon 10 mL 500 mM imidazollü çözeltili ile yıkandı. Daha sonra 10 mL kolon dengeleme tamponu ile dengeye getirildi. Kolondan proteinin süpernatantı geçirilerek altta fraksiyon toplandı. Yıkama 1 tamponu olan 25 mM imidazol kolondan geçirildi ve fraksiyonu alındı. 100 mM imidazol içeren yıkama 2 tamponu kolondan geçirildi ve toplandı. Son basamakta ise saf proteini almak için 300 mM imidazollü tampon kolondan ard arda 4 kez geçirilerek her bir fraksiyon toplandı ve safılaştırma işlemi sonlandırıldı. Daha sonra örnekler %15’ lik SDS-PAGE’ de markırla yürütölüp proteinin saflığına bakıldı.

Tablo 12. Safılaştırmada kullanılan tamponlar.

Kolon Temizleme	50 mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH: 7,4) 500 mM NaCl 2 mM DTT 500 mM İmidazol
Kolon Dengeleme	50 mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH: 7,4) 500 mM NaCl 2 mM DTT
Yıkama 1	50 mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH: 7,4) 500 mM NaCl 2 mM DTT 25 mM İmidazol
Yıkama 2	50 mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH: 7,4) 500 mM NaCl 2 mM DTT 100 mM İmidazol
Elusyon	50 mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH: 7,4) 500 mM NaCl 2 mM DTT 300 mM İmidazol

2.13. Diyaliz Uygulanması

SDS-PAGE yürütme sonrası saf olduğu belirlenen proteinlerin diyalizi yapıldı. Safılaştırma esnasında kullanılan çözeltili tamponunun uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulandı. Protein çözeltilisi yarı geçirgen membrana konuldu ve toplam hacim 2 L olacak şekilde 100 mL 50 mM Tris-H₂SO₄’ ten konuldu ve steril deiyonize su ile son hacme tamamlandı. +4°C’ de gece boyunca bir kez tampon değiştirilerek diyaliz işlemi uygulandı.

2.14. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Diyaliz işlemi uygulanan proteinlere Nano-drop 2000c spektrofotometre (Thermo Sciences) kullanılarak proteinlerin konsantrasyonları belirlendi. K r olarak diyaliz işleminden sonra diyaliz tamponu (50 mM Tris-H₂SO₄) kullanıldı. Proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için, gerekli olan proteinlerin moleküler ağırlıkları proteinlerin sekans sıraları NCBI' dan bulunarak Expasy Protparam programı ile belirlendi.

2.15. Ekspresyonun Western Blotlama Analizi ile Doğrulanması

Western blotting yöntemi yapılmasındaki amaç antikor kullanarak rekombinant olarak üretilen proteinin varlığını ve büyüklüğünü göstermektir. Western blotlama prosedürü 5 ana kısımdan oluşur.

- SDS-Page Jel Elektforezi ile proteinlerin ayrılması; pET28a ekspresyon vektörüne klonlanarak rekombinant olarak üretilip saflaştırılan OXA-1, OXA-320 ve OXA-1 aleli üzerinden 266. pozisyonda yönlendirilmiş mutasyonu gerçekleŐtirilen örnekler ve marker (fermentas) ile yürütüldü. Proteinlerin moleküler ağırlığına bağlı olarak jel üzerinde istenen düzeye ulaŐılınca güç kaynağı kapatıldı ve yürütme tamamlandı.

- Jelde ayrılmıŐ proteinlerin membrana transferi-blotlama; AyrılmıŐ proteinlerin İmmobilon membrana transferi ya da blotlanmasıdır. Yürütme sırası bittikten sonra jel dikkatli bir Şekilde çıkarıldı ve jelin üst kısmındaki kuyucuklar düzgün bir Şekilde bistüri ile kesildi. Daha sonra transfer düzeneği hazırlanıp jel konuldu. Transfer düzeneği sırasıyla; sünger- filtre kağıdı- jel- membran- filtre kağıdı- sünger olacak Şekilde konuldu. Sünger ve filtre kağıtları elektroblotting bufferde ıslatılarak konuldu. Membran ise steril pens yardımıyla 20 ml metanolde 30 sn ıslatıldıktan sonra 80 ml elektroblotting buffer ve 20 ml metanol karıŐımında birkaç saniye ıslatıldıktan sonra konuldu. Transfer buffer (elektroblotting buffer) eklendikten sonra 90 voltta 90 dk yürütüldü.

- Nonspesifik bağlanma bölgelerinin blokajı-bloklama; membran üzerindeki nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilebilmesi için süt tozu kullanıldı. Yürütme yapıldıktan sonra membran başka bir petriye alınarak %0,5'lik süt tozu 1X' lik 50 ml PBS' de çözülerek 2 dk boyunca sallandı ve sıvı döküldü. Daha sonra %5'lik süt tozu 1X'lik 50 ml PBS' de +4°C' de gece boyu bekletildi. Gece boyu bekletilen membran %0,5' lik süt tozu 1X'lik PBS' de çözüldü ve 50 ml lik solusyonda 10 dk boyunca sallayıcıda sallandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

- Primer ve sekonder antikora bağlanmaları; Transfer edilmiş protein enzim işaretli antikor ile kompleks oluştur. 1X' lik 4 ml PBS' ye 4 µL primer antikor olan Monoklonal Anti-poly Histidin antikor (Sigma) eklenerek steril falkon tüpüne membran katlanıp konuldu ve 1 saat boyunca reaksiyona sokuldu. Daha sonra membran %0,5' lik süt tozunda 10 dk boyunca sallandı ve sıvı döküldü. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha sonra steril falkon tüpündeki 4 ml PBS' ye 4 µL sekonder antikor Anti-Mouse IgG (Sigma) eklenerek 1 saat boyunca sallayıcıda sallandı. Yine membran aynı şekilde %0,5' lik süt tozunda 10 dk boyunca 3 kez yıkandı.

- İşaretleyiciye uygun substrat ile reaksiyon; AP tampon ile 10 dk boyunca yıkama işlemi uygulandı. Bu işlem 2 kez uygulandı. Son olarak alkalın fosfotaz' ın substratı olan NBT-BCIP (Roche) substrat çözeltisinden 10 ml AP tampona 10 µl eklendi. Hafifçe membran üzerine dökülerek reaksiyondaki renk değişimi gözlemlenerek proteinlerin ifade olup olmadığını daha özgün bir şekilde gözlemlendi.

2.16. Rekombinant Proteinlerin Kinetik Karakterizasyonu

OXA-1, OXA-320 ve OXA-1/266A proteinleri aktivite deneyleri için kullanıldı. Aktivite deneylerinde benzilpenisilin, imipenem, meropenem, sefalothin, sefotaksim sefepim ve seftazidim substratları kullanıldı.

Öncelikle her substrat için ayrı ayrı enzimlerin en iyi çalıştığı konsantrasyonlar belirlendi ve farklı konsantrasyonlarda enzim kullanılarak kinetik deneyler yapıldı. Yapılan deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Her substrat için Tablo 13' de gösterilen dalga boyları kullanıldı.

Her substrat için ayrı ayrı en iyi enzim konsantrasyonları belirlendikten sonra kinetik deneyleri gerçekleştirildi. Kinetik deneyleri için farklı substrat konsantrasyonları belirlendi. Deneylerde 500 mM NaPi, 500 mM NaHCO₃ içeren (pH; 7,4) tamponu kullanıldı. Yapılan deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve plate okuyucu (CORNING)' da 10 dk boyunca 40 saniye aralıklarla yapılarak toplam 16 okuma yapıldı. Sonuçlar SDAS programı kullanılarak Michaelis-Menten grafikleri elde edildi.

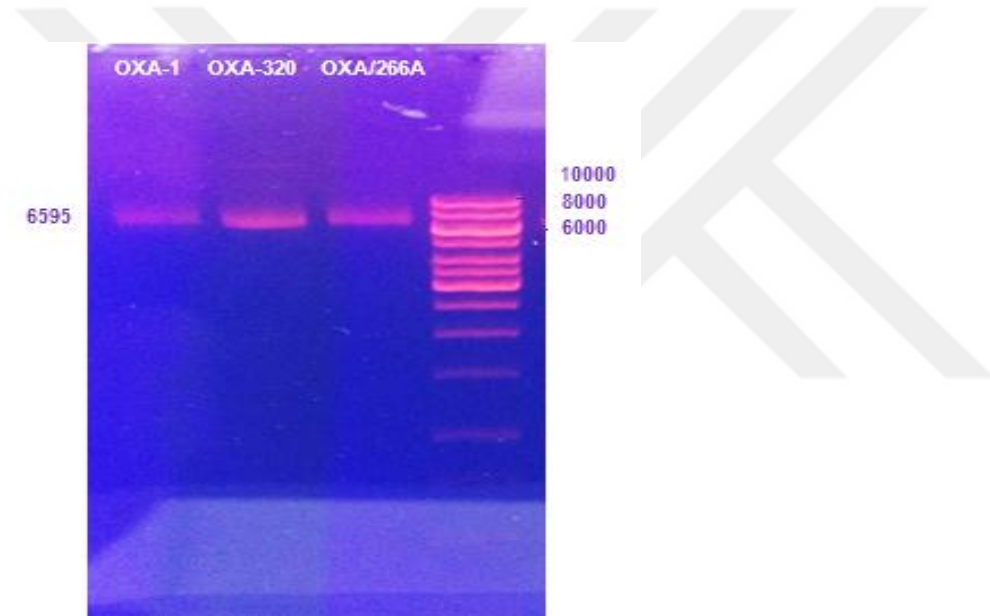
Tablo 13. Her substrat için kullanılan dalga boyları.

Substrat	λ_{Max} (nm)
Benzilpenisilin	230
İmipenem	300
Meropenem	300
Sefalothin	260
Sefotaksim	260
Seftazidim	260
Sefepim	260

3. BULGULAR

3.1. *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} Alellerinin TOPO100 Vektörüne Klonlanması ve Mutasyonlar

E-test analizleri için *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} alellerinin Champion™ pET100 TOPO® ekspresyon vektörüne klonlandı ve sonrasında *bla*_{OXA-320} aleli üzerinden 266. pozisyonda yönlendirilmiş mutasyon gerçekleştirildi. Klonlanan örnekler marker (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder) ile %1' lik agaroz jel görüntüsü Şekil 5' da verilmiştir.



Şekil 5. pET100 TOPO® ekspresyon vektörüne klonlanan örneklerin markır ile yürütülmesi.

