

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Acinetobacter baumannii İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK
DİRENÇ GENLERİNİN TARANMASI, *bla*_{GES-22} VE *bla*_{OXA-66}
VARYANTLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

AYŞEGÜL SARAL

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. CEMAL SANDALLI

JÜRİ ÜYELERİ

PROF. DR. OSMAN BİROL ÖZGÜMÜŞ

DOÇ. DR. CELAL KURTULUŞ BURUK

DOÇ. DR. SERDAR ÜLKER

DOÇ. DR. ELİF SEVİM

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2015

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Acinetobacter baumannii* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ
GENLERİNİN TARANMASI, bla_{GES-22} VE bla_{OXA-66} VARYANTLARININ
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Doç. Dr. Cemal SANDALLI danışmanlığında, Ayşegül SARAL tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/12/2015 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ	
Üye :	Doç. Dr. Cemal SANDALLI	
Üye :	Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK	
Üye :	Doç. Dr. Serdar ÜLKER	
Üye :	Doç. Dr. Elif SEVİM	


Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, TÜBİTAK 2214-A-Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı, TÜBİTAK 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı, TÜBİTAK-113Z054 ve RTEÜ BAP Birimi 2013.102.03.12 tarafından sağlanan destek ile Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında ‘Doktora Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Doktora öğrenciliğimin her aşamasında değerli görüş ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam ve danışmanım sayın Doç. Dr. Cemal SANDALLI’ya en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında ve her türlü konuda bana destek olan arkadaşım Araş. Gör. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN’e teşekkürü bir borç bilirim. Klinik örnekleri izole eden, tanımlayan, duyarlılık profillerini belirleyen Yrd. Doç. Dr. Meryem IRAZ ve ekibine, klinik örneklerin elde edilmesinde yardımcı olan Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK’e, ve tüm R.T.E.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada enzim kinetik karakterizasyonun yapılabilmesi için her türlü desteği sağlayan Grand Valley State Üniversitesi, Moleküler ve Hücrel Biyoloji Laboratuvarı’ndan Dr. Dave LEONARD’a ve Cynthia M. JUNE’a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana her türlü desteği veren ve bugünlere gelmemde en büyük payı olan annem İlknur SARAL, babam Erdoğan SARAL ve sevgili kardeşlerim Özge SARAL ve Özlem SARAL’a en içten saygı, teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Ayşegül SARAL

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Antibiyotik Direnç Genlerinin Taranması, *bla*_{GES-22} ve *bla*_{OXA-66} Varyantlarının Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 29/12/15

Ayşegül SARAL

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

ÖZET

***Acinetobacter baumannii* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN TARANMASI, *bla*_{GES-22} VE *bla*_{OXA-66} VARYANTLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ayşegül SARAL

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

Bu doktora tezinde, 101 *Acinetobacter baumannii* klinik suşunda direncin genetik mekanizmaları çalışıldı. *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} ve *bla*_{OXA-58} benzeri genlerin tespiti için multipleks PZR kullanıldı. IS*Aba1*, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER-2}, *aac-3-Ia*, *aac-6'-Ib* ve *bla*_{NDM-1} genleri PZR ve baz dizin analizi ile tespit edildi. Multipleks PZR'da, tüm suşların *bla*_{OXA-51}, 79 suşun *bla*_{OXA-23} ve bir suşun *bla*_{OXA-40} taşıdığı tespit edildi. *bla*_{OXA-51} ve *bla*_{OXA-23} 79 suşa birlikte bulundu. IS*Aba1* elementi 81 suşa tespit edildi ve tüm durumlarda *bla*_{OXA-51}'in yukarı bölgesinde bulundu. GES tipi beta laktamazlar 24 suşa bulundu (16 suşa GES-11 ve 8 suşa GES-22). *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER-2}, ve *bla*_{NDM-1} genlerinin hiçbiri tespit edilmedi. *aac-3-Ia* ve *aac-6'Ib* genleri sırasıyla 13 ve 15 suşa tespit edildi. REP-PZR ile tüm suşlar 12 farklı grup altında toplandı. Türkiye'de *A. baumannii*'de GES-11 ve OXA-40 bulunması ilk kez rapor edildi. GES-22, GES-11'den bir amino asit substitüsyonu (M169L) ile farklılaşır. M169, sınıf A beta laktamazlarda substrat seçiciliğinde büyük etkileri olduğu bilinen omega halkasının bir parçası olduğundan GES-22 ifade edildi, saflaştırıldı ve kinetik olarak karakterize edildi. Bu çalışma, GES-11 ile karşılaştırıldığında GES-22'nin penisilinleri, sefotaksimi ve aztreonamı daha etkili hidroliz ettiğini seftazidime karşı etkinliğinin azaldığını gösterdi. Bunun yanı sıra, M169L substitüsyonu GES-22'nin klavulanik asit hidrolizinde daha etkili olmasına neden oldu. Bu sonuçların diğer sınıf A beta laktamazların homolog pozisyonlarında görülen diğer mutasyonlarına benzer olması metiyoninin sınıf A beta laktamazlarda substrat seçiciliğinde ve aktif bölge residülerinin sıralanmasında yapısal bir rol oynadığını düşündürdü. OXA-66 mutantları ifade edildi, saflaştırıldı ve kinetik olarak karakterize edildi. W222L, I129V, P130Q klinik mutasyonlarının OXA-66'da karbapenemlere karşı hidrolitik aktiviteyi arttırdığı gözlemlendi.

2015, 141 sayfa

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, GES-22, OXA-66, Mutasyon

ABSTRACT

SCREENING OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES ISOLATES OF *Acinetobacter baumannii*, MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VARIANTS OF *bla*_{GES-22} AND *bla*_{OXA-66}

Ayşegül SARAL

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

Genetic mechanisms of resistance were determined in clinical strains of 101 *Acinetobacter baumannii* in this PhD thesis. Multiplex PCR was used for detecting *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like} and *bla*_{OXA-58-like} genes. *ISAbal*, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER-2}, *aac-3-Ia*, *aac-6'-Ib* and *bla*_{NDM-1} genes were detected by PCR and sequencing. By multiplex PCR, all strains carried *bla*_{OXA-51}, 79 strains carried *bla*_{OXA-23} and one strain carried *bla*_{OXA-40}. *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} were found together in 79 strains. *ISAbal* element was detected in 81 strains, and in all cases it was found upstream of *bla*_{OXA-51}. GES-type beta lactamases were found in 24 strains (GES-11 in 16 strains and GES-22 in 8 strains). *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER-2}, and *bla*_{NDM-1} genes were not observed. *aac-3-Ia* and *aac-6'Ib* genes were detected in 13 and 15 strains, respectively. All strains were collected into 12 different groups with REP-PCR. It was first reported that GES-11 and OXA-40 in *A. baumannii* from Turkey. GES-22 differs from GES-11 by a single amino acid substitution (M169L). Because M169 is part of the omega loop, a structure that is known to have major effects on substrate selectivity in class A β-lactamases, GES-22 was expressed, purified and kinetically characterized. This study shows that compared to GES-11, GES-22 displays more efficient hydrolysis of penicillins, cefotaxime and aztreonam, but a loss of efficiency against ceftazidime. Additionally, the M169L substitution confers on GES-22 more efficient hydrolysis of the clavulanic acid. These effects are highly similar to other mutations at the homologous position in other class A β-lactamases, suggesting that this methionine plays a key structural role in aligning active site residues and in substrate selectivity across the class. OXA-66 mutants were expressed, purified and kinetically characterized. It was observed that clinical mutations W222L, I129V, P130Q can increase the hydrolytic activity against carbapenems in OXA-66.

2015, 141 pages

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, GES-22, OXA-66, Mutation

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Antibiyotiklerin Tarihsel Gelişimi	1
1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.....	2
1.4. β -laktam Antibiyotikler.....	4
1.4.1. β -laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	6
1.5. Antibiyotik Direnci	9
1.5.1. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	10
1.5.1.1. Antibiyotik Hedef Moleküllerinin Değişimi.....	10
1.5.1.2. Hücre Duvarı Geçirgenliğinin Azalması.....	10
1.5.1.3. Antibiyotiğin Enzimatik Yıkımı	11
1.5.1.4. Farklı Metabolik Yolların Oluşması.....	11
1.6. β -laktamazlar.....	11
1.6.1. β -laktamaz Tarihçesi	11
1.6.2. Gram Negatif Bakterilerde β -laktamaz Üretimi	12
1.6.3 β -laktamazların Sınıflandırılması	13
1.6.3.1. Bush-Jacoby Sınıflandırması	13
1.6.3.1.1. Grup 1	14
1.6.3.1.2. Grup 2	14
1.6.3.1.3. Grup 3	15
1.6.3.2. Ambler Sınıflandırması.....	16

1.6.3.2.1.	Sınıf A β -laktamazlar	16
1.6.3.2.2.	Sınıf B β -laktamazlar	16
1.6.3.2.3.	Sınıf C β -laktamazlar	16
1.6.3.2.4.	Sınıf D β -laktamazlar	17
1.7.	OXA-tipi β -laktamazlar	18
1.7.1.	OXA-51 Grubu	24
1.8.	Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar (GSBL)	26
1.8.1.	TEM-tipi GSBL	27
1.8.2.	SHV-tipi GSBL	28
1.8.3.	CTX-M-tipi GSBL ve Toho	28
1.8.4.	OXA-tipi GSBL	28
1.8.5.	PER-tipi GSBL	29
1.8.6.	VEB-1, BES-1 ve Diğer GSBL'ler	29
1.8.7.	GES-tipi GSBL	29
1.9.	Sınıf A Serin β -laktamaz İnhibitörleri	36
1.10.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	38
1.10.1.	<i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	39
1.10.1.1.	β -laktamlara Dirençte Enzimatik Mekanizmalar	39
1.10.1.2.	β -laktamlara Dirençte Enzimatik Olmayan Mekanizmalar	40
1.10.2.	Ülkemizde Hastane Kökenli <i>Acinetobacter baumannii</i> 'de Antibiyotik Direnci	41
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	43
2.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, E-test Çubukları, Enzimler, Kitler ve Vektörler	43
2.2.	Çalışmada Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Besiyeriler	44
2.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i> İzolatlarının Temini ve Antibiyotik Duyarlılık Oranlarının Belirlenmesi	45
2.4.	<i>Acinetobacter baumannii</i> İzolatlarının Stoklanması ve Total DNA İzolasyonu	45
2.5.	<i>Acinetobacter baumannii</i> Suşlarında Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Taranması	45
2.6.	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	47