3.2. OXA Varyantlarının MİK Değerlerinin Analizi

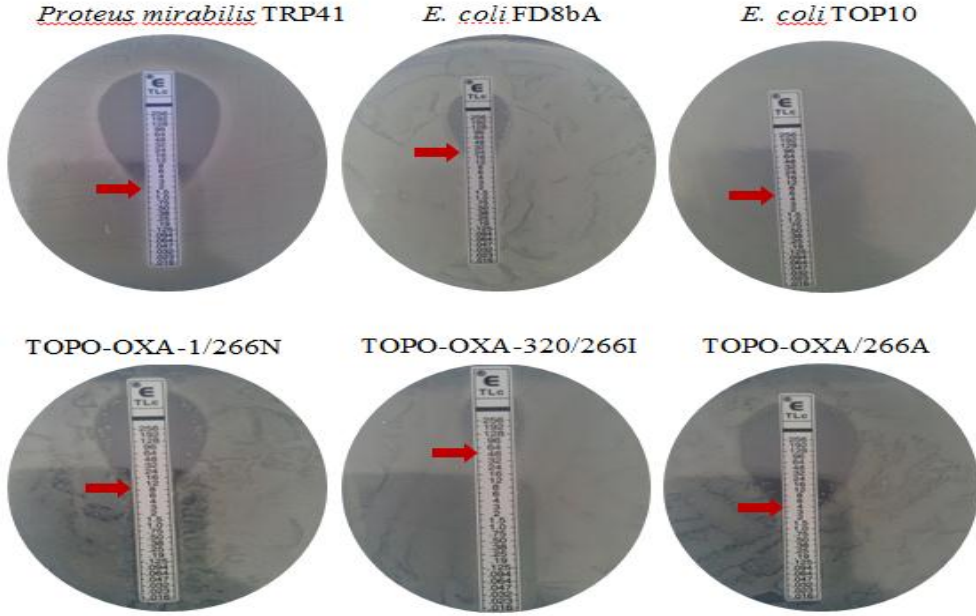
E. coli TOP10 (TOPO-OXA1/266N), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA-320/266I), *E. coli* TOP10 (TOPO-OXA/266A), *Proteus mirabilis* TRP41, *E. coli* FD8bA ve *E. coli* TOP10 hücrelerinin MİK değerlerine bakmak için E-test yöntemi uygulandı. MİK belirlenmesinde kullanılan antibiyotikler; tikarsilin/klavulanik asit, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefepim, aztreonam, meropenem, imipenem, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit ve gentamisin' dir. Genel anlamda MİK sonuçlarına göre amoksisilin ve piperasilin antibiyotiğine OXA-1,

OXA-320 ve OXA320/266A varyantlarının dirençli olduğu değer olarak >256 olduğu çalışmalar sonucunda görülmüştür. Monobaktam grubu antibiyotiğe ve karbapenem grubu antibiyotiklere bütün örneklerin duyarlı olduğu MİK sonucuna göre değerlendirilmiştir. Aminoglikozid grubu olan gentamisin antibiyotiğine OXA-1, OXA-320 ve OXA320/266A varyantlarının MİK değerleri 0.032 çalışmalar sonucunda görülmüştür. Çalışma kapsamında farklı hücrelerde ifadelenen OXA varyantlarının E-test sonuçları Tablo 14’ te verilmiştir.

Tablo 14. Çalışma kapsamında farklı hücrelerde ifadelenen OXA varyantlarının E-test sonuçları.

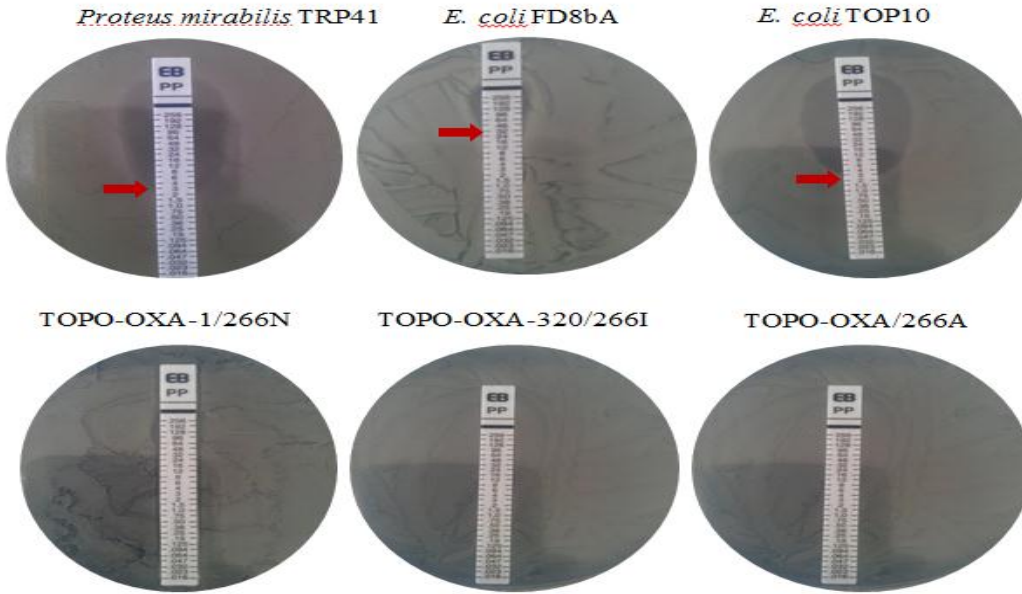
E-Testler	<i>Proteus mirabilis</i> TRP41	<i>E. coli</i> FD8bA	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> TOP10 (TOPO-OXA1/266N)	<i>E. coli</i> TOP10 (TOPO-OXA320/266I)	<i>E. coli</i> TOP10 (TOPO-OXA/266A)
Tikarsilin/KLA	1.5	24	6	16	>64	4
Piperasilin	3	64	3	>256	>256	>256
Piperasilin/TZBa	>1.5	4	1.5	>4	>256	3
Sefoksitin	2	2	1.5	2	8	3
Sefotaksim	1	0,19	0,25	0,064	>0,032	0,19
Seftazidim	0,06	0,25	>0,25	>0,12	0,12	0,25
Sefepim	0,5	>0,5	0,047	0,064	>0,023	0,094
Aztreonam	0,094	>0,19	>0,094	0,064	0,094	0,125
Meropenem	0,06	0,008	0,015	>0,008	0,015	>0,008
İmipenem	6	3	0,75	0,094	0,125	0,25
Amoksisilin	0,5	>256	2	>256	>256	>256
Amoksisilin/KLA	8	>8	3	>4	8	4
Gentamisin	1	0,19	0,125	0,032	0,032	0,032

β -laktamaz inhibitörü olan tikarsilin/klavulanik asit için MİK değerlerinin OXA-266A ile kıyaslandığında OXA-320’de 16 katına, OXA-1 ‘de 4 katına çıktığı gözlemlendi. Tikarsilin/Klavulanik asit antibiyotiği MİK çalışma sonucu Şekil 6’ de verilmiştir.



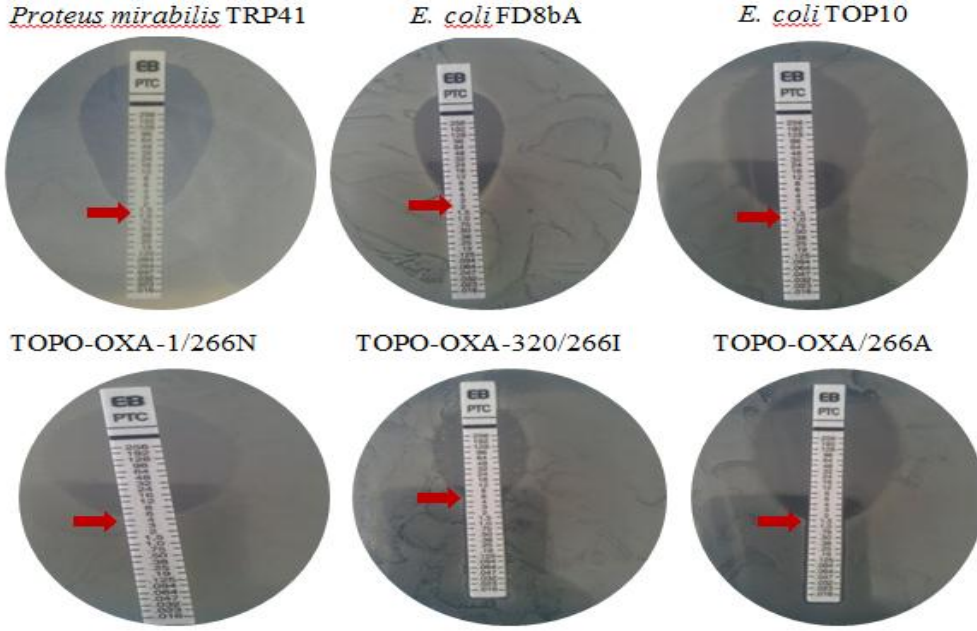
Şekil 6. Tikarsilin/Klavulanik asit antibiyotiği MİK çalışma sonuçları.

Üreidopenisilinler grubunda yer alan piperasilin antibiyotiği için MİK değerleri üç enzimi barındıran *E. coli* hücreleri için aynı olduğu gözlemlendi. Piperasilin antibiyotiği MİK sonuçları Şekil 7’ de verilmiştir.



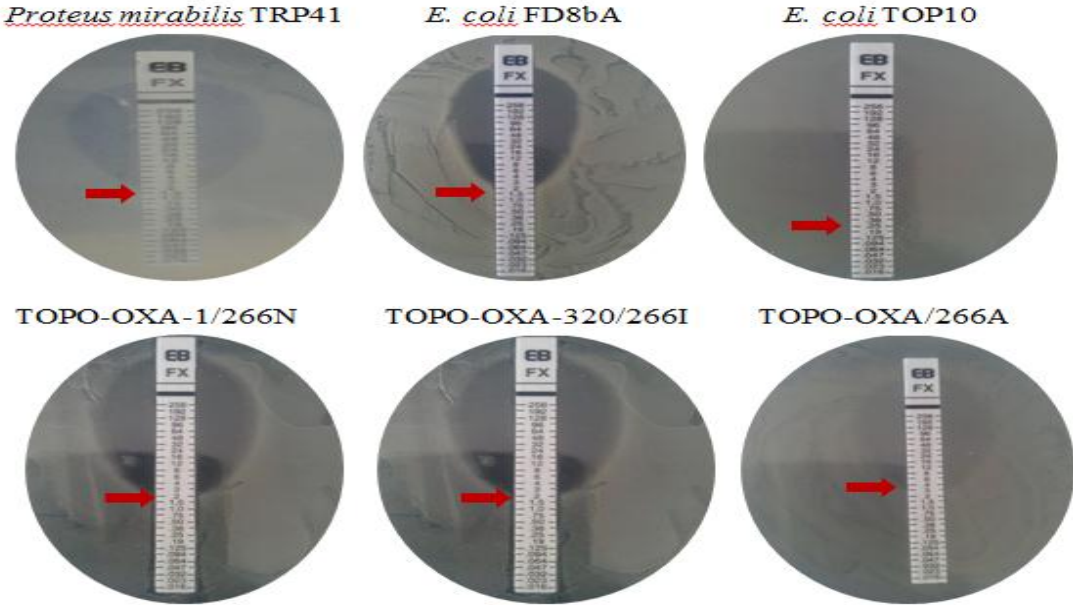
Şekil 7. Piperasilin antibiyotiği MİK sonuçları.

Yine bir β -laktamaz inhibitörü olan piperasilin/tazobaktam antibiyotiği için OXA-320 MİK değerinin oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Piperasilin/tazobaktam antibiyotiği MİK sonuçları Şekil 8’de verilmiştir.