2.7.	PZR Ürünlerinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması ve Baz Dizin Analizi.....	47
2.8.	Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (REP-PZR).....	48
2.9.	Konjugasyon	49
2.10.	<i>bla</i> _{GES} Genlerinin pET100/D-TOPO Vektörüne Klonlanması.....	49
2.10.1.	Pozitif Klonların Seçimi ve Baz Dizin Analizi	50
2.11.	GES-11 ve GES-22'yi Barındıran Hücrelerin Bazı Antibiyotikler İçin MİK Değerlerinin Belirlenmesi	50
2.12.	pET100/D-TOPO_GES-22 ile Yönlendirilmiş Mutasyonların Yapılması	51
2.13.	GES-22'de Alanin Mutasyonlarının MİK Üzerine Etkilerinin E-test Yöntemiyle Belirlenmesi	52
2.14.	<i>bla</i> _{GES-22} ve <i>bla</i> _{GES-11} 'in pET-28a' ya Klonlanması	53
2.14.1.	pET-28a Klonlanması İçin Primer Dizaynı.....	53
2.14.2.	XhoI Kesim Bölgesini Değiştirmek İçin Yönlendirilmiş Mutasyon	53
2.14.3.	XhoI Kesim Bölgesi Değiştirilmiş <i>bla</i> _{GES-22} ve <i>bla</i> _{GES-11} 'in pET-28a'ya Klonlanması	54
2.15.	pET-28a_XhoI_ <i>bla</i> _{GES-22} ve pET-28a_XhoI_ <i>bla</i> _{GES-11} 'in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transforme Edilmesi ve Ekspresyonunun İndüklenmesi	55
2.16.	GES-11 ve GES-22' nin Kobalt Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	55
2.17.	SDS-PAGE Analizi	56
2.18.	GES-11 ve GES-22'nin Diyalizi ve Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	57
2.19.	GES-22 ve GES-11'in β -Laktamlar İçin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	57
2.19.1.	K_m ve k_{cat}/K_m Değerlerinin Belirlenmesi	58
2.19.2.	Bazı β -Laktamlar İçin K_d Değerlerinin Belirlenmesi.....	59
2.20.	GES-22 ve GES-11'nin β -Laktamaz İnhibitörlerine Karşı Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	60
2.21.	PyMOL ile GES-11'in Hidrofobik Etkileşimlerinin Gösterilmesi ve Sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile Süperpozisyonu	61
2.22.	W222L, I129V ve P130Q Klinik Mutasyonlarının OXA-66'nın β -Laktam Hidroliz Profili Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	61

2.22.1.	OXA-66/W222L üzerinde I129V ve P130Q Mutasyonlarının Yapılması	62
2.22.2	pET-24a-OXA-66/W222L, pET-24a-OXA-66/W222L/P130Q ve pET-24a-OXA-66/W222L/I129V'nin <i>E. coli</i> BL21'e Transformasyonu ve Ekspresyonun İndüklenmesi	64
2.22.3	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması	64
2.22.4	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	65
2.22.5.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	65
3.	BULGULAR.....	68
3.1.	<i>Acinetobacter baumannii</i> izolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Oranları....	68
3.2.	Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Tespit Edilmesi ve Baz Dizin Analizi.....	69
3.3.	Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (REP-PZR)	70
3.4.	Konjugasyon	72
3.5.	<i>bla</i> _{GES} Genlerinin pET100/D-TOPO Vektörüne Klonlanması.....	72
3.5.1.	Baz Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	73
3.6.	GES-11 ve GES-22'yi Barındıran Hücrelerin Bazı Antibiyotikler İçin MİK Değerleri.....	74
3.7.	GES-22'de Yapılan Alanin Mutasyonlarının MİK Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	75
3.8.	<i>bla</i> _{GES-22} ve <i>bla</i> _{GES-11} 'in pET-28a'ya Klonlanması	76
3.9.	GES-11 ve GES-22'nin Saflaştırılması.....	77
3.10.	GES-11 ve GES-22'nin Konsantrasyonları	78
3.11.	GES-22 ve GES-11'in Bazı Beta-Laktamlar İçin Kinetik Parametreleri	79
3.12.	GES-22 ve GES-11'in β -Laktamaz İnhibitörlerine Karşı Kinetik Özellikleri	84
3.13.	GES-11'de M169'un Hidrofobik Etkileşimleri ve GES-11'in Sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile Süperpozisyonu	85
3.14.	pET-24a_OXA-66/W222L'de I129V ve P130Q Klinik Mutasyonlarının Elde Edilmesi.....	86

3.15.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Saflaştırılması	88
3.16.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	89
3.17.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin β -laktamlar için Kinetik Parametreleri	90
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	96
5.	ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR		106
ÖZGEÇMİŞ		115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	β -laktam çekirdek yapıları	5
Şekil 2.	Gram negatif bakterilerde peptidoglikan tabaka oluşumunun şematik gösterimi	7
Şekil 3.	PBP ile Açıl-D-Ala-D-Ala etkileşimi	8
Şekil 4.	PBP ile Penisilinin Etkileşimi	8
Şekil 5.	β -laktamaz üretiminin uyarılması modeli	13
Şekil 6.	Serin A β -laktamazların aktivitesini açıklayan model	21
Şekil 7.	OXA-24/40-doripenem (3PAE) (mavi) ve OXA-51/doripenem (yeşil) PyMOL gösterimi	25
Şekil 8.	GES-11 β -laktamaz kristal yapısının (3V3R) PyMOL gösterimi	33
Şekil 9.	β -laktamaz inhibitörleri.....	37
Şekil 10.	101 <i>A. baumannii</i> suşunda tespit edilen gen kombinasyon yüzdeleri	70
Şekil 11.	101 <i>A. baumannii</i> izolatının REP-PZR profilleri.....	71
Şekil 12.	Plazmid izolasyon sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi	73
Şekil 13.	GES PZR sonuçlarının görüntülenmesi	73
Şekil 14.	pGEMT_XhoI_ <i>bla</i> _{GES-22} ve pGEMT_XhoI_ <i>bla</i> _{GES-11} 'in EcoRI-XhoI kesim sonucunun % 1'lik agaroz jel görüntüsü	76
Şekil 15.	pET-28a_XhoI_ <i>bla</i> _{GES-22} ve pET-28a_XhoI_ <i>bla</i> _{GES-11} ' in EcoRI-XhoI kesim sonucunun %1'lik agaroz jel görüntüsü	77
Şekil 16.	GES-22'nin saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü	77
Şekil 17.	GES-11'nin saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü	78
Şekil 18.	GES-11 ve GES-22 için Michealis-Menten grafikleri	79
Şekil 19.	GES-22 ve GES-11 ile yarışmalı inhibisyonundan elde edilen grafikler	81
Şekil 20.	İnhibitörlerle GES-22 ve GES-11'in kinetik deneyleri sonucunda elde edilen grafikler	84
Şekil 21.	GES-11'in sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile süperpozisyonu	86
Şekil 22.	M169'un hidrofobik etkileşimleri.....	86
Şekil 23.	Birinci PZR basamağında elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü	87

Şekil 24.	İkinci PZR basamağında elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü.....	87
Şekil 25.	Plazmitlerle yapılan NdeI-XhoI kesim sonucunun % 1'lik agaroz jel görüntüsü.....	87
Şekil 26.	OXA-66/W222L saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü.....	88
Şekil 27.	OXA-66/W222L/P130Q saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü.....	88
Şekil 28.	OXA-66/W222L/I129V saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü.....	89
Şekil 29.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Michealis-Menten Grafikleri	90
Şekil 30.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin imipenem ve doripenem ile kinetik deneylerinden elde edilen grafikler...92	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Antibiyotikler ve etki mekanizmaları	3
Tablo 2.	β -laktam antibiyotikler	6
Tablo 3.	β -laktamazların Sınıflandırılması	17
Tablo 4.	OXA tipi β -laktamazlar	20
Tablo 5.	Sınıf D β -laktamazların β -laktam antibiyotiklerine karşı kinetik değerleri	23
Tablo 6.	OXA-51, OXA-51 I129L, OXA-51 L167V kinetik parametreleri	26
Tablo 7.	GES-tipi β -laktamazlar	32
Tablo 8.	Serin A β -laktamazlarda korunmuş katalitik amino asitlerin etkileri ve bunların GES tipi β -laktamazlardaki durumları	34
Tablo 9.	GES alellerinin kinetik parametreleri	35
Tablo 10.	Çözeltiler, tamponlar ve besiyerilerin bileşenleri	44
Tablo 11.	Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler	46
Tablo 12.	Termal döngü şartları	47
Tablo 13.	Mutasyonlarda kullanılan primerler	52
Tablo 14.	SDS-PAGE bileşenleri	56
Tablo 15.	β -laktamlara özgü ekstinksiyon katsayıları, dalga boyları ve faktörler	58
Tablo 16.	Yarışmalı inhibisyon reaksiyon bileşenleri	59
Tablo 17.	β -laktamaz inhibitörleri ile yapılan reaksiyonların bileşenleri	61
Tablo 18.	Birinci PZR basamağı reaksiyon bileşenleri	63
Tablo 19.	İkinci PZR basamağı reaksiyon bileşenleri	63
Tablo 20.	β -laktamlara özgü ekstinksiyon katsayıları, dalga boyları ve faktörler	66
Tablo 21.	OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/129V ve OXA-66/W222L/P130Q yarışmalı inhibisyon reaksiyon bileşenleri	67
Tablo 22.	Antibiyotik duyarlılık oranları	68
Tablo 23.	Genotipler ve gen kombinasyonları	71
Tablo 24.	BLAST analizi sonuçları	74
Tablo 25.	Bazı antibiyotikler için MİK değerleri	75
Tablo 26.	<i>Oneshot E. coli</i> hücrelerinin bazı antibiyotikler için MİK değerleri	75
Tablo 27.	GES-11 ve GES-22'nin konsantrasyonları	78

Tablo 28. GES-11 ve GES-22' nin bazı β -laktamlara karşı kinetik parametreleri.....	83
Tablo 29. GES-11 ve GES-22'nin β -laktamaz inhibitörlerine karşı kinetik parametreleri	85
Tablo 30. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin konsantrasyonları	89
Tablo 31. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin β -laktamlara karşı kinetik parametreleri	94

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Alanin
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Aac-3-Ia	3-N-Aminoglikozit asetiltransferaz
Aac-6-Ib	6'-N-Aminoglikozit asetiltransferaz
<i>AbaR1</i>	<i>A. baumannii</i> direnç adası
AC	Amoksisilin
ACC	Ambler sınıf A
ACT	AmpC tipi
AdeABC	RND efluks pompası
Ala	Alanin
AMP	Ampisilin
AmpC	Ampisilin Sınıf C
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
APS	Amonyum persülfat
AZT	Aztreonam
BEL	Belçika GSBL
BES	Brazilya genişlemiş spektrum
bla	Beta laktamaz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Karbon
C	Sistein
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CARB	Karbenisilin üzerinde aktif
CarO	Karbapenem direnç ilişkili dış zar proteini
CAU	<i>Caulobacter crescentus</i>
CAZ	Seftazidim
CEC	Sefaklor

CepA	<i>Bacteroides fragilis</i> kökenli sınıf A sefalosporinaz
CF	Sefalotin
CFE	<i>Citrobacter freundii</i> kökenli
Cl	Klorür
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü Kuralları
cm	Santimetre
CMY	Sefamisin direnci
CMT	Kompleks mutant kökenli TEM-1
CPS	Sefoperazon/sulbaktam
CTX	Sefotaksim
CTX-M	Sefotaksim hidrolizleyen
Cys	Sistein
D	Aspartik asit
DAP	Diaminopimelik asit
DHA	Dhahran Hastanesi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid
DOR	Doripenem
DpiAB	İki bileşenli düzenleyici sistem
DpnI	Diplococcus pneumoniae G41
E	Enzim
[E]	Enzim konsantrasyonu
E	Glutamik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	<i>E. coli</i> RY13
<i>EMB</i>	<i>Eosin metilen mavi agar</i>
F	Fenilalanin
F	İleri
Fe	Demir

FEP	Sefepim
FEZ	<i>Legionella (Fluoribacter) gormanii</i> kökenli çinko β -laktamaz
FOX	Sefoksitin
FOX	Sefoksitin direnci
FtsZ	Filament yapan ısıya duyarlı mutant Z
G	Glisin
G	N-asetilglukozamin asit
Gal	Galaktoz
GES	Guyana genişlemiş spektrum
GIM	Alman imipenemaz
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
GOB	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> sınıf B kökenli
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
H	Hidrojen
I	İzolösin
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonunun yarısı
Ile	İzolösin
IMI	İmipenem hidrolizleyen beta laktamaz
IMI	İmipenem
IMP	İmipenem üzerinde aktif metallo beta laktamaz
IND	<i>Chryseobacterium indologenes</i> kökenli
IPTG	İzopropiltiogataktozid
IRT	İnhibitör dirençli TEM
IX	Sefiksim
K	Lizin
<i>k</i>	Denge sabiti
<i>k_{cat}</i>	Dönüşüm sayısı
<i>k_{cat}/K_m</i>	Katalitik etkinlik oranı

K_d	Disosiyasyon sabiti
kDa	Kilodalton
$K_{d g}$	Görünen disosiyasyon sabiti
K_m	Michealis-Menten sabiti
KOXY	<i>Klebsiella oxytoca</i> kökenli
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaz
L	Lösün
L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> kökenli değişken enzim
LAT	Latamofeks üzerinde etkili
LB	Luria-Bertani
Leu	Lösün
lt	Litre
Lys	Lizin
LytSR	İki bileşenli düzenleyici sistem
M	N-asetilmuramik asit
M	Metiyonin
Met	Metiyonin
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MIR	Miriar Hastanesi
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MOX	Moksalaktam üzerinde aktif
N	Asparajin
N	Azot
n	Sayı
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum fosfat monobazik monohidrat

NDM	New Delhi metallo beta laktamaz
nm	Nanometre
NMC	Metallo enzim olmayan karbapenemaz
OH	Hidroksil
OmpC	Dış zar proteini C
OmpF	Dış zar proteini F
OXA	Oksasilinaz
P	Prolin
P	Ürün
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PC-1	<i>Staphylococcus aureus</i> PC1
PDB	Protein veri bankası
PEN	Penisilin G
penP	Beta laktamaz öncüsü
PER	<i>Pseudomonas</i> genişlemiş direnç
Phe	Fenilalanin
Pro	Prolin
PSE	<i>Pseudomonas</i> özgü enzim
PTC	Piperasilin/tazobaktam
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Q	Glutamin
R	Geri
REP	Tekrarlanan palindrom
Rif	Rifampisin
RNA	Ribonükleik asit
RND	Direnç-nodülasyon-bölünme
<i>R. pickettii</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
[S]	Substrat konsantrasyonu
S	Kükürt

s	Saniye
S	Serin
S	Substrat
<i>S. algae</i>	<i>Shewanella algae</i>
Ser	Serin
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SFO	<i>Serratia fonticola</i>
SHV	Sülfidril değişken
SIM	Seoul imipenemaz
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzimi
<i>S. oneidensis</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>
<i>sulA</i>	Hücre bölünmesi inhibitör geni
T	Treonin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trikarboksilik asit
TEM	Temoniera
TEMED	Tetrametiletilediamin
TLA	Tlahuicas
TLC	Tikarsilin/klavulanik asit
<i>tn</i>	dönüşüm sayısı
Toho	Tojo Üniversitesi
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
V	Valin
V_0	İlk hız
Val	Valin
VEB	Vietnam genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
VIM	Verona integron kökenli metallo beta laktamaz
V_{maks}	Maksimum hız

VncSR	İki bileşenli düzenleyici sistem
V_u	Substratın inhibe edilmemiş hızı
W	Triptofan
XhoI	<i>Xanthomonas holcicola</i>
XL	Amoksisilin/klavulanik asit
Y	Tirozin
β	Beta
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enfeksiyon etkeni olarak *Acinetobacter baumannii*'de çeşitli mekanizmalara bağlı olarak gelişen antibiyotik direnci tedavide güçlükler yol açmakta ve hızla yayılmaktadır. Antibiyotiklere karşı direnç enzimlerinin gelişmesi bu mekanizmalardan biridir ve bu konu hakkında literatürde birçok çalışma mevcuttur. Direnç enzimleri ve bakteride bulunan diğer mekanizmaların bir araya gelmesi tedavi seçeneklerini sınırlandırmaktadır (Korkmaz vd., 2015). Bu problem birçok araştırmacıyı direnç mekanizmalarının moleküler ve biyokimyasal olarak belirlenmesini araştırmaya yöneltmiştir. Yapılan çalışmalar direnç enzimlerini kodlayan genlerin hızlı bir şekilde değiştiğini ve kıtalar arasında da kolayca yayılabildiğini göstermiştir.

Bu doktora tez çalışmasında, çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* klinik suşlarında direnç genlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve GES-22'nin GES-11 ile karşılaştırılmalı kinetik karakterizasyonunun yapılması amaçlandı. Ayrıca *A. baumannii*'de karbapenem direncine neden olan sınıf D β -laktamazlardan OXA-66'da bazı klinik mutasyonların substrat hidroliz profiline etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Sınıf A ve D β -laktamazlarda kinetik özellikleri etkileyen bazı klinik mutasyonların ortaya konması yeni inhibitör veya antibiyotik geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacaktır. Enfeksiyon etkeni dirençli bakterilerde antibiyotik direnç paternlerinin belirlenmesi tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve antibiyotik kullanım politikalarının yeniden gözden geçirilmesi için büyük önem taşımaktadır.

1.2. Antibiyotiklerin Tarihsel Gelişimi

Hastalıkların tarihçesine bakıldığında, büyük bir kısmının mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar olduğu görülmüştür. Kemoterapi, enfeksiyonlara neden olan etkenlerin temel tıropatik stratejisi olarak gelişmiştir. Dünyada ilk antimikrobiyal ajan Ehrlich tarafından 1910 yılında sentezlenmiştir ve salvarsan olarak adlandırılmıştır.

1935'te Domagk ve diğerk araştırmacılar tarafından sülfonamidler geliştirilmiştir. 1928'te Fleming penisilini keşfetmiştir. Fleming, petri kaplarında *Penicillium* cinsi bir mantarın çevrelediği *Staphylococcus aureus* inhibisyon zonunu gözlemleyerek, bir mikroorganizmanın ürettiği maddelerin diğerk mikroorganizmaların büyümesini inhibe edebileceğini ortaya çıkarmıştır. Penisilin 1940'larda klinik kullanıma sunulmuştur. Penisilin II. Dünya Savaşı'nda güvenilirliği ve etkisiyle birçok yaralı askerin hayatının kurtulmasını sağlamıştır. Sonraki 20 yılda ardı ardına antimikrobiyal ajanlar geliştirilmiş ve antimikrobiyal kemoterapi altın çağını yaşamıştır. 1944'lerde, *Streptomyces griseus*'ten streptomisin izole edilmiştir. Kloramfenikol, tetrasiklin, makrolid, glikopeptid ve vankomisin toprak bakterilerinde keşfedilmiştir. 1962'de nalidiksik asit sentezlenmiştir. Antimikrobiyal etki ve birçok özellik (absorbsiyon, kandaki konsantrasyon) için yeni antimikrobiyaller geliştirilmiştir. Yan etkileri çok fazla olan antimikrobiyallerin yerine daha güvenilir olanları geliştirilmeye çalışılmıştır. Birçok büyük firma yeni antimikrobiyal geliştirmek için yaşışmıştır. Fakat son yıllarda yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi azalmıştır. Bununla birlikte, antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli bakteriler ortaya çıkmıştır (Saga ve Yamaguchi, 2009).

1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler etkiledikleri hücresel sistemler ya da yapılaraya göre sınıflandırıldığı gibi hücre ölümünü uyaran (bakterisidal) veya hücre büyümesini inhibe eden (bakteriostatik) ilaçlar olarak da iki sınıfa ayrılabilirler. Bakterisidal ilaçlar DNA, RNA, hücre duvarı veya protein sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Antibiyotikler bakterideki özel hedeflerine fiziksel olarak bağlanıp bakteride biyokimyasal, moleküler ve yapısal değişmelere yol açarak hücre ölümüne neden olur. Tablo 1'de antibiyotiklerin hedefleri ve etkiledikleri hücresel mekanizmalar verilmektedir (Kohanski vd., 2010).