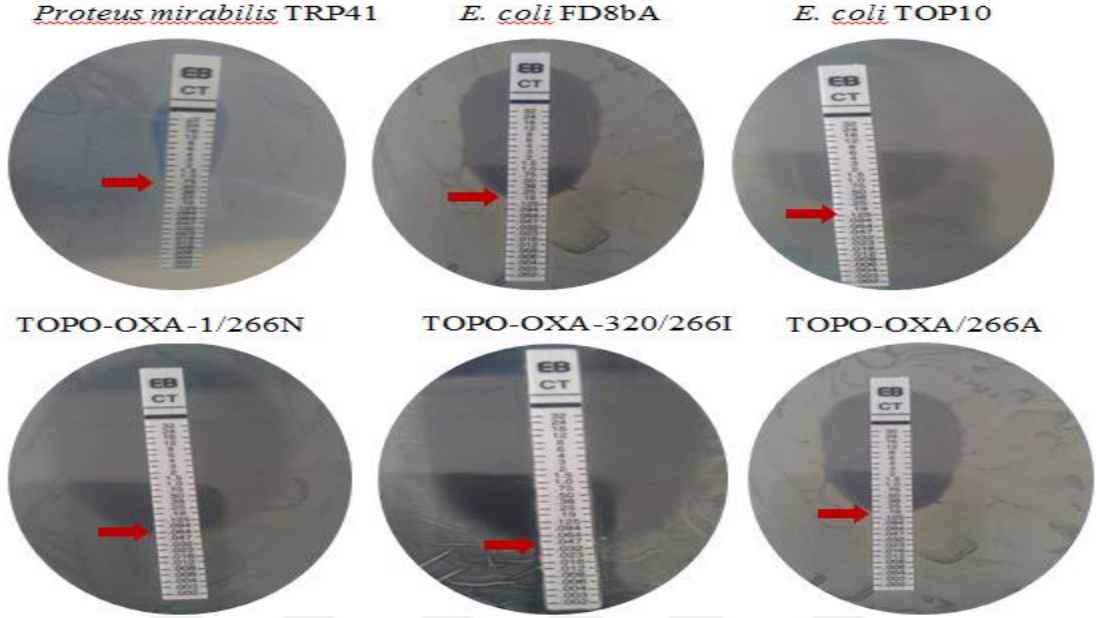
Şekil 8. Piperasilin/tazobaktam antibiyotiği MİK sonuçları.

İkinci kuşak sefalosporin grubundan olan sefoksitin antibiyotiğine MİK değerlerini OXA-320 alelinin OXA-1 alelinden 4 kat yüksek, OXA/266A varyantından 2,7 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Sefoksitin antibiyotiğinin MİK sonuçları Şekil 9’ da verilmiştir.



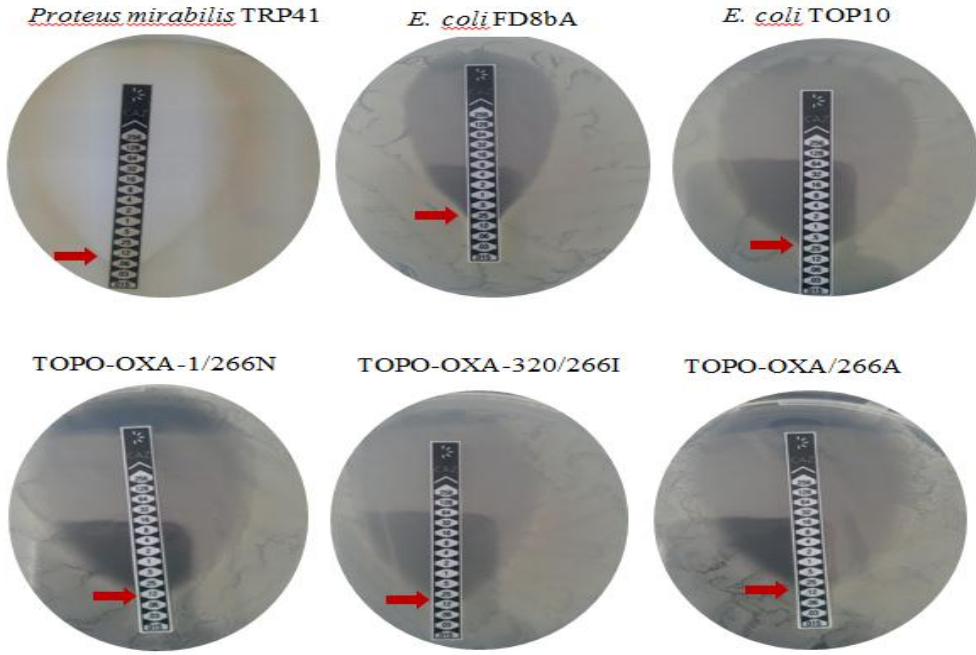
Şekil 9. Sefoksitin antibiyotiği MİK sonuçları.

Üçüncü kuşak sefalosporinlerinden olan sefotaksim için OXA-266A'nın MİK değeri yaklaşık OXA-320'nin 5,93, OXA-1'in ise 2,96 katı olduğu görülmektedir. Sefotaksim antibiyotiği MİK sonucu Şekil 10' da verilmiştir.



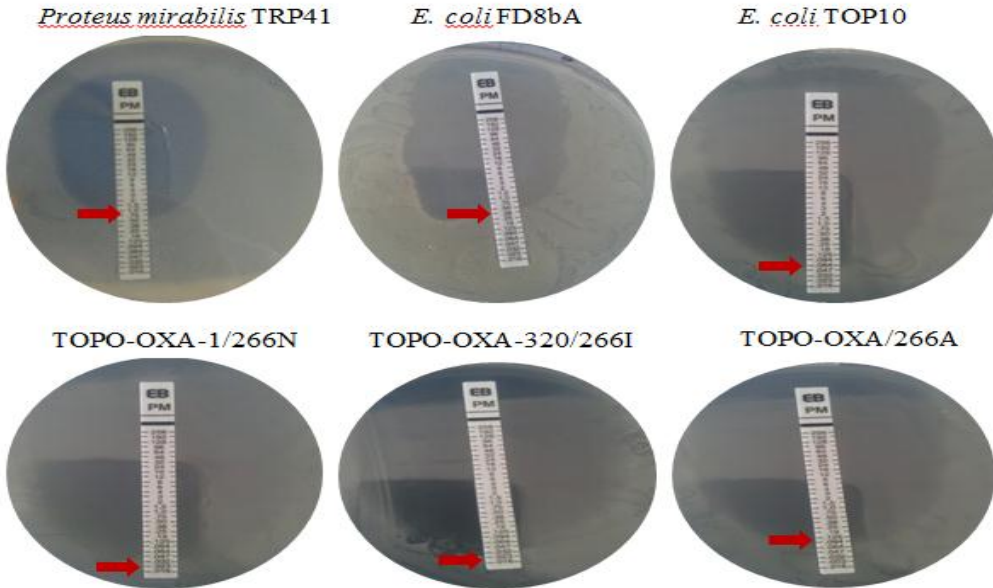
Şekil 10. Sefotaksim antibiyotiği MİK sonucu.

Yine üçüncü kuşak sefalosporinlerden olan seftazidim antibiyotiğine karşı OXA-1 ve OXA-320 MİK değerlerinin benzer olduğunu OXA-266A MİK değerinin ise bunların MİK değerinin 2 katı olduğunu görüyoruz. Seftazidim antibiyotiğinin MİK sonucu Şekil 11' de verilmiştir.



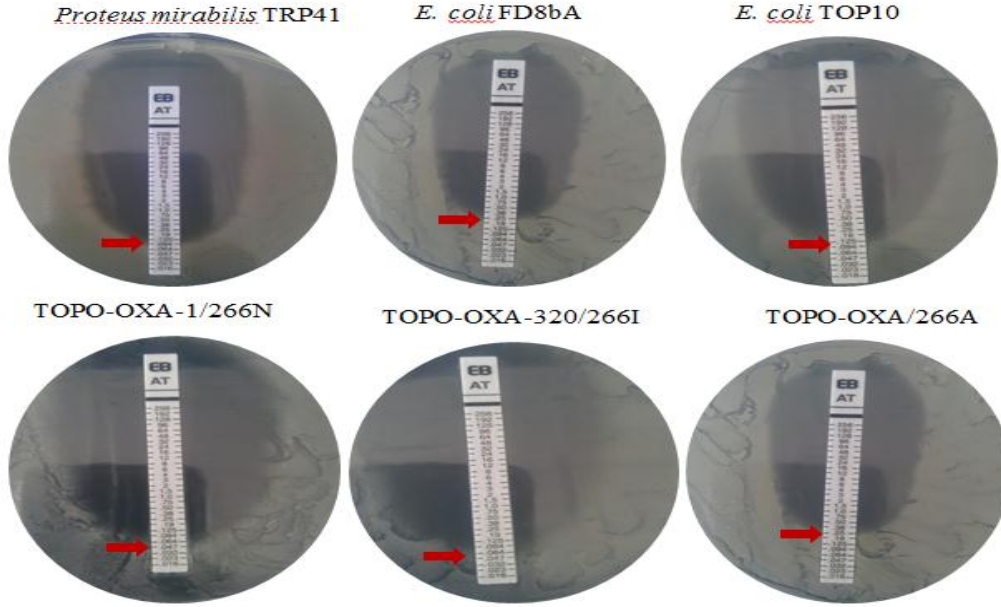
Şekil 11. Seftazidim antibiyotiginin MİK sonucu.

Dördüncü kuşak sefalosporinlerden olan sefepim için OXA-320’de en düşük MİK değeri gözlenmiştir. OXA-1’de MİK değeri OXA-320 MİK değerinin yaklaşık 2,8 katı olduğu OXA-266A MİK değerinin ise yaklaşık 4 katı olduğu görülmektedir. Sefepim antibiyotiginin MİK sonucu Şekil 12’ de verilmiştir.



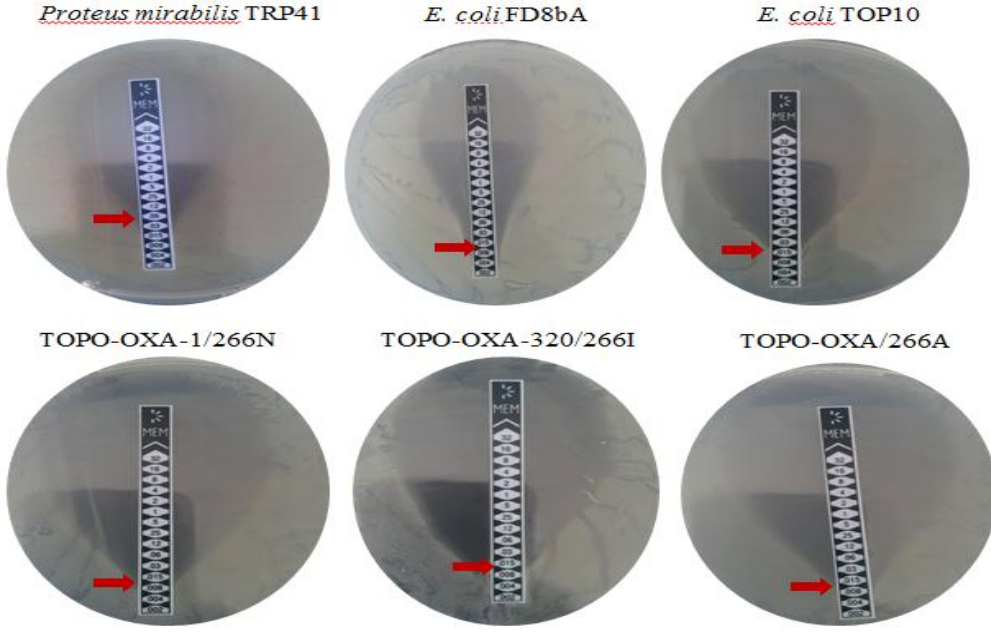
Şekil 12. Sefepim antibiyotiginin MİK sonucu.