Tablo 1. Antibiyotikler ve etki mekanizmaları

Antibiyotik tipi	Antibiyotik	Öncül hedef	Etkilenen mekanizmalar
Florokinolonlar (DNA sentezi İnhibitörü)	Nalidiksik asit, siprofloksasin, levofloksasin ve gemifloksasin	Topoizomeraz II ve Topoizomeraz IV	DNA replikasyonu, SOS cevabı, Hücre bölünmesi, ATP üretimi, Fe-S küme sentezi, ROS oluşumu ve redoks-duyarlı iki bileşenli sistem
Trimetoprim-sulfametoksazol (DNA sentezi İnhibitörü)	Trimetoprim-sulfametoksazol	Tetrahidrofolik asit sentezi inhibitörleri	Nükleotid biyosentezi ve DNA replikasyonu
Rifamisinler (RNA sentezi inhibitörü)	Rifamisin, rifampin ve rifapentin	DNA bağımlı RNA polimeraz	RNA transkripsiyonu, DNA replikasyonu ve SOS cevabı
β-laktamlar (Hücre duvarı sentezi inhibitörü)	Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler	Penisilin bağlayan proteinler	Hücre duvarı sentezi, hücre bölünmesi, otolizin aktivitesi, SOS cevabı, Fe-S küme sentezi, TCA döngüsü, ROS oluşumu ve redoks-duyarlı iki bileşenli sistem
Glikopeptidler ve Glikolipeptidler (Hücre duvarı sentezi inhibitörü)	Vankomisin ve teikoplanin	Peptidoglikan yapıları	Hücre duvarı sentezi, transglikozillenme, transpeptidasyon ve otolizin aktivasyonu
Lipopeptidler (Hücre duvarı sentezi inhibitörü)	Daptomisin ve polimiksin B	Hücre zarı	Hücre duvarı sentezi ve iki bileşenli zar sistemi
Aminoglikozitler (Protein sentezi inhibitörü)	Gentamisin, tobramisin, streptomisin ve kanamisin	30S ribozom	Protein translasyonu (tRNA' nın yanlış eşleşmesi) SOS cevabı, Fe-S küme sentezi, TCA döngüsü, ROS oluşumu ve redoks-duyarlı iki bileşenli sistem
Tetrasiklinler (Protein sentezi inhibitörü)	Tetrasiklin ve Doksisisiklin	30S ribozom	Protein translasyonu (aminoaçil tRNA' nın ribozoma bağlanmasının engellenmesi)
Makrolidler (Protein sentezi inhibitörü)	Eritromisin ve Azitromisin	50S ribozom	Protein translasyonu (uzama ve translokasyon basamaklarının engellenmesi) ve yüksüz tRNA' nın tükenmesi

Tablo 1 (devam). Antibiyotik ve etki mekanizmaları

Antibiyotik tipi	Antibiyotik	Öncül hedef	Etkilenen mekanizmalar
Streptograminler (Protein sentezi inhibitörü)	Pristinamisin, dalfopristin ve kuinupristin	50S ribozom	Protein translasyonu (başlama, uzama ve translokasyon basamaklarının engellenmesi) ve yüksüz tRNA'nın tükenmesi
Fenikoller (Protein sentezi inhibitörü)	Kloramfenikol	50S ribozom	Protein translasyonu (uzama basamağının engellenmesi)

1.4. β -laktam Antibiyotikler

β -laktam halkası, üç karbon atomu ve bir azot atomundan oluşan dört üyeli halkasal bir amiddir. Azot atomu karbonil grubuna ait β karbonuna bağlandığından β -laktamlar olarak adlandırılırlar. Penamlar β -halkası ile birleşmiş tamamen doymuş ve sülfür barındıran beş üyeli halkadan oluşmaktadır. Karbapenam β -laktam bileşiği doymuş karbapenemdir. Klavamlar penamlara benzemekle birlikte sülfür yerine oksijen atomu bulundurlar ve oksapenamalar olarak da adlandırılırlar. Karbapenemler penamlara çok benzerler fakat doymamış yapının sülfür atomu karbon atomuyla yer değiştirir. Penemler doymamış β -laktamlardır, karbapenemlerden farklı olarak karbon atomu yerine sülfür bulundurlar. Karbasefemler sefemlere benzemekle birlikte yapılarında sülfür atomu yerine karbon atomu bulundurlar. Oksasefemler sefemlerden farklı olarak sülfür yerine oksijen atomu bulundurlar. β -laktamlar çekirdek halka yapılarına göre sınıflandırılırlar (Şekil 1):

1) Doymuş beş üyeli halkayla birleşmiş olan β -laktamlar:

- Tiyazolidin halkası bulduran β -laktamlar penamlar olarak adlandırılır (penisilinler).
- Piroolidin halkası bulduran β -laktamlar karbapenamalar olarak adlandırılır (ara ürünler).

- Oksazolidin halkası bulunduran β -laktamlar oksapenamlar veya klavamlar olarak adlandırılır (klavulanik asit).

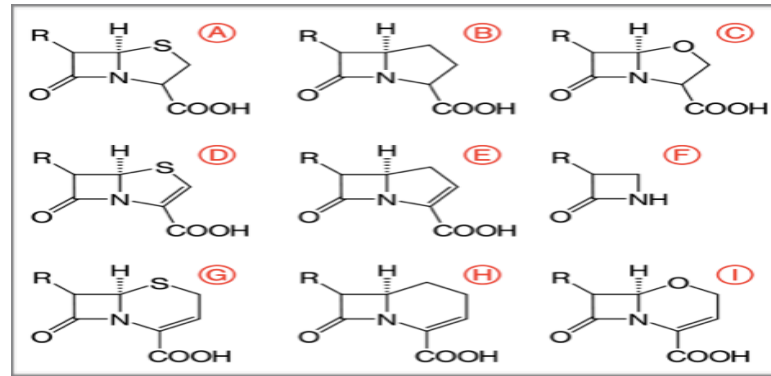
2) Doymamış beş üyeli halkayla birleşmiş olan β -laktamlar:

- 2,3-dihidro-1H-pirol halkası içeren β -laktamlar karbapenemler olarak adlandırılır (imipenem).
- 2,3-dihidrotiyazol halkası içeren β -laktamlar penemler olarak adlandırılır (faropenem).

3) Doymamış altı üyeli halkayla birleşmiş olan β -laktamlar:

- 3,6-dihidro-2H-1,3-tiyazin halkasını içeren β -laktamlar sefemler olarak adlandırılırlar (sefalosporinler).
- 1,2,3,4-tetrahidropiridin halkasını barındıran β -laktamlar karbasefemler olarak adlandırılırlar (lorakarbef).
- 3,6-dihidro-2H-1,3-oksazin halkasını içeren β -laktamlar oksasefemler olarak adlandırılırlar (moksolaktam).

4) Herhangi bir halkayla birleşmeyen β -laktamlar monobaktam olarak adlandırılır (aztreonam) (URL-1, 2013). Ticari olarak kullanılan antibiyotikler Tablo 2’de verildi.



Şekil 1. β -laktam çekirdek yapıları. (A) Penam (B) Karbapenem. (C) Oksapenem. (D) Penem. (E) Karbapenem. (F) Monobaktam. (G) Sefem (H) Karbasefem (I) Oksasefem (URL-2, 2015)

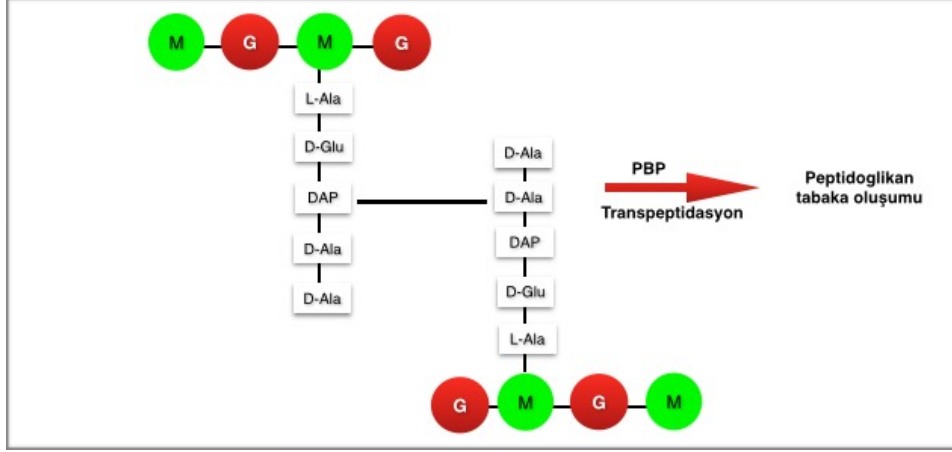
Tablo 2. β -laktam antibiyotikler

Penisilinler	Dar Spektrumlu	Benzilpenisilin, Fenoksimetilpenisilin, Kloksasilin (Dikloksasilin, Flukloksasilin), Oksasilin, Metisilin, Nafsilin	
	Geniş Spektrumlu	Aminopenisilinler	Amoksisilin, Ampisilin, Episilin
		Karboksipenisilinler	Karbenisilin, Tikarsilin, Temosilin
		Ureidopenisilinler	Azlosilin, Piperasilin, Mezlosilin
		Diğer	Mesilinam, Sulbenisilin
Sefalosporinler	1.Kuşak	Sefazolin, Sefadroksil, Sefalekssin, Sefaloridin, Sefalotin, Sefapirin, Sefatrizin, Sefazedon, Sefazaflur, Sefradin, Sefroksadin, Seftezol	
	2.Kuşak	Sefaklor, Sefamandol, Sefminoks, Sefonisid, Seforanid, Sefotiyam, Sefprozil, Sefbuperazon, Sefuroksim, Sefuzonam	
	3. Kuşak	Sefiksim, Seftriakson, Sefaperazon, Sefotaksim, Sefpodoksim, Sefdinir, Sefsulodin, Sefsapen, Sefdaloksim, Sefditoren, Sefetamet, Sefmenoksim, Sefodizim, Sefpimizol, Sefpiramis, Sefteram, Seftibuten, Seftiolen, Seftzoksim	
	4. Kuşak	Sefepim, Sefpirom, Sefkuinom, Sefozopran	
	5. Kuşak	Seftobiprol, Seftarolin fosamil	
	Sefamisinler	Sefoksitin, Sefotetan, Sefmetazol	
Karbasefemler	Lorakarbef		
Monobaktamlar	Aztreonam, Tigemonam, Karumonam, Tabtoksin		
Karbapenemler	İmipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem, Biapenem, Panipenem		

1.4.1. β -laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

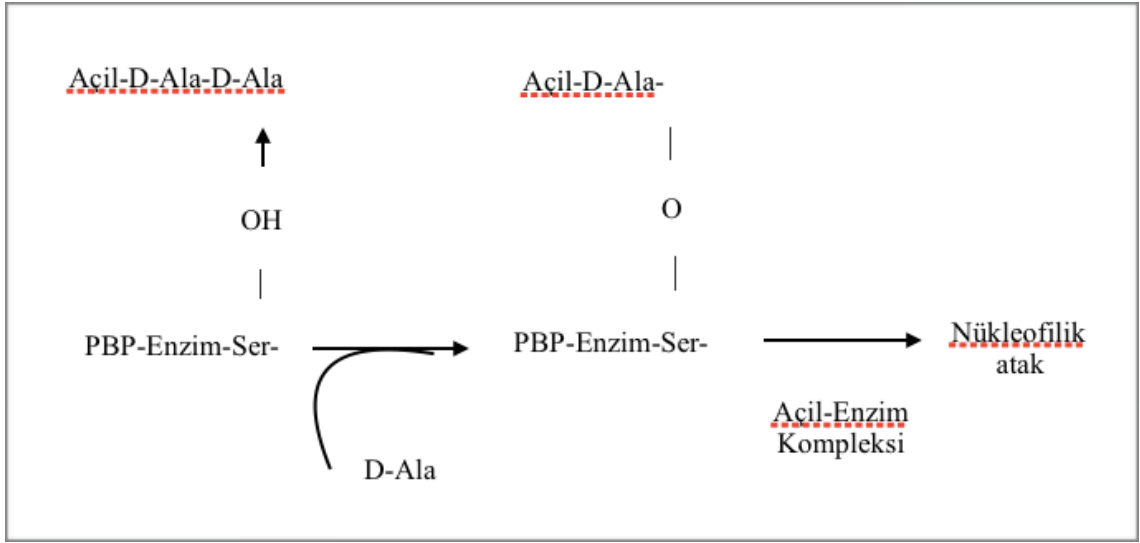
Bakteri hücresi peptidoglikan (murein) tabakalarla örtülüdür. Peptidoglikan tabakanın oluşumu, disakkarit pentapeptidleri varolan peptidoglikan moleküllerine glikan zincirinin uzaması için ekleyen transglikozilaz ve peptidoglikan ünitelerinin

zincirlerini çapraz bağlayan penisilin bağlayan proteinler (PBP, transpeptidazlar) tarafından sağlanır (Şekil 2).