Monobaktam grubundan olan aztreonam için OXA-320 ve OXA-266A için görülen MİK değerlerinin OXA-1 MİK değerinin sırasıyla yaklaşık 1,5 ve 2 katı olduğu görülmektedir. Aztreonam antibiyotığının MİK sonuçları Şekil 13’ te verilmiştir.



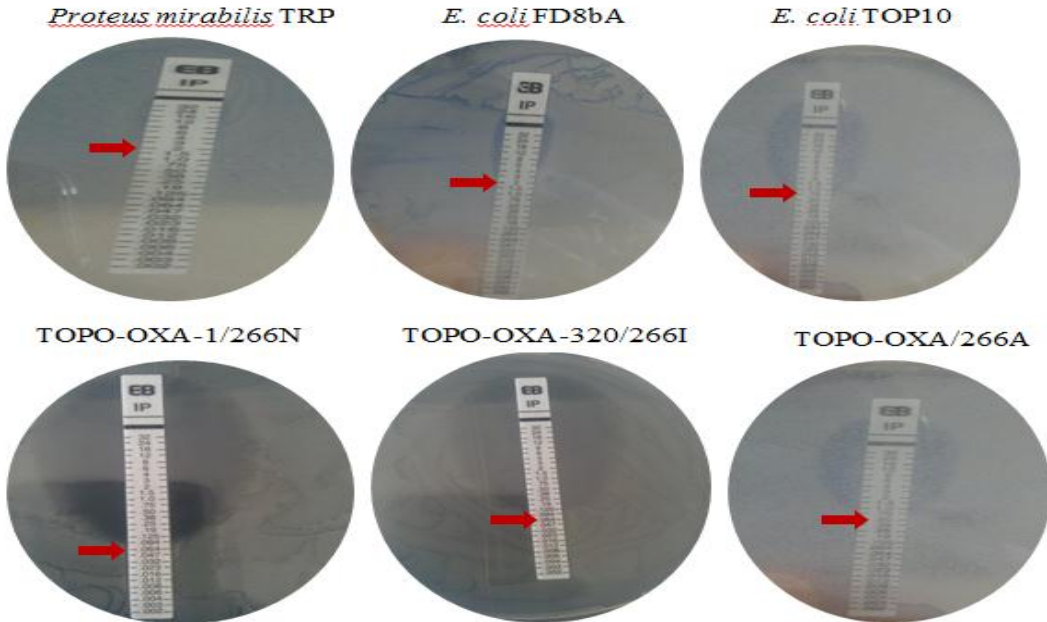
Şekil 13. Aztreonam antibiyotığının MİK sonucu.

Karbapenem grubundan olan meropenem için OXA-1 ve OXA-266A MİK değerlerinin aynı olduğu, OXA-320 MİK değerinin ise OXA-1’e göre artış gösterdiğini görüyoruz. Meropenem antibiyotığının MİK sonucu Şekil 14’ de verilmiştir.

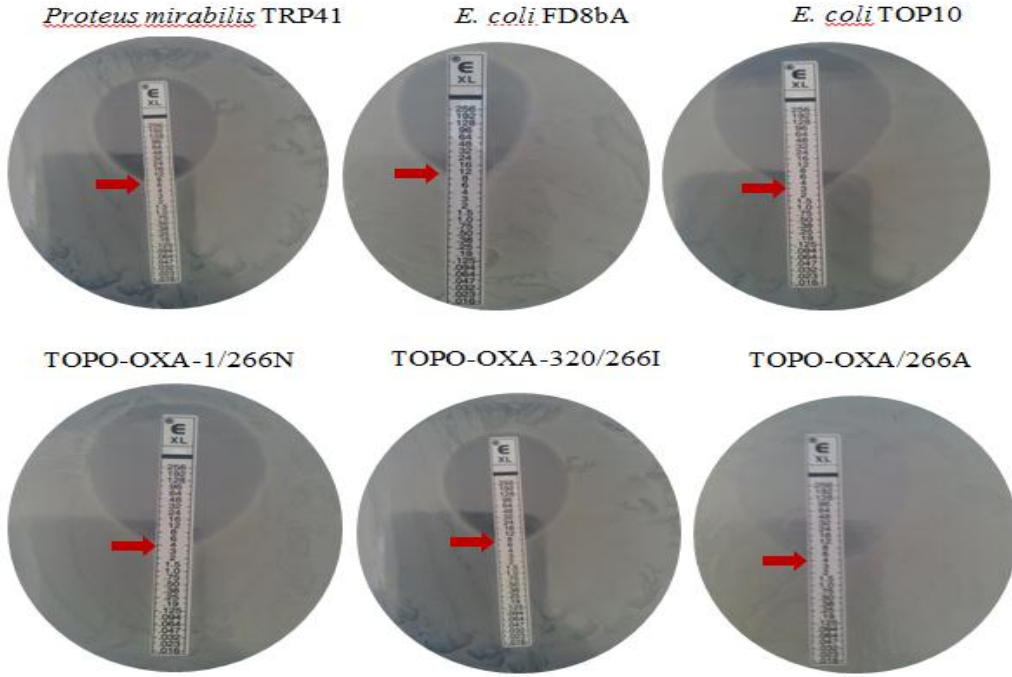


Şekil 14. Meropenem antibiyotiğinin MİK sonucu.

Yine karbapenem grubundan olan imipenem için OXA-1 MİK değeri ile kıyaslandığında OXA-320 için MİK değeri yaklaşık 1,3 katına OXA-266'da ise yaklaşık 2,6 katına çıktığı görülmektedir. İmipenem antibiyotiğinin MİK sonucu Şekil 15' de verilmiştir.

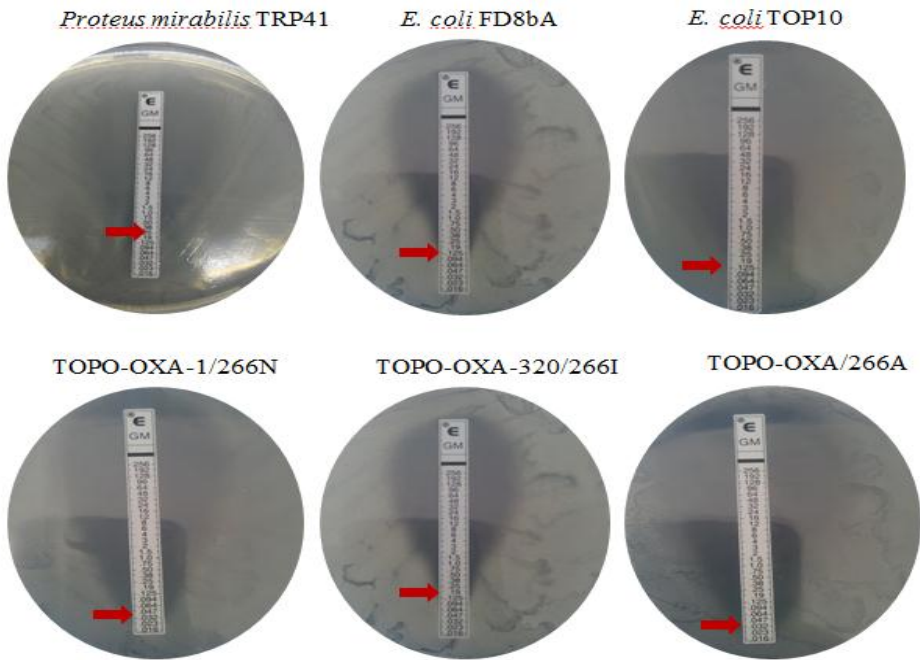


Şekil 15. İmipenem antibiyotiğinin MİK sonucu.



Şekil 17. Amoksisilin/klavulanik asit MİK sonucu.

Aminoglikozid grubundan olan gentamisin için MİK değerlerinin üç enzimi barındıran *E. coli* hücreleri için aynı olduğu belirlendi. Gentamisin antibiyotığının MİK sonucu Şekil 18’ de verilmiştir.



Şekil 18. Gentamisin antibiyotığının MİK sonucu.

3.3. OXA Varyantlarının VITEK Sonuçlarının Analizi

Antibiyotik duyarlılık testi için; VITEK sistemi kullanılarak ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, sefuroksim, sefuroksim aksetil, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefepim, ertapenem, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, tobramisin, siprofloksasin, tigesiklin, kolistin, trimetoprim/sülfametaksazol antibiyotiklerine bakıldı. OXA1-TOPO100, OXA320-TOPO100 ve 266A-TOPO100 örneklerinin ampisilin antibiyotiğine dirençli, amoksisilin/klavulanik asit antibiyotiğine OXA320-TOPO100 örneği dirençli, OXA1-TOPO100 örneği orta duyarlı, 266A-TOPO100 örneğinin ise duyarlı olduğu görülmüş, piperasilin/tazobaktam antibiyotiğine OXA320-TOPO100 ve *P. mirabilis* TRP41 örneğinin orta duyarlı, *E. coli* TOP10 örneğinin dirençli olduğu görülmüştür.

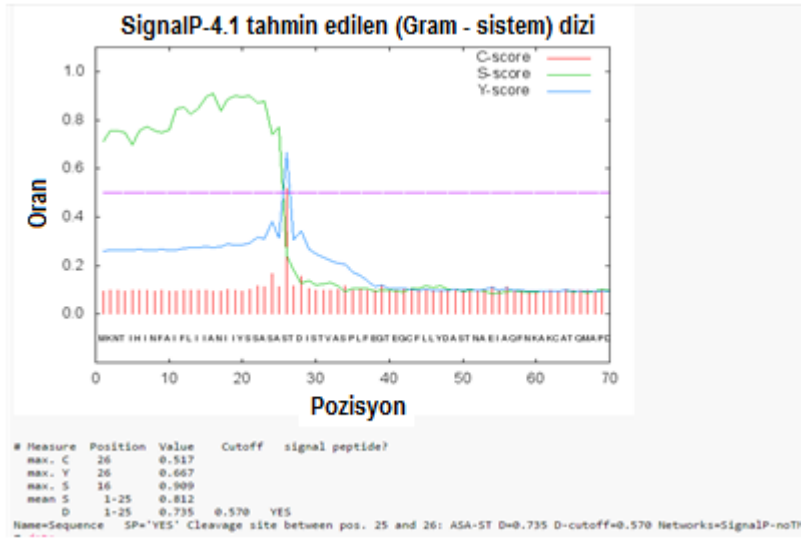
Tablo 15. Çalışma kapsamında farklı hücrelerde ifadelenen OXA varyantlarının VITEK sonuçları.