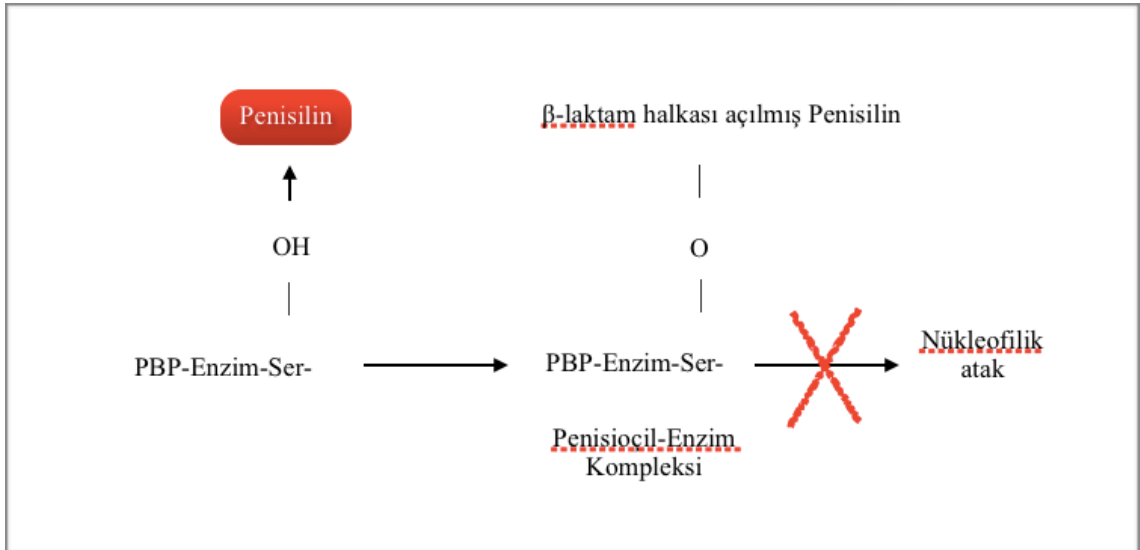


Şekil 2. Gram negatif bakterilerde peptidoglikan tabaka oluşumunun şematik gösterimi

β -laktamlar ve glikopeptidler, hücre şekli ve yapısının değişimine, hücrede stres cevaplarının uyarılmasına ve en sonunda da hücre lizisine yol açarlar. β -laktamlar, penisilin bağlayan proteinlerin katalizlediği peptid bağı oluşumunu (peptidoglikan üniteler arasındaki çapraz bağların oluşumu) inhibe ederler. İnhibisyon, çapraz bağların oluşumunun açılasyon fazında β -laktamın siklik amid halkasının (peptidoglikanın D-alanil-D-alanin dipeptid analogu) penisilin bağlayan proteinin aktif bölgesine substratı olarak bağlanması ve halka açıldığında peptid bağı oluşumunun engellenmesi ile meydana gelir (Kohanski vd., 2010). Şekil 3 ve 4'te PBP ile Açıl-D-Ala-D-Ala ve pensilinin etkileşimi şematize edilmiştir (Bycroft ve Shute, 1985).



Şekil 3. PBP ile Açıl-D-Ala-D-Ala etkileşimi



Şekil 4. PBP ile Penisilinin Etkileşimi

β -laktamlar hücre duvarı sentezini inhibe ettiğinde hücre büyümesiyle oluşan iç basınç hücre duvarı genişlemesini geride bırakır ve bu hücreyi lizise yönlendirir. Bu dengesiz büyüme hipotezi hücre lizisi için hücrede aktif protein sentezini de beraberinde getirmektedir. Peptidoglikan hidrolazlarından biri olan otolizinler, peptidoglikan tabakalar arasındaki bağları keserler. Otolizinler ve β -laktamların lizis-bağımlı hücre ölümünü birlikte uyardıkları düşünülmektedir.

Bazı bakteriler peptidoglikan hidrolaz aktivitesine sahip değildir, bu bakterilerde β -laktamlar lizis bağımlı olmayan hücre ölümüne neden olur. Lizis bağımlı olmayan hücre ölümü iki bileşenli sistemler (VncSR, LytSR) tarafından düzenlenmektedir.

β -laktamlar, penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak hücre morfolojisinde değişimlere yol açar. PBP1 inhibitörleri, hücre uzamasına neden olur ve lizisi tetikler. PBP2 inhibitörleri, hücre şeklini değiştirir fakat lizise neden olmaz. PBP3 inhibitörleri, hücre bölünmesine etki eder ve filamentasyonu uyarır. Filamentasyon, hücrede SOS cevabını uyararak genlerin (*sulA*) aktivasyonunu takiben meydana gelir. *SulA* ifadesiyle oluşan proteinler FtsZ monomerlerine bağlanarak septum oluşumunu engeller ve hücre uzamasına neden olur. β -laktamlar, PBP3 inhibe ederek, filamentasyonu uyarıp SOS cevabını aktive eden DpiAB iki bileşenli sistemi harekete geçirir (Kohanski vd., 2010).

1.5. Antibiyotik Direnci

Duyarlı bakteri popülasyonuna antibiyotikler uygulandığında, kromozomal mutasyonlarla ya da yatay gen transferiyle bazı hücreler dirençli hale gelir. Direnç kazanan hücreler, duyarlı olanlara göre daha avantajlı olduklarından doğal seleksiyonla popülasyonda direnç frekansı artmaya başlar. Direnç kazanımı ile bakteride fizyolojik değişimler meydana gelir. Bu değişimlerin üstesinden gelebilmek için telafi edici mutasyonlar meydana gelir. Bu süreç direncin evrimsel dinamiğini oluşturmaktadır.

Bakteri, kendiliğinden oluşan kromozomal mutasyonlarla ya da plazmit kökenli direnç alelleri ile antibiyotik direnci kazanır. Çok sayıda kromozomal mutasyon ve direnç aleli tespit edilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis*'de 7 antibiyotiğe direnç sağlayan 36 gende 946 mutasyon bulunmuştur. Direnç alellerinin adaptasyon üzerine etkileri iki faktöre bağlıdır. Birincisi, mutasyonun ne kadar direnç sağladığıdır. İkincisi ise artan direncin beraberinde gelen fizyolojik etkilerdir. Kromozomal mutasyonlar, antibiyotiğin bağlandığı hedef enzimin yapısını modifiye ederek antibiyotik direncine neden olabilir. Bu mekanizmada direncin derecesi, mutasyonun antibiyotik-hedef bağlanmasını ne kadar engelleyebildiğine ve antibiyotik ve hedef arasındaki etkileşimin

özgüllüğüne bağlıdır. Örneğin, rifamisin bakteriyal RNA polimeraza bağlanıp, transkripsiyonu engeller ve RNA polimerazda meydana gelen mutasyonlar antibiyotik direncinin artmasına neden olur. Fakat sorangisin yapısal esnekliği sayesinde RNA polimerazda meydana gelen mutasyonlardan etkilenmeyebilir (Maclean vd., 2010).

1.5.1. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

1.5.1.1. Antibiyotik Hedef Moleküllerinin Değişimi

Antibiyotikler bakterilerde hedef moleküllerine bağlanarak etki gösterirler. Mutasyonlar sonucu hedef moleküllerde meydana gelen değişimler antibiyotiğin hedef moleküle olan ilgisini değiştirir. Bu değişim afinite azalmasına yol açıyorsa bakteride o antibiyotiğe karşı direnç gelişir. Örneğin; PBP β -laktamlar için hedef moleküldür. PBP'nin yapısında meydana gelen değişimler, β -laktamlara direnci sağlar (Törenci, 1989).

1.5.1.2. Hücre Duvarı Geçirgenliğinin Azalması

Bakterilerde ekzopolisakkaritler ve kapsül, çevrenin kimyasal durumuna etki ettiğinden az seviyede antibiyotiklerin hücre içine alınmasında etkili olabilir. Gram negatiflerde, hücre duvarı dışında lipopolisakkarit ve proteinden oluşan dış zar vardır. Bu dış zar, eritromisin gibi hidrofob antibiyotikler için bariyer oluşturur. Bakterilerde gerekli moleküllerin hücre içine alınması aynı zamanda atıkların hücre dışına atılması için porinler mevcuttur. *E. coli*'de farklı büyüklükte moleküllerin geçişine izin veren OmpC ve OmpF porinleri bulunur. OmpF porinleri β -laktam antibiyotiklerin geçişine izin verir. Porinlerin yapısındaki değişim bakteride antibiyotik direncine yol açabilir (Törenci, 1989).

1.5.1.3. Antibiyotiğin Enzimatik Yıkımı

Antibiyotik yıkımı veya aktivitesinin inhibisyonu ile direnç kazanılan antibiyotik gruplarına örnek olarak beta-laktamlar ve kloramfenikol verilebilir. Penisilin ve sefalosporin grubunun dahil olduğu β -laktamları parçalayan enzimler β -laktamazlar olarak adlandırılmıştır. Gram pozitif bakteriler β -laktamazları, hücre dışına salgılamakken Gram negatif bakteriler periplazmik boşluğa salgılar. β -laktamazlar, kromozom ya da plazmit kökenli olabilirler (Törenci, 1989).

1.5.1.4. Farklı Metabolik Yolların Oluşması

Dihidropteroat sentezi ile sulfonamidlere, dihidrofolat redüktaz sentezi ile trimetoprima direnç gelişir. Stafilocoklarda PBP 2 sentezi metisiline direnç gelişmesine neden olur. Stafilocoklar düşük ısılarında, belirli kalsiyum ve magnezyum konsantrasyonlarında PBP'leri oluşturur. Bu yüzden Stafilocoklarla duyarlılık testlerinin uygun koşullarda yapılması önerilmektedir(Törenci, 1989).

1.6. β -laktamazlar

1.6.1. β -laktamaz Tarihçesi

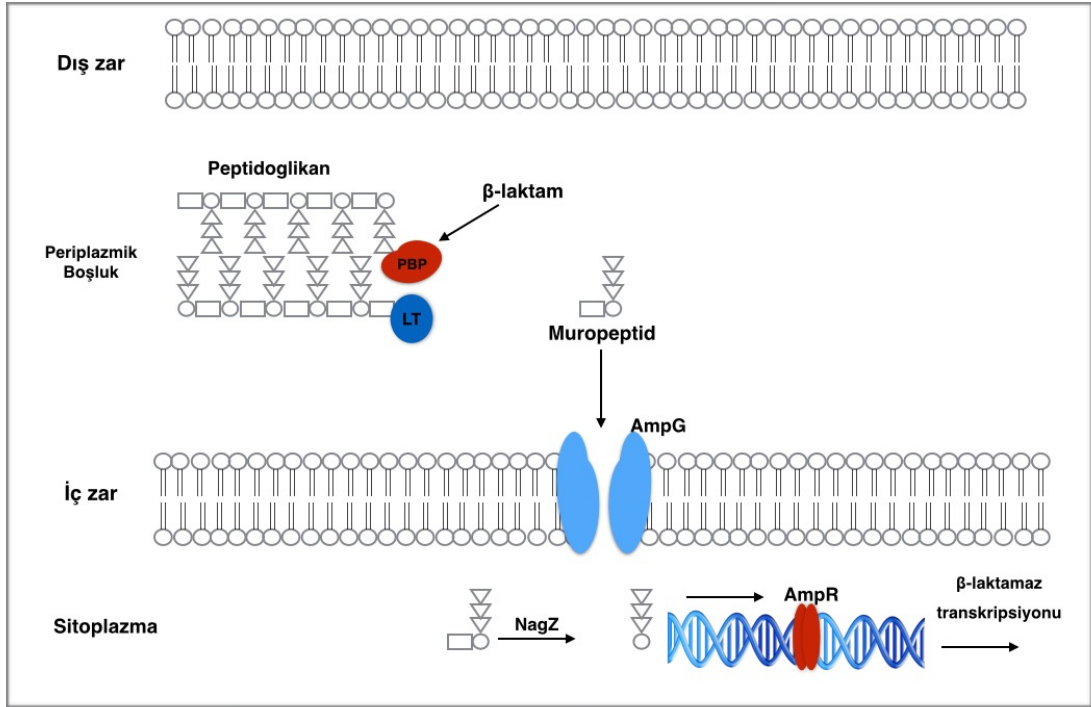
β -laktam direnci ilk olarak penisilin antibiyotiğine karşı gelişmiştir. İlk β -laktamaz *E.coli*'de penisilin medikal tedavide kullanılmadan önce keşfedilmiştir. Plazmit kökenli penisilinaz *Staphylococcus aureus* ve diğer *Staphylococcus* türlerinde hızlı bir şekilde yayılmıştır. Gram negatif bakterilerin birçok cinsinde β -laktamazlar kromozomal kökenlidir, doğal olarak bulunurlar. Bu enzimler penisilin bağlayıcı proteinlere sekans homolojisi açısından benzer olduklarından bu enzimlerin penisilin bağlayıcı proteinlerden (PBP) evrimleştiği düşünülmektedir. Bu evrimleşmenin çevrede bulunan toprak organizmalarının üzerindeki seçici baskıdan kaynaklandığı düşünülmektedir. 1960'ların başında Gram negatiflerde ilk plazmit kökenli β -laktamaz, TEM-1 tanımlanmıştır. TEM-1 Yunanistan'da Temoniera adlı hastadan alınan kan kültüründen

izole edilen bir *E. coli* suşunda bulunmuştur, bu nedenle TEM olarak adlandırılmıştır. Plazmit ve transpozon aracılı yayılım TEM-1'in diğer bakteri türlerine geçişine neden olmuştur. TEM-1'in ilk izolasyonundan sonra birkaç yıl içinde dünya geneline yayılmıştır ve *Enterobacteriaceae* ailesindeki farklı türlerde, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*'da tespit edilmiştir. Diğer bir yaygın plazmit aracılı β -laktamaz SHV-1 (sülfidril değişken) *Klebsiella pneumoniae* ve *E. coli*'de bulunmuştur. SHV-1 *Klebsiella pneumoniae*'da çoğunlukla kromozomal kökenliken *E. coli*'de plazmit kökenlidir. β -laktamazların hidrolitik etkisine karşı dirençli yeni antibiyotikler geliştirilmiştir. Bu yeni antibiyotik gruplarından biri 1980'lerde Gram negatif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan oksiminino-sefalosporinlerdir. Yeni ilaçlara karşı dirençli β -laktamazlar da ortaya çıkmıştır. Büyük ihtimalle, hastaların tedavisinde yeni antibiyotiklerin fazla kullanımı seçici baskı oluşturarak yeni β -laktamazların ortaya çıkmasına neden olmuştur. β -laktamazlar nedeniyle bu genişletilmiş spektrumlu β -laktamlara direnç hızlı bir şekilde ortaya çıkmıştır. Yeni β -laktamları hidroliz eden enzimlerden ilki olan SHV-2 Almanya'da izole edilen *Klebsiella ozaenae* suşunda bulunmuştur (Bradford, 2001).

1.6.2. Gram Negatif Bakterilerde β -laktamaz Üretimi

β -laktamların bakterisidal etkisine karşı bakteride β -laktamaz üretimi gibi savunma mekanizmaları harekete geçer. β -laktam direncine, porinlerde ve PBP'lerde mutasyonlar da katkı sağlar. Gram negatif bakterilerde, β -laktamazlar hücrede ya sürekli olarak yüksek seviyede üretilirler ya da β -laktamların düzenleyici sistemlerle etkileşime geçmesiyle üretimleri uyarılır. Gram negatif bakterilerde, β -laktamaz üretiminin uyarılmasını sağlayan iki temel mekanizma keşfedilmiştir. Birincisi, AmpG-AmpR-AmpC düzenleyici sistemidir. Bu yolak, β -laktamlara maruz kalınmasıyla bozulan peptidoglikan metabolizması sonucu oluşan 1,6-anhidro-N-asetil muramik asitin sitoplazmada birikmesine neden olur. Bu peptidoglikan alt birimi AmpR ile etkileşime geçerek β -laktamaz transkripsiyonunu uyarır. AmpR, *ampC*'nin yukarı bölgesinde bulunan transkripsiyonel düzenleyicidir. AmpG-AmpR-ampC sistemi Şekil 5'te şematize edilmiştir. İkincisi, iki bileşenli düzenleyici sistemdir. Bunların dışında da β -

laktamaz üretimin düzenleyen sistemler mevcuttur (Zeng ve Lin, 2013). Karbapenem stresine maruz bırakılan *A. baumannii*'de RND efluks transportörleri, lipaz, rekombinasyon ilişkili proteinlerin üretimi artarken protein salgılama sistemi, biyofilm-ilişkili proteinlerin üretimi azalır. Bakteride bazı mekanizmaların baskılanıp bazılarının harekete geçmesi, değişen çevre şartlarına adaptasyona yardımcı olur (Chang vd., 2014).



Şekil 5. β-laktamaz üretiminin uyarılması modeli. LT: Litik transglikozilaz (Zeng ve Lin, 2013)

1.6.3 β-laktamazların Sınıflandırılması

1.6.3.1. Bush-Jacoby Sınıflandırması

Karen Bush 1989'da substratları (penisilin, oksasilin, karbenisilin, sefaloridin, genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve imipenem) üzerindeki etkilerine ve klavulanik asit tarafından inhibisyon duyarlılıklarına göre β-laktamazları sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırma 1995'te Karen Bush, George Jacoby ve Antone Medeiros tarafından güncellenmiştir ve 2009'da tekrar revize edilmiştir. Bu sınıflandırma β-laktamazları üç gruba ayırmakta ve her grubun içinde alt gruplar bulunmaktadır.

1.6.3.1.1. Grup 1

Sefalosporinazlardır. Kloksasilin ve aztreonam tarafından inhibe edilirken klavulanik asit tarafından inhibe edilemezler. Sefoksitin gibi sefamisinlere karşı etkilidirler. Yüksek seviyede üretildiklerinde özellikle ertapenem olmak üzere karbapenemlere direnç sağlarlar. Bu gruba CMY, ACT, DHA, FOX ve MIR örnek olarak verilmektedir. AmpC tipi β -laktamazlar, seftazidime ve diğer oksiiimino-sefalosporinlere karşı yüksek afinite gösterirler.

1.6.3.1.2. Grup 2

Grup 2, 11 alt gruptan oluşur. Bunlar;

- 1) **Alt grup 2a:** Gram pozitif koklarda görülen penisilinazlardır. Nitrosefini hidroliz ederler. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilirler (PC1).
- 2) **Alt Grup 2b:** Sefaloridin ve sefalotin gibi sefalosporinleri hidroliz ederler. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilirler (TEM-1, TEM-2 ve SHV-1).
- 3) **Alt Grup 2be:** GSBL'ler 2b grubundan köken alır. Sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi bir ya da daha fazla oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz ederler (TEM, SHV, CTX-M, BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, PER, VEB). Klavulanik asit tarafından inhibisyona duyarlıdırlar.
- 4) **Alt Grup 2br:** Yapısal olarak 2b grubundaki enzimlere benzemekle beraber β -laktamaz inhibitörleri tarafından zayıfça inhibe edilirler [inhibitör dirençli TEM (IRT)]. Bu gruba TEM-30 ve SHV-10 örnek olarak verilebilir.
- 5) **Alt Grup 2ber:** Klavulanik asit tarafından inhibisyona dirençli, TEM'den köken alan oksiiimino-sefalosporinlere karşı hidrolitik aktivitesi olan enzimlerdir. Kompleks Mutant TEM olarak adlandırılırlar (CMT). TEM-50, -68 ve -89 örnek olarak verilebilir.