Duyarlılık Bilgileri	OXA1-TOPO100		OXA320-TOPO100		266A-TOPO100		<i>P.mirabilis</i> TRP41 <i>bla</i> _{OXA-320}		<i>E. coli</i> FD8bA <i>bla</i> _{OXA-1}		<i>E.coli</i> TOP10	
	MİK	Y	MİK	Y	MİK	Y	MİK	Y	MİK	Y	MİK	Y
Antimikrobiyal												
Ampisilin	>=32	R	>=32	R	>=32	R	B	B	B	B	B	B
Amoksisilin/Klavulanik asit	16	I	>=32	R	4	S	B	B	B	B	B	B
Piperasilin/Tazobactam	<=4	S	64	I	<=4	S	8	I	<=4	S	1,5	S
Sefuroksim	4	S	4	S	4	S	B	B	B	B	B	B
Sefuroksim Aksetil	4	S	4	S	4	S	B	B	B	B	B	B
Sefoksitin	<=4	S	<=4	S	<=4	S	B	B	B	B	B	B
Sefotaksim	<=1	S	<=1	S	<=1	S	B	B	B	B	B	B
Seftazidim	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	I	<=1	S	<=1	I
Sefepim	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	I	<=1	S	<=1	I
Ertapenem	<=0,5	S	<=0,5	S	<=0,5	S	B	B	B	B	B	B
İmipenem	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	1	S	<=0,25	S	<=0,25	S
Meropenem	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S
Amikasin	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S
Gentamisin	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	S
Tobramisin	<=1	S	<=1	S	<=1	S	B	B	B	B	B	B
Siprofloksasin	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S	<=0,25	S
Tigesiklin	<=0,5	S	<=0,5	S	<=0,5	S	2	R	<=0,5	S	<=0,5	S
Kolistin	<=0,5	S	<=0,5	S	<=0,5	S	>=16	R	<=0,5	S	<=0,5	S
Trimetoprim/Sülfametaksazol	<=20	S	<=20	S	<=20	S	>=320	R	<=20	S	<=20	S

Y; yorum, R; dirençli, I; orta duyarlı, S; duyarlı, B; bakılmadı

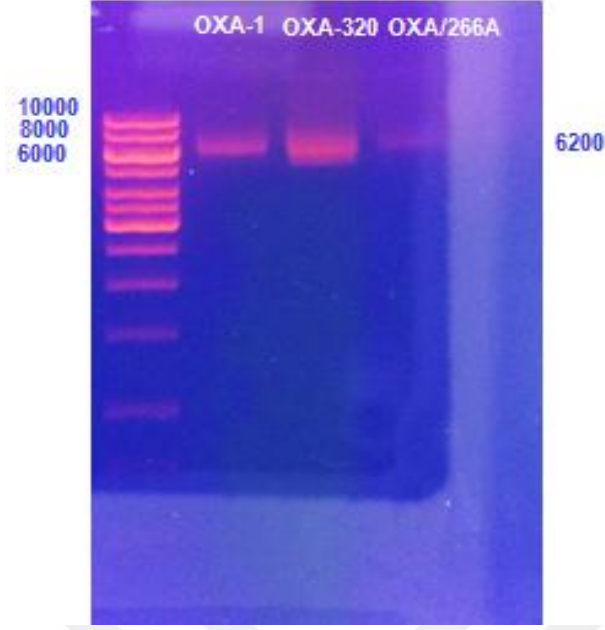
3.4. *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} Alellerinin pET28a Vektörüne Klonlanması ve Mutasyonlar

OXA-1 proteininin SignalP-4.1 programı kullanarak sinyal dizisi belirlendi (Şekil 19) ve proteinin sinyal sırası dışında kalacak şekilde primer dizayn edilerek *bla*_{OXA-1} ve *bla*_{OXA-320} geni PZR'da çoğaltıldı ve pET28a ekspresyon vektörüne klonlandı.



Şekil 19. OXA-1 proteininin sinyal dizisi.

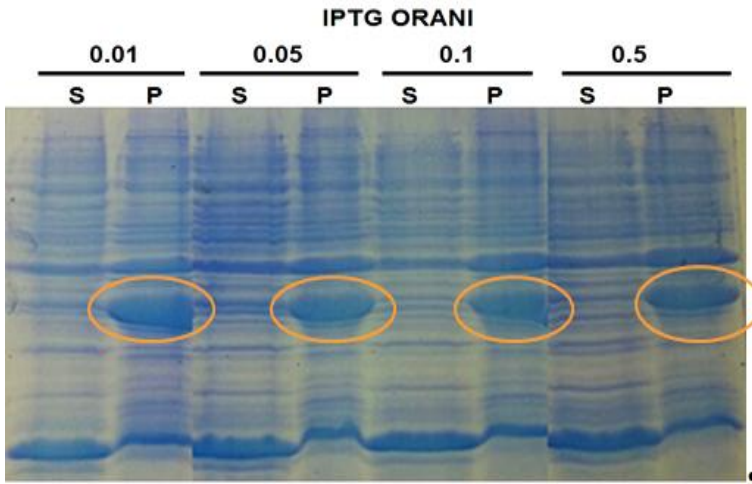
Klonlanan örnekler DNA dizi analizine gönderildi ve örnekler doğrulandı. Doğrulan OXA-1 aleli üzerinden 266. pozisyonda yönlendirilmiş mutasyon yapıldı. pET28a ekspresyon vektörüne klonlanan örnekler marker ile yürütüldü (Şekil 20).



Şekil 20. pET28a ekspresyon vektörüne klonlanan örneklerin markır ile yürütülmesi.

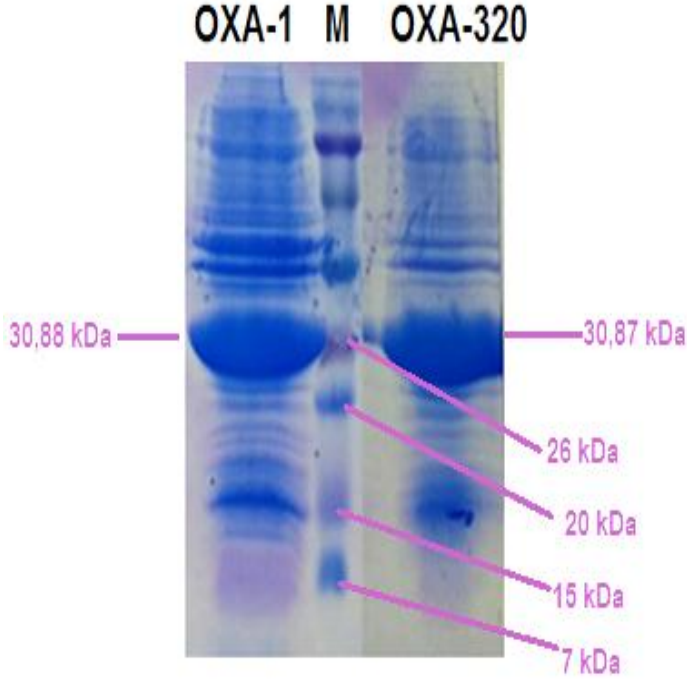
3.5. Rekombinant Proteinlerin Üretilmesi ve Saflaştırılması

bla_{OXA-1}' in ekspresyonunun olup olmadığını gözlemlemek ve ekspresyon şartlarını belirlemek için farklı sıcaklıklarda (28 °C ve 37 °C) ve farklı konsantrasyonlarda IPTG (0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM ve 1 mM) deneyler yapıldı. Şekil 21' de farklı IPTG oranlarında 37 °C' de 5 saat boyunca indüklenme yapıldı ve SDS-Page görüntüsü verilmiştir.



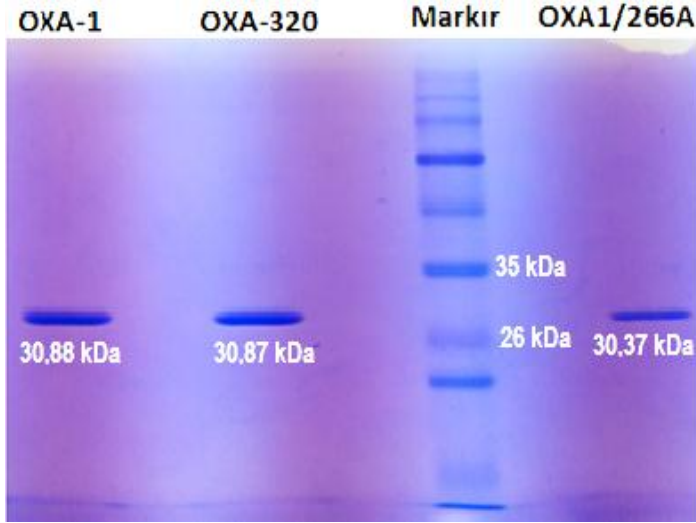
Şekil 21. Farklı IPTG oranlarında *bla_{OXA-1}*'in SDS-Page görüntüsü.

Ekspresyonun en iyi gözlendiği şartlardan 28 °C de 5 saat boyunca 0,01 mM IPTG ile indüklenerek OXA-1 ve OXA-320'nin supernatantları SDS-Page jel elektroforezinde markır ile yürütülmüştür (Şekil 22).



Şekil 22. OXA-1 ve OXA-320 alellerinin SDS-Page görüntüsü.

Ekspresyonu yapılan OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A proteinleri Ni-afiniti kromotografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırılan proteinler SDS-Page jel elektroforezinde sırasıyla OXA-1, OXA-320, markır ve OXA1/266A şeklinde yürütülerek Şekil 23' de verilmiştir.



Şekil 23. Saflaştırılan OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A örneklerinin markır ile yürütülmesi.

3.6. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A proteinleri Ni-afiniti kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra moleküler ağırlıkları ve coefficient değerleri Expasy Translate ProtParam programıyla elde edildi. Bu değerler kullanılarak enzimlerin konsantrasyonları nano-drop cihazı kullanılarak belirlendi. OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A enzimlerinin moleküler ağırlıkları coefficients değerleri ve konsantrasyonları Tablo 16’ da verilmiştir.

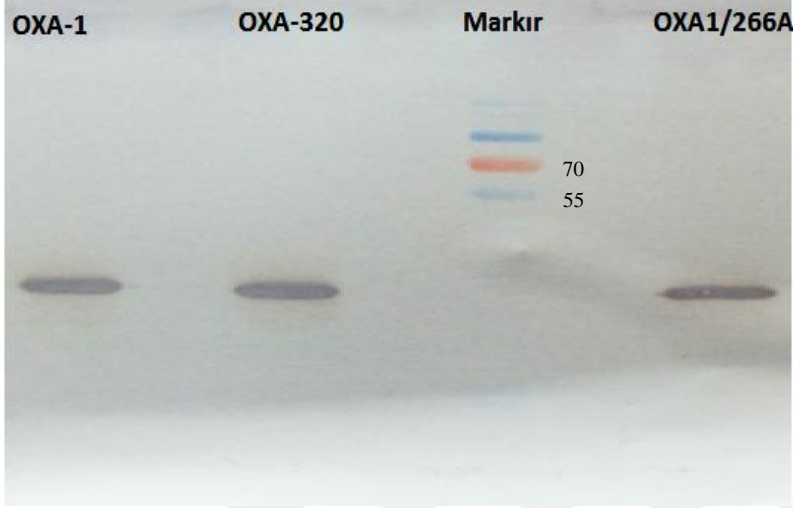
Tablo 16. OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A enzimlerinin moleküler ağırlıkları coefficients değerleri ve konsantrasyonları.