- 6) **Alt Grup 2c:** Karbenisilin veya tikarsilini kloksasilin veya oksasiline göre daha yüksek oranlarda hidroliz eden enzimlerdir. Klavulanik asit veya tazobaktam tarafından kolaylıkla inhibe edilirler (PSE-1 ve CARB-3).
- 7) **Alt Grup 2d:** Kloksasilin veya oksasilin hidroliz ederler. OXA enzimleri olarak bilinirler (OXA-1, -2, -10).
- 8) **Alt Grup 2de:** Oksiimino- β -laktamları hidroliz eden OXA-GSBL enzimleri bu gruba dahildir. Sefotaksim veya aztreonam direncine nazaran seftazidim direncine daha sık rastlanır. OXA-11 ve OXA-15 örnek olarak verilebilir.
- 9) **Alt Grup 2df:** Serin karbapenamazlardır. Oksasilin ve karbapenemleri hidroliz ederler (OXA-23, -48). Sıklıkla *A. baumannii*'de kromozomal kökenli olarak bulunurlar.
- 10) **Alt Grup 2e:** Genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz ederler, penisilinlere karşı etkileri zayıftır ve klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilirlerken aztreonam tarafından inhibe edilmezler. AmpC enzimlerinden aztreonama karşı zayıf afiniteleriyle ayrılırlar (CepA).
- 11) **Alt Grup 2f:** Serin karbapenamazlardır. Karbapenemleri, oksiimino-sefalosporinleri ve sefamisinleri hidroliz ederler (KPC-2, IMI-1, SME-1, GES).

1.6.3.1.3. Grup 3

Aktif bölgelerinde çinko atomu bulunduran metallo β -laktamazlardır. Serin β -laktamazlarla karşılaştırıldıklarında monobaktamlar için zayıf hidrolitik kapasiteleri vardır ve klavulanik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilmezler. EDTA gibi metal iyon şelatörleriyle inhibe edilirler. IMP, VIM gibi plazmit kökenli metallo β -laktamazlar, Alt Grup 3a'ya dahildir ve hidrolitik aktiviteleri için iki çinko atomuna gereksinim duyarlar. Ayrıca L1, CAU-1, GOB-1 ve FEZ-1'de bu gruba dahildir. Penisilinler ve sefalosporinlere nazaran karbapenemleri daha iyi hidroliz eden Alt Grup 3b üyeleri, aktif bölgelerinde tek bir çinko atomu bulunur (CphA, Sfa-1) (URL-1, 2013).

1.6.3.2. Ambler Sınıflandırması

1980'de β -laktamazların amino asit sekanslarına dayanan diğeri bir sınıflandırma RP Ambler tarafından yapılmıştır. Başlangıçta serin ve metallo β -laktamaz olarak (sınıf A, B) β -laktamazları iki gruba ayırmıştır. Sınıf C sefalosporinazlar Jaurin ve Grundstrom tarafından 1981'de tanımlanmıştır. 1980'lerin sonlarına doğru sınıf D oksasilin hidroliz eden enzimler sınıflandırılmaya dahil edilmiştir.

1.6.3.2.1. Sınıf A β -laktamazlar

Aktif bölgelerinde serin bulunduran kromozomal ya da plazmit kökenli penisilinaz, sefalosporinazlar ve karbapenemazları içermektedir (PC1, TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-2, TEM-3, CTX-M-15, TEM-30, SHV-10, TEM-50, CARB-3, KPC-2, IMI-1, SME-1).

1.6.3.2.2. Sınıf B β -laktamazlar

Aktif bölgelerinde çinko bulunduran karbapenemazlardır. Metallo β -laktamazlar olarak adlandırılırlar. Penisilinleri, sefalosporinleri, karbapenemleri hidroliz ederler, β -laktamaz inhibitörlerine karşı dirençlidirler. Aztreonamı hidroliz edemezler. Kromozomlarda, plazmitlerde ya da integronlarda yerleşim gösterirler (IMP, VIM, NDM, GIM ve IND).

1.6.3.2.3. Sınıf C β -laktamazlar

Aktif bölgelerinde serin bulunduran sefalosporinazlardır. Plazmit ya da kromozomal kökenli olabilirler. Aminopenisilinlere, oksiminio-sefalosporinlere, sefamisinlere ve β -laktamaz inhibitörlerine dirençlidir. Yüksek seviyede ifadeleri sefotaksim, seftazidim ve seftriakson gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere direnç sağlar. AmpC enzimleri sefepimleri zayıf bir şekilde hidroliz ederler ve kloksasilin, oksasilin ve aztreonam tarafından inhibe edilirler. Gram negatif bakterilerde

kromozomal AmpC düşük seviyede ifade olur, *ampR* veya *ampD* genlerinde mutasyonla veya sefoksitin gibi β -laktamlar tarafında uyarılmayla yüksek seviyede ifade edilirler.

1.6.3.2.4 Sınıf D β -laktamazlar

Bu gruptaki β -laktamazlar benzilpenisiline göre oksasilin hidroliz oranları yüksek olduğundan oksasilinaz (OXA tip β -laktamazlar) olarak adlandırılırlar. Bu enzimler penisilinlere ve sefalosporinlere direnç sağlar. OXA-tip GSBL'ler (OXA-11, OXA-15) oksiiimino-sefalosporinlere direnç sağlar. OXA-tip karbapenemazlar (OXA-23, OXA-48) karbapenemleri hidroliz edebilirler. Çoğu OXA-tip enzimler klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam tarafından inhibisyona dirençlidirler. Fakat OXA-2 ve OXA-32 tazobaktam tarafından inhibe edilir (URL-1, 2013). β -laktamazlara ait gruplar, bu gruplara dahil olan örnekler ve bu örneklerin alel sayısı Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. β -laktamazların Sınıflandırılması (URL-3, 2015; URL-4, 2015)

Ambler Sınıfı		Bush-Jacoby Sınıfı	Enzim Adı	Alel Sayısı
Serin	A	2b	TEM	223
Serin			SHV	193
Serin			CTX-M	172
Serin			PER	8
Serin			VEB	16
Serin			BEL	3
Serin		2f	KPC	24
Serin			GES	27
Serin			IMI	11
Serin			SME	5
Serin		2c	CARB	44

Tablo 3 (devam). β -laktamazların Sınıflandırılması (URL-3, 2015; URL-4, 2015)

Ambler Sınıfı		Bush-Jacoby Sınıfı	Enzim Adı	Alel Sayısı	
Serin	A	sınıflandırılmamış	penP	-	
Serin	D	2d	OXA	498	
Serin	C	1	CMY	136	
Serin			MOX	11	
Serin			CFE	1	
Serin			LAT	1	
Serin			DHA	23	
Serin			FOX	12	
Serin			ACC	5	
Serin			ACT	38	
Serin			MIR	18	
Serin			sınıflandırılmamış	ampC	-
Metallo			B	3	IMP
Metallo	VIM	46			
Metallo	NDM	16			
Metallo	GIM	2			
Metallo	IND	15			
Metallo	sınıflandırılmamış	bla2			-

1.7. OXA-tipi β -laktamazlar

Mikroorganizmalar, antibiyotik üreten toprak bakterilerine karşı savunma için antibiyotiklere direnç sağlayan genleri kromozomlarında bulundurabilirler. İmipenem toprak bakterisi *Streptomyces cattleya* ürettiği tienamisin türevidir. Bu yüzden toprak bakterilerinin karbapenem hidrolizleyen enzimlere sahip olması adaptasyona katkı sağlar. Bu doğal seçici baskı ile organizmalarda bulunan enzimlerde karbapenemaz aktivitesi gelişir ya da organizmalar başka organizmalardan plazmitler aracılığıyla bu

genleri kazanırlar. Plazmitler aracılığıyla aktarılan genler plazmitlerde kalabilir ya da rekombinasyon ile kromozoma entegre olurlar. *bla_{OXA}* genleri milyonlarca yıldır plazmitlerde bulunmaktadır ve hareketli OXA-tipi karbapenemazların ataları uzun yıllar önce kaybolmuştur. OXA-tipi karbapenemaz üreten ilk izolat İskoçya'da tanımlanan OXA-23 üreten *A. baumannii*'dir. İzolat, imipenem genel kullanıma girdiği zamanlara yakın bir dönemde ya da öncesinde tanımlanmıştır. Aynı zamanda karbapenem hidrolizleyen sınıf A β -laktamazlar da imipenem klinik kullanıma girmeden önce keşfedilmiştir. Bu bulgular imipenemin sınıf A ve D karbapenemazların ortaya çıkmasında etkili olmadığını, bu enzimlerin bakterilerde daha önce var olduğunu düşündürmektedir.

İlk tanımlanan sınıf D β -laktamazlar, benzilpenisilinden oksasilini daha hızlı hidroliz ettiklerinden dolayı oksasilinazlar olarak da bilinmektedirler. 2006 yılına kadar 121 sınıf D β -laktamaz varyantı protein seviyesinde tanımlanmış ve bunların 45'inin karbapenem hidrolizleme aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir. Sınıf D β -laktamazlar yaygın olarak korunmuş 3 aktif bölgeye sahiptir. Bunlar Ser70-X-X-Lys, Ser118-X-Val/ Ile ve Lys216-Thr/Ser'dir. Tyr/Phe144-Gly-Asn ve Trp232-X-X-Gly diğer korunmuş motiflerdir.

Sınıf D β -laktamazlar amino asit dizileri karşılaştırılarak 8 alt grup altında toplanmıştır. Her gruptaki üyeler arasında dizi benzerlikleri % 92,5 iken gruplar arası benzerlik % 40-70'tir. Birinci grup, OXA-23, OXA-27 ve OXA-49'dan oluşmaktadır. Bu enzimler iki ya da beş amino asit ile birbirlerinden ayrılırlar. İkinci grup OXA-24, -25, -26 ve OXA-72'den oluşmaktadır ve birbirlerinden bir ya da iki amino asit farkla ayrılırlar. Üçüncü grup, OXA-51 ailesidir. Dördüncü grup sadece OXA-58'den oluşmaktadır. OXA-51 grubu yeni OXA-tipi karbapenemazları ve OXA-64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -75, -76, -77 ve OXA-78'i içermektedir. Bu gruba ait enzimler 1-15 amino asit ile birbirlerinden farklılaşmıştır ve doğal olarak *A. baumannii*'de bulunabilmektedirler. Beşinci grup, kromozomal kökenli OXA-55 ve OXA-SHE içermekte ve bu iki enzim beş amino asitle birbirinden ayrılmaktadır. Plazmit kökenli OXA-48 ve kromozomal kökenli OXA-54 altıncı grubu oluşturur ve bu iki enzim 20

amino asit ile farklılaşır. Yedinci grup, OXA-50 üyeleri arasında 1-5 amino asit fark varken, sekizinci grup, OXA-60 üyeleri arasında 1-21 amino asit farkı vardır. OXA-tipi β -laktamaz gruplarına ait örnekler ve bu örneklerin izolasyon tarihleri, izole edildiği ülkeler Tablo 4’ te verilmiştir.