Protein	mg/ml	MolekülerAğırlık (kDa)	Extinction coefficients	Konsantrasyon (mM)
OXA1/266N	0,8	30,88	43,55	25,90
OXA320/266I	1,3	30,87	43,55	42,11
OXA/266A	0,9	30,37	43,55	29,63

3.7. Rekombinant Protein İfadenmesinin Western Blotlama Analizi

pET28a ekspresyon vektörüne klonlanarak rekombinant olarak üretilip saflaştırılan OXA-1, OXA-320 ve OXA-1 aleli üzerinden 266. pozisyonda yönlendirilmiş

mutasyonu gerçekleştiren hücrelerin antikor kullanarak proteinin varlığını ve büyüklüğünü göstermek amacıyla western blotlama analizi gerçekleştirildi. Western blotlama analizi sonucu proteinler membrana geçmiş ve görüntüsü Şekil 24'te verilmiştir.



Şekil 24. OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A örneklerinin western blotlama analizi sonucu.

3.8. Saf Proteinlerin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

OXA-1, OXA-320 ve OXA-1/266A proteinleri rekombinant olarak üretilip saflaştırıldıktan sonra konsantrasyonları belirlendi. Proteinlerin konsantrasyonları ve moleküler ağırlıkları kullanılarak molarite cinsinden değerleri hesaplandı.

OXA-1, OXA-320 ve OXA-1/266A enzimlerinin β -laktam antibiyotiklere karşı aktivitelerinin belirlenebilmesi için 7 ayrı antibiyotik kullanıldı. İlk olarak her bir enzimin her substrata karşı en iyi aktivite gösterdiği konsantrasyon belirlendi. OXA-1, OXA-320 ve OXA-1/266A enzimleri seftazidimi; 0,2 μ M konsantrasyonda, meropenem ve imipenemi 2 μ M konsantrasyonda, sefepimi 1,5 μ M konsantrasyonda, benzilpenisilini 0,2 μ M konsantrasyonda OXA-1, OXA-320 enzimlerini ise sefalotini 1,62 μ M ve OXA-1/266A sefalotini 0,81 μ M konsantrasyonda, son olarak sefotaksim substratı için OXA-1 enzimi 1,5 μ M, OXA-320 enzimi için 1,62 μ M ve OXA-1/266A enzimi için 0,81 μ M reaksiyon enzim konsantrasyonları kullanıldı. Yapılan kinetik deneylerinde elde edilen veriler kullanılan her substrat ve enzim için Michaelis-Menten

grafikleri çizildi. OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A örneklerinin kinetik sonuçları Tablo 17’ de verilmiştir.

Tablo 17. OXA1/266N, OXA320/266I ve OXA/266A örneklerinin kinetik sonuçları.

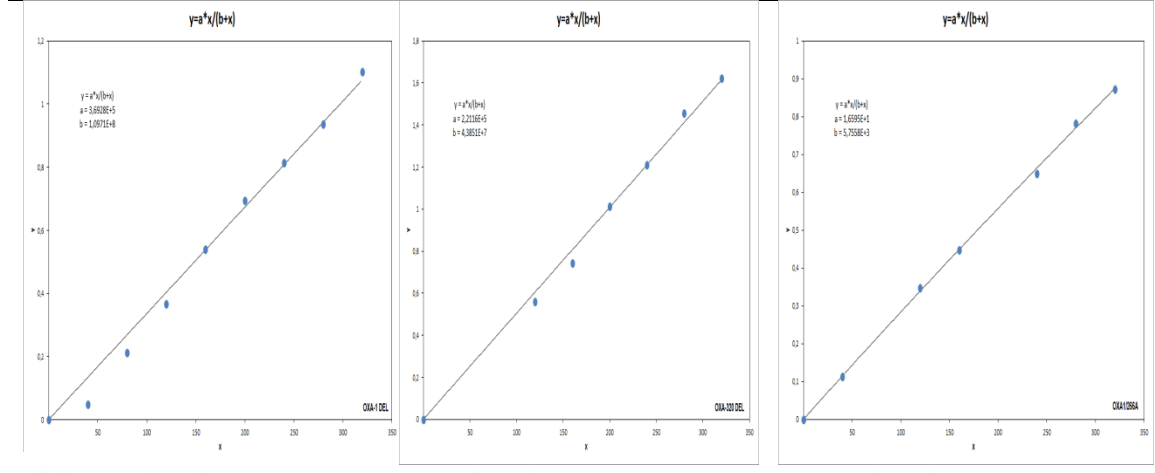
Enzim		Substrat						
		Benzil penisilin	İmipenem	Meropenem	Sefalotin	Sefotaksim	Seftazidim	Sefepim
OXA-1	K_m (μM)	>20000	19,3	HY	79,6	514	HY	>20000
	k_{cat} (s^{-1})	-	0,026	HY	0,09	0,4	HY	-
	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)	-	0,0013	HY	0,001	0,0008	HY	-
OXA-320	K_m (μM)	>20000	24,8	HY	402	568	HY	>20000
	k_{cat} (s^{-1})	-	0,025	HY	0,96	1,2	HY	-
	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)	-	0,001	HY	0,002	0,002	HY	-
OXA1/266A	K_m (μM)	5750	14	HY	39,5	154	HY	1954,7
	k_{cat} (s^{-1})	82,5	0,0127	HY	0,073	0,25	HY	0,946
	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)	0,014	0,0009	HY	0,002	0,002	HY	2066,3

HY: Hidroliz yok.

OXA-1, OXA-320 ve OXA1/266A enzimlerinin β -laktam antibiyotikleri hidroliz etmeleri açısından aralarında büyük farkların olmadığı gözlemlendi. Üç enzimin de, meropenem ve seftazidimi substratlarını hidroliz etmedikleri tespit edildi. Benzilpenisilin ve sefepim antibiyotiklerini ise az hidroliz ettikleri görüldü. Genel olarak bakılacak olursa 5 substratın içinden en iyi sefalotini hidroliz ettiği görülmektedir.

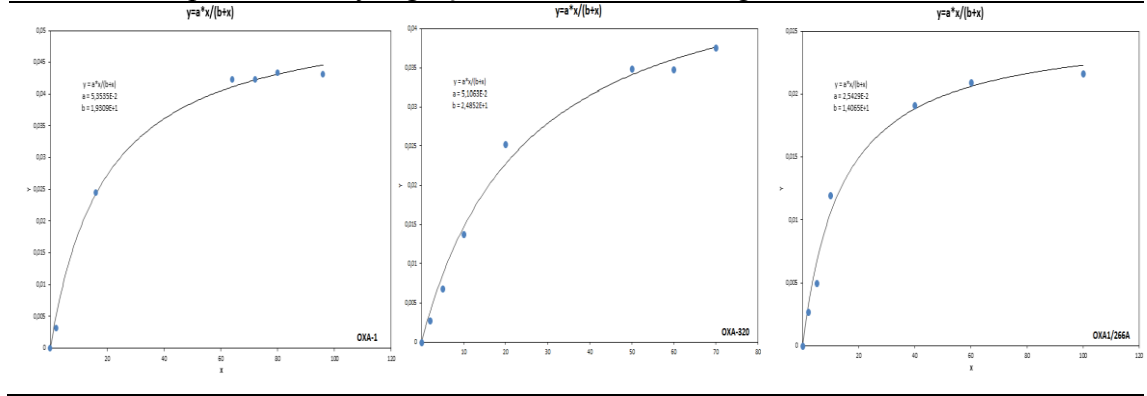
Benzilpenisilin antibiyotiğine karşı en yüksek aktivite, 5750 μM K_m ile OXA1/266A enzimi gösterirken, OXA-1 ve OXA-320 enzimleri için >20000’ den büyük k_m değeri göstermektedir. Enzimin bir saniye içinde substratı ne kadar ürüne dönüştürdüğü k_{cat} (turnover sayısı) imipenem substratı için en yüksek k_{cat} (82,5) OXA1/266A enzimi gösterdi. Her 3 enzimin benzilpenisilin substratı için Michaelis–Menten grafikleri Tablo 18’ de verilmiştir.

Tablo 18. Benzilpenisilin antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.



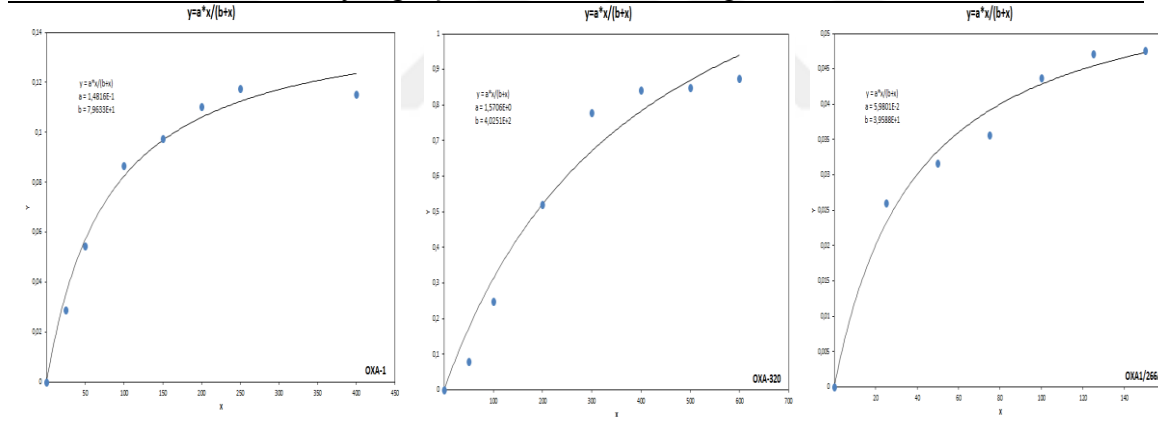
İmipeneme karşı en yüksek afinite 14 μM K_m ile OXA1/266A enzimi gösterirken, 24,8 μM K_m ile en düşük afiniteyi OXA-320 enzimi göstermektedir. Enzimin bir saniye içinde substratı ne kadar ürüne dönüştürdüğü k_{cat} (turnover sayısı) imipenem substratı için en yüksek k_{cat} ($0,026 \text{ s}^{-1}$) OXA-1 enzimi gösterirken, en düşük k_{cat} ($0,0127 \text{ s}^{-1}$) OXA-1/266A enziminin gösterdiği tespit edildi. Her 3 enzimin imipenem substratı için Michaelis–Menten grafikleri Tablo 19' de verilmiştir.

Tablo 19. İmipenem antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri



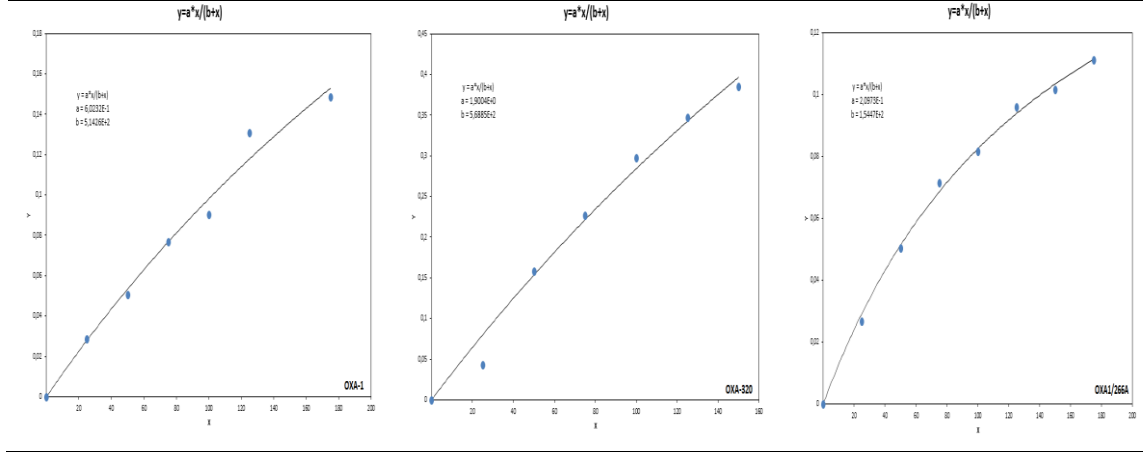
Sefalotin antibiyotiğine en yüksek afinite $39,5 \mu\text{M}$ K_m ile OXA1/266A enzimi iken en düşük afiniteyi $402 \mu\text{M}$ K_m ile OXA-320 enziminin gösterdiği tespit edildi. Sefalotin substratı için en yüksek k_{cat} ($0,96 \text{ s}^{-1}$) OXA-320 enzimi gösterirken en düşük k_{cat} ($0,073 \text{ s}^{-1}$) OXA-1/266A enziminin gösterdiği tespit edildi. Her 3 enzimin sefalotin substratı için Michaelis–Menten grafikleri Tablo 20’ de verilmiştir.

Tablo 20. Sefalotin antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.



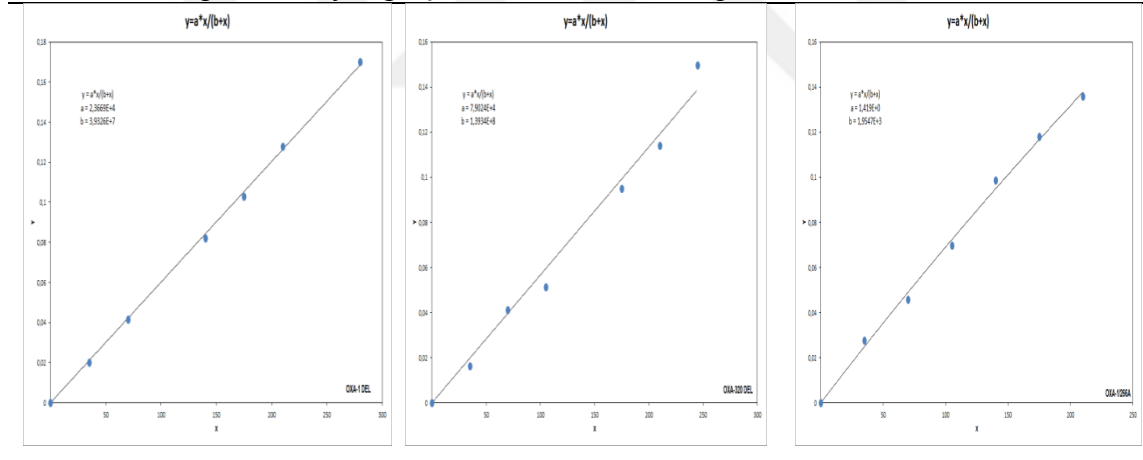
Sefotaksim antibiyotiğine en yüksek afinite $154 \mu\text{M}$ K_m ile OXA1/266A enzimi iken en düşük afinite $568 \mu\text{M}$ K_m ile OXA-320 enziminin gösterdiği tespit edildi. Sefotaksim substratı için en yüksek k_{cat} ($1,2 \text{ s}^{-1}$) OXA-320 enzimi gösterirken en düşük k_{cat} ($0,25 \text{ s}^{-1}$) OXA-1/266A enziminin gösterdiği tespit edildi. Her 3 enzimin sefotaksim substratı için Michaelis–Menten grafikleri Tablo 21’ de verilmiştir.

Tablo 21. Sefotaksim antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.



Sefepim antibiyotiğine en yüksek afinite 1954,7 μM K_m ile OXA1/266A enzimi iken OXA-1 ve OXA-320 enzimlerinde K_m değerleri $>20000'$ den büyük görüldü. Sefepim substratı için en yüksek k_{cat} ($0,946\text{s}^{-1}$) OXA1/266A enzimi gösterdi. Her 3 enzimin sefepim substratı için Michaelis-Menten grafikleri Tablo 22' de verilmiştir.

Tablo 22. Sefepim antibiyotiği için Michaelis-Menten grafikleri.



4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Antibiyotiklerin uygunsuz ve bilinçsiz kullanımı ile gerek toplum kökenli gerekse nozokomiyal kökenli dirençli mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlarda ciddi sağaltım sorunları yaşanmaktadır. Bir antibiyotiğe dirençli olan etken az sürede birden çok ilaca karşı da direnç kazanmakta ve bu çoğul dirençli mikroorganizmalar hızla ortama yayılmaktadır (Yüce, 2001).

Rize hastanelerinden izole edilip sekanslama yöntemi kullanılarak, OXA-320 β -laktamaz saptanmıştır (Cicek vd., 2014). OXA tipi β -laktamazlarla ilgili çalışmalar daha çok Türkiye (Danel vd., 1999; Aktaş vd., 2005) ve Fransa'dan bildirilmiştir (Naas vd., 2008). Dünyada ilk OXA-48 enzimi imipeneme dirençli bir *K.pneumoniae* suşunda bildirilmiştir (Poirel vd., 2004). Son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesinde OXA-48 enzimi, ülkemizde ve dünyada giderek artan oranlarda bildirilmektedir (Kilic vd., 2011). Her yeni enzim karakterizasyon çalışması antibiyotik direnç konusunda yeni bilgiler edinilmesine büyük katkılar sağlayacaktır. OXA-229 β -laktamaz enzimi için kinetik çalışmalar yapılarak kinetik parametreleri belirlenmiştir (Bonnin vd., 2012). Yine β -laktamaz enzimlerinden OXA-163 ve OXA-48'in kinetik karakterizasyonu yapılmıştır (Poirel vd., 2011). Hastane infeksiyonlarında en sık kullandığımız antibiyotik grubunun β -laktamlar olduğu düşünülürse β -laktamazların önemi daha da iyi anlaşılabilir.

Daha önceki yapılan çalışmalarda, Rize hastanelerinden izole edilmiş ve ciddi oranda hastalık sebebi olan bazı *E. coli* (bla_{OXA-1} -OXA-30 ile aynı aminoasit dizilimine sahiptir) (Çolakoğlu vd., 2010) ve *P. mirabilis* ($bla_{OXA-320}$) (Cicek vd., 2014) izolatlarında D-sınıfı β -laktamazlardan iki alele rastlanılmıştır. bla_{OXA-1} alleli daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olsa da, $bla_{OXA-320}$ aleli ilk kez Cicek vd., tarafından *P. mirabilis* de tanımlanmıştır. Bu iki alel arasında 266. pozisyonda tek bir aminoasitlik değişim vardır (Şekil 25). Moleküler yöntemler ile çalışmak genlerin tanımlanmasını ve takibini kolaylaştırır. İki enzim arasındaki benzerlik ve türevlenişlerin aydınlatılmasında kullanılmaktadırlar. Yüksek lisans çalışması kapsamında, tanımlaması yeni yapılan $bla_{OXA-320}$ genin kinetik ve protein özelliklerinin karşılaştırmalı olarak OXA-1 enzimi ile ele alınması ve bu yeni direnç geninin fiziksel karakterizasyonu ortaya çıkarılarak,

dünyada hızla değişen antibiyotik direncine yönelik olarak literatüre katkı sağlayacağı yapılan çalışmayla gösterilmek istenmiştir.



Şekil 25. OXA-1 ve OXA-320 varyantlarının aminoasit dizilerinin karşılaştırılması ve iki enzim varyantı arasında 266. pozisyondaki aminoasit varyasyonu (Cicek vd., 2014).

Yüksek lisans tezi olarak yapılan bu çalışmada OXA-1, OXA-320 alelleri ve OXA-A²⁶⁶ yönlendirilmiş mutasyon örneği, *Proteus mirabilis* TRP41 suşu, *E.coli* FD8bA ve *E.coli* TOP10 MIK değerlerine E-test yöntemi ile bakılmış ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. OXA-1, OXA-320 alelleri ve OXA-A²⁶⁶ yönlendirilmiş mutasyon örneğinin rekombinant olarak protein üretimi gerçekleştirilmiş, üretilen proteinlerin kinetik karakterizasyonu yapılmış ve karşılaştırmalı olarak kinetik karakterizasyonu değerlendirilmiştir.

Bu yüksek lisans çalışmasında, MIK bulgularına göre; TOPO/OXA-A²⁶⁶ yönlendirilmiş mutasyonu β - laktamaz inhibitörü olan tikarsilin/klavulanik asite orta duyarlı olduğu, TOPO-OXA-1, TOPO-OXA-320, TOPO-OXA-A²⁶⁶ varyantlarının üreidopenisilinler grubunda yer alan piperasilin antibiyotiğine dirençli, TOPO/OXA-A²⁶⁶ yönlendirilmiş mutasyon örneğinin piperasilin/tazobaktam kombinasyonuna dirençli, *Proteus mirabilis* TRP41 suşunun dirençli, *E.coli* FD8bA suşunun karbapenem grubunda yer alan imipenem antibiyotiğine orta duyarlı, *E.coli* FD8bA, TOPO/OXA-A²⁶⁶, TOPO-OXA-320 ve TOPO/OXA-A²⁶⁶ örnekleri 3. geniş spektrumlu penisilin grubunda yer alan amoksisilin antibiyotiğine dirençli ve *E.coli* FD8bA suşu amoksisilin/klavulanik asit kombinasyonuna orta duyarlı olduğu görülmüştür. Sefalosporin grubunda yer alan sefoksitin, sefotaksim, seftazidim ve sefepim antibiyotiklerine ve karbapenem grubundan olan meropenem antibiyotiğine bütün örneklerin duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Genel olarak OXA alelleri β -laktam substratlara karşı katalitik etkinliklerinde düşük düzeyde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bütün alellerin meropenem ve seftazidim substratlarını hidroliz edemediği görülmüştür. Literatür seftazidim antibiyotikğine karşı kinetik aktivitesi yönünden incelendiğinde örnek olarak OXA-232 ve OXA-181 varyantları için hidroliz aktivitesinin olmadığı, OXA-48 varyantının ise çok düşük aktivite ile hidroliz ettiği gözlenmiştir. Benzer şekilde literatür incelendiğinde meropenem antibiyotikğine karşı ilgisinin ve hidroliz aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmektedir (Potron vd., 2013). Bu sonuç bize OXA varyant tipine göre meropenem ve seftazidim antibiyotiklerinin hidrolizinde değişiklik olduğunu göstermektedir.

Sefepim ve benzilpenisilin için ise kinetik değerler hesaplanamayacak kadar düşük hidroliz etkisi gözlenmiştir. Örnek olarak sefepim için literatür incelendiğinde antibiyotikğine karşı OXA-229 ve OXA-58 varyantlarının, bu çalışmada kullanılan OXA-1 ve OXA-320 varyantları gibi hidroliz yeteneğinin olmadığı görülmektedir (Bonnin vd., 2012; Poirel vd., 2005). Ancak OXA-A²⁶⁶ varyantının OXA-1 ve OXA-320 varyantına göre zayıf da olsa hidroliz aktivitesinin olduğu gözlenmiştir. Bunun ile beraber OXA-48 varyantının sefepim antibiyotikğine karşı yüksek ilgisinin olduğu ve K_m değerinin ise 160 μ M olarak belirlendiği gösterilmiştir (Poirel vd., 2004). Buda herhangi bir antibiyotikinin hidrolizlenme özelliğinin OXA varyant tipine göre değiştiği ve klinik açıdan hangi OXA varyantı ile karşılaşıldığının bilinmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Çalışma kapsamında kullanılan OXA-320 ve OXA-1 varyantı ile OXA-A²⁶⁶ varyantının en iyi imipenem, sefolathin ve sefotaksim antibiyotiklerini hidroliz ettiği gözlenmiştir. Literatürde farklı OXA varyantları için bu üç antibiyotiğe karşı farklı aktivite değerleri verilmiştir (Bonnin vd., 2012; Potron vd., 2013). Çalışma kapsamında kullanılan bu üç enzim için imipenem, sefolathin ve sefotaksim için en yüksek ilginin A²⁶⁶ varyantında gözlenmiştir. Kinetik değerler için elde edilen sonuçların aynı zamanda E-test sonuçları ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

5. ÖNERİLER

Antibiyotiklere karşı gelişen direnç her gün artmakta ve bununla beraber antibiyotik direnci dünyamızın önemli bir problemi haline gelmektedir. Bu sebepten dolayı enzimlerin karakteristik özelliklerinin ortaya konması ve diğer alelleri ile farklılık ve benzerliklerin karşılaştırılması, insan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Bundan dolayı OXA-varyantlarında bazı antibiyotiklere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarında değişime sahip olanların, yine aynı antibiyotiklere karşı kinetik parametreleri belirlenebilir. OXA-320 enziminin üç boyutlu yapısı, kristalografik yöntemler ile çalışılabilir.

Ayrıca aminoasit değişimlerinin farklı substratlara karşı afinite üzerine etkileri moleküler modelleme yöntemiyle belirlenerek, kinetik analiz sonuçları ve MIK değerleriyle karşılaştırılabilir. Yine farklı doğal veya sentetik birleşikler kullanılarak OXA varyantları üzerinde inhibisyon çalışmalarına devam edilebilir.

KAYNAKLAR

- Akın, B., Varol, C. ve Çalık, F., 2013.** Antibiyotiklerin ve Antibiyotik Direncinden Sorumlu Genlerin Gruplandırılması. Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Rize, Türkiye, 73 s., 2, 22, 24, 27, 28.
- Aktaş, Z., Poirel, L., Şalcıoğlu, M., Özcan, P. E., Midilli, K., Bal, Ç. and Nordmann, P., 2005.** PER-1- and OXA-10-like β -lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Istanbul, Turkey. Clin Microbiol Infect, 11, 193-198. DOI: 10,1111/j.1469-0691.2004.01067.x.
- Albayrak, G. T., 2008.** Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Çift Disk sinerji Testi ve Kombine Çift Disk Sinerji ile Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastahanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye, 64 s., 12-22.
- Bedir, S. K., 2006.** Bazı Klinik Bakterilerdeki Beta-Laktamazların Jel Elektroforetik Analizi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 42s., 1-15.
- Bonnin, R. A., Ocampo-Sosa, A. A., Poirel, L., Guet-Revillet, H. and Nordmann P., 2012.** Biochemical and Genetic Characterization of Carbapenem- Hydrolyzing β -Lactamase OXA-229 from *Acinetobacter bereziniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56, 3923-3927.
- Cicek, AC., Duzgun, A.O., Saral, A. And Sandalli, C., 2014.** Determination of a novel integron-located variant (*bla*_{OXA-320}) of Class D β -lactamase in *Proteus mirabilis*. Journal of. Basic Microbiology, 54(10), 1030-1035.
- Çiftçi, İ. H., 2011.** *Acinetobacter baumannii*' nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. Ankem Dergisi, 25(3), 196-207.
- Çolakoğlu, F., Özgümüş, O. B., Sandallı, C. Sevim, E. Ç. ve Karaoğlu, Ş. A., 2010.** Deniz Suyu Kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 Integron Gen Kasetleri ve Antibiyotik Direncinin Karakterizasyonu. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 40(2), 97-108.
- Dağlar, D. ve Öngüt, G., 2012.** Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1, 1-9.
- Danel, F., Hall, L. M. C., Duke, B., Gur, D. And Livermore, D. M., 1999.** OXA-17, a Further Extended-of OXA-10 β -Lactamase, Isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43,1362-1366.
- Demir, Y., 2013.** Karbapenemlere Dirençli *Enterobacteriaceae* üyesi Bakterilerde VIM, IMP, NDM-1, KPC ve OXA 48 Enzimlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi.

Gaziantep Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye, 100s., 8-20.

Düzgün, A. Ö., 2015. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında β -Laktamaz Direnç Genlerinin Taranması ve Yeni Bir Metallo- β -Laktamazın (VIM-38) Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 138 s., 1-10.

Gördebil, S., 2011. Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Direnç Genlerinin PCR ile Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Genotip Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 50s., 19-41.

Hamaçça, Ö., 2009. *Enterobacteriaceae* Ailesi Üyelerinde OXA Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazların Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, 40s., 3-12.

Kılıç, A., Aktaş, Z., Bedir, O., Gumral, R., Bulut, Y., Stratton, C., Tang, Y. and Basustaoglu, C., 2011. Identification and Characterization of OXA-48 Producing, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates in Turkey. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 41, 161-166. DOI: 0091-7370/11/0200-161.

Kurşun, E., 2008. Toplumda Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Salgılayan *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Suşlarının Etken Olduğu İnfeksiyon Hastalıklarındaki Risk Faktörlerinin ve GSBL Fekal Kolonizasyonu İçin Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi. Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 40 s., 6-13.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 42–52.

Öncül, O., 2002. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, Kasım 2002, 23-38.

Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V. and Nordmann P., 2004. Emergence of Oxacillinase Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 15-22. DOI: 10.1128/AAC.48.1.15–22.2004.

Poirel., L, Marque, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G. and Nordmann, P., 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial. Agents Chemother.* 49, 202–208.

Poirel, L., Castanheira, M., Carre'r, A., Rodriguez, C.P., Jones, R. N., Smayevsky, J. and Nordmann, P., 2011. OXA-163, an OXA-48 Related Class D β -Lactamase with Extended Activity Toward Expanded-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 2546-2551. DOI: 10.1128/AAC.00022-11.

Potron, A., Rondinaud, E., Poirel, L., Belmonte, O. and Boyer, S., 2013. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae, 41, 325-329.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1987. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 545.

Saradhi, P.N.B., 2012. Structural and biochemical investigation of Metallo- β -lactamases; In sights into the anti biotic binding sites. Doktora Tezi. Tromso Üniversitesi, Kimya Bölümü, Tromso, Norveç, 88s.

Sarı, A. N., 2014. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastahanesi' nde Kan Kültürlerinde Üremiş *Acinetobacter baumannii* suşlarında OXA-58 Tipi Karbapenemaz Üretiminin ve Moleküler Epidemiyolojisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 93s., 14-27.

Sykes, R.B., vd., 1981. Monocyclic β -lactam antibiotic produced by bacteria. *Nature*, 291, 489-91.

Torol, S., 2008. *Acinetobacter baumannii* Kökenli Beta-Laktamaz OXA-23 Geninin Klonlanması ve Enzim Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye, 57 s., 6-18.

URL-1, 2016. <http://www.biyolojiunlugu.com/bakteri-hucre-duvari-yapisi> (29Nisan 2016).

URL-2, 2016. <http://infek.med.ege.edu.tr/dersnotlari/betalaktam.pdf> (29Nisan 2016).

URL-3, 2016. <http://www.lahey.org/studies/other.asp> (29 Nisan 2016).

URL-4,

2016. https://en.wikipedia.org/wiki/Oxacillin#/media/File:Oxacillin_skeletal.svg (20Nisan2016).

URL-5,2016.<https://en.wikipedia.org/wiki/Cloxacillin#/media/File:Cloxacillin.svg>
(20Nisan2016).

URL-6, 2016.<http://www.lahey.org/studies/temtable.asp> (27 Nisan 2016).

URL-7, 2016.<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV> (27 Nisan 2016).

URL-8, 2016.<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (20 Mart 2016).

URL-9, 2016. <http://web.expasy.org/translate/> (20 Mart 2016).

Yapar, Ş. M., 2007. Hastahane Kökenli *Escherichia coli* İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. Uzmanlık Tezi. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trakya, Türkiye, 61 s., 3-13.

Yüce, A., 2001. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. Klimik Dergisi, 14, 41-46.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma ÇALIK, 08/03/1991 tarihinde Artvin' in Borçka ilçesinde doğdu. İlköğrenimini 2005 yılında Borçka ilçesinin Aralık Köyünde Meryem Acar İlköğretim Okulu' nda ve Lise öğretimini 2009 yılında Borçka ilçesinde Şehit Savaş Gedik Lisesinde tamamladı. 2009 yılında başladığı lisans eğitimini 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinde 2,93 derecesi ile tamamladı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. 2013-2014 eğitim-öğretim yılında pedagojik formasyon belgesi almaya hak kazanmıştır.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları

Çalik F., Sandalli C., "D Sınıfı β -laktamazlardan *bla*OXA-1 ve *bla*OXA-320 Varyantlarının Rekombinant Üretilmesi", 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015, ss.273-273

Çalik F., Uzun A., Sandalli C., "Comparision of MIC values of *bla*OXA-1 and *bla*OXA-320 variants grouped in Class D Beta lactamase", 7th Eurasia Congress of Infectious Disease, Tiflis, Gürcistan, 30 Eylül - 3 Ekim 2015, pp.284-284.

Kaya E.G.,Akyildiz E., Çopur Çiçek A., Çalik F., Timur D., Berk E., et al., "Klinik *Pseudomonas aeruginosa* Şuşlarında Metallo- β -laktamaz Direnç Gen Taşıyıcılığının Araştırılması", Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Afyon, Türkiye, 21-24 Ağustos 2015, ss.108-108.

Azer Özad Düzgün, Cemal Sandalli, Meryem İraz, Ayşegül Saral, Fatma Çalık, Ayşegül Çopur Çiçek. "Klebsiella pneumoniae Kökenli *bla*OXA-48 Genine Ait Yeni Bir Alelin Belirlenmesi". 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, Türkiye, 18-20 Nisan 2014.