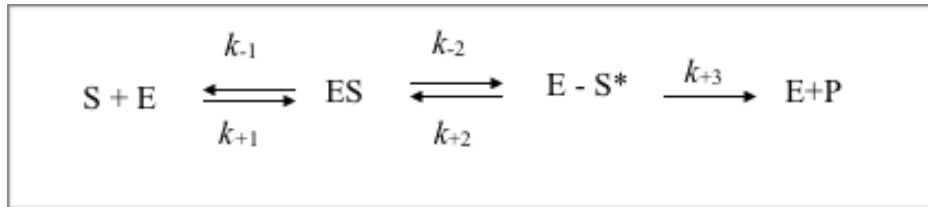
Tablo 4. OXA tipi β -laktamazlar

Gruplar	Enzim adı	Bakteri	İzolasyon Tarihi	İzole Edildiği Ülke
1. Grup	OXA-23	<i>A. baumannii</i>	1985	İngiltere
2. grup	OXA-24	<i>A. baumannii</i>	1997	İspanya
2. Grup	OXA-25	<i>A. baumannii</i>	-	İspanya
2. Grup	OXA-26	<i>A. baumannii</i>	-	Belçika
1. Grup	OXA-27	<i>A. baumannii</i>	-	Singapur
2. Grup	OXA-40	<i>A. baumannii</i>	1997	Fransa
6. Grup	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	2001	Türkiye
1. Grup	OXA-49	<i>A. baumannii</i>	-	Çin
7. Grup	OXA-50	<i>P. aeruginosa</i>	2000	Güney Kore
3. Grup	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	1994	Arjantin
6. Grup	OXA-54	<i>S. oneidensis</i>	-	-
5. Grup	OXA-55	<i>S. algae</i>	2001	Fransa
5. Grup	OXA-SHE	<i>S. algae</i>	-	-
4. Grup	OXA-58	<i>A. baumannii</i>	2003	Fransa
8. Grup	OXA-60	<i>R. pickettii</i>	2003	-
3. Grup	OXA-64	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	Güney Kore
3. Grup	OXA-65	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	Arjantin
3. Grup	OXA-66	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	İspanya
3. Grup	OXA-68	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	İspanya

Tablo 4 (devam). OXA tipi β -laktamazlar

Gruplar	Enzim adı	Bakteri	İzolasyon Tarihi	İzole Edildiği Ülke
3. Grup	OXA-69	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	Türkiye
3. Grup	OXA-70	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	Hong Kong
3. Grup	OXA-71	<i>A. baumannii</i>	1996-2000	Kore
2. Grup	OXA-72	<i>A. baumannii</i>	-	Tayland
3. Grup	OXA-75	<i>A. baumannii</i>	1997	Fransa
3. Grup	OXA-76	<i>A. baumannii</i>	1999	Fransa
3. Grup	OXA-77	<i>A. baumannii</i>	-	-
3. Grup	OXA-78	<i>A. baumannii</i>	-	Türkiye

OXA-tipi karbapenemazlar, 243-260 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlıkları 23-35,5 kDa'dır. OXA-69 dimer yapısında olan ilk karbapenemazdır. İzoelektrik noktaları 5,1-9,0 arasında değişir. Serin β -laktamazların aktivitesi, açılasyon ve deaçilasyonu içeren üç basamaklı bir modelle açıklanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Serin A β -laktamazların aktivitesini açıklayan model (Rasmussen ve Høiby, 2006)

Bu modelde k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , k_{-2} ve k_{+3} mikroskobik oran sabitleridir. Açılasyon k_{+2} ile gösterilirken, deaçilasyon k_{+3} ile gösterilmektedir. k_{cat}/K_m açılasyonun, k_{cat} deaçilasyonun karşılığıdır. Denge durumu kinetik sabitleri birçok OXA-tipi karbapenemaz için belirlenmiştir. Çok düşük K_m ve k_{cat} değerleri yüksek k_{cat}/K_m neden olur. k_{cat} ve k_{cat}/K_m birlikte β -laktamazın β -laktamlara karşı gerçek katalitik etkinliğini gösterir. β -laktam hidrolizi için çok düşük k_{cat} değeri olsa bile, organizma periplazmaya yüksek konsantrasyonda β -laktamaz salgılayarak β -laktamı etkili bir şekilde hidroliz

edebilir. V_{max} , k_{cat} ve $[E]$ ' nin ürünüdür. Düşük k_{cat} yüksek enzim konsantrasyonu ile dengelenebilir.

OXA-tipi β -laktamazlarda Ser67 (OXA numaralandırılması) enzimatik katalizde kullanılan aktif bölge nükleofilidir. Serin β -laktamın karbonil grubuna bağlanarak dönüşümü başlatır. Daha sonra β -laktamdaki nitrojenin ayrılmasıyla açıl-enzim ara ürünü oluşur. Dönüşüm ikinci bir reaksiyon ile tamamlanır. Bu reaksiyonda kendi kendine aktifleşen su molekülü açıl-enzim kompleksinin karbonil grubundaki karbonuna nükleofilik atak yapar ve hidrolize olmuş β -laktam oluşur. Serin A β -laktamazlarda kataliz boyunca proton hareketini kolaylaştıran katalitik amino asitler bulunmaktadır. Sınıf A β -laktamazlarda glutamat-lizin, serin ve su molekülünü aktifleştiren katalitik amino asitlerdir. Sınıf C β -laktamazlarda lizin-tirozin amino asitleri bu işlevi görür. Sınıf D β -laktamazlarda katalitik residü, lizinin β -amininin karbondioksitle kendiliğinden translasyon sonrası modifikasyonla oluşan karbamat anyonudur. Karbamat anyonu serin ve su molekülünden proton kabul ederek genel baz olarak rol oynar. Karbamat oluşumu olmayınca sınıf D β -laktamazlar katalitik olarak inaktiftir. *In vitro* OXA kinetik çalışmalarında karbamat anyonu oluşumu için karbondioksit kaynağı (bikarbonat anyonu) kullanılmalıdır (Antunes ve Fisher, 2014).

Fenotipik olarak, birçok sınıf D β -laktamaz Bush-Jacoby sınıflandırmasına göre Grup 2d'de yer almaktadır. OXA-tipi karbapenemazlar penisilinleri (benzilpenisilin, ampisilin, piperasilin, tikarsilin), dar spektrumlu sefalosporinleri, sefalotini ve sefaloridini etkili bir biçimde hidroliz ederken, geniş spektrumlu sefalosporinleri (seftazidim, sefotaksim) ve aztreonamı ya zayıf bir şekilde hidroliz ederler ya da hiç edemezler. Çoğu OXA-tipi karbapenemazlar imipenem ve özellikle meropenem karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterir. OXA-69 dışındaki tüm OXA-tipi karbapenemazlar, karbapenemlere test edilen herhangi bir β -laktamdan daha yüksek afinite gösterirler (Tablo 5). Birçok OXA-tipi karbapenemaz, düşük k_{cat} ve yüksek K_m ile imipenem hidroliz aktivitelerini gösterirler. Meropenemi imipenemden daha düşük oranda hidroliz ederler. OXA-48 ve OXA-54'ün imipenemi diğer OXA-tipi karbapenemazlardan daha fazla hidrolizlediği tespit edilmiş ve bu enzimlerin imipenem için kinetik parametreleri

bazı metallo β -laktamazlara benzer bulunmuştur (Rasmussen ve Høiby, 2006). Sınıf D β -laktamazlar, klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilirler. Tüm OXA-tipi karbapenemazlar tazobaktam tarafından klavulanata göre daha etkili bir biçimde inhibe edilirler (Rasmussen ve Høiby, 2006). OXA-10 yeni β -laktamaz inhibitörü avibaktam tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilir, OXA-48 ise inhibe edilir. NaCl bazı OXA-tipi β -laktamazlar dışında (örneğin OXA-24/40) sınıf D β -laktamazların inhibitörüdür. NaCl inhibisyonu 144. pozisyondaki tirozin amino asiti ile ilişkilidir (Antunes ve Fisher, 2014).

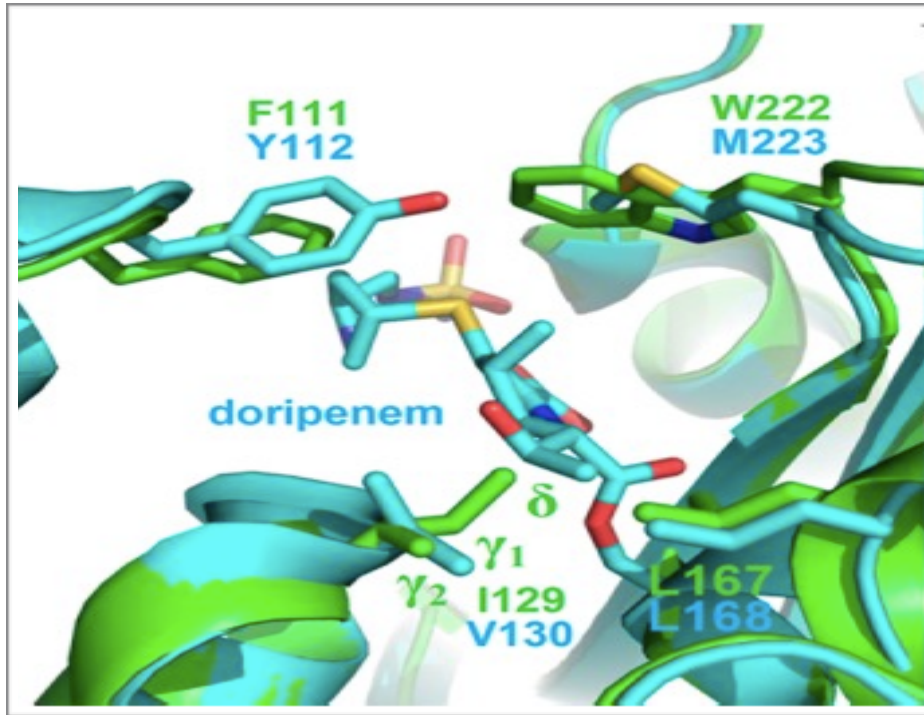
Tablo 5. Sınıf D β -laktamazların β -laktam antibiyotiklerine karşı kinetik değerleri

		AMP	CF	FEP	CAZ	AZT	IMI	DOR
OXA-1	k_{cat} (s^{-1})	520	2,7	34	-	-	-	-
	K_m (μM)	21	9	170	-	-	-	-
OXA-2	k_{cat} (s^{-1})	-	-	-	-	-	0,18	0,2
	K_m (μM)	-	-	-	-	-	≤ 2	≤ 2
OXA-10	k_{cat} (s^{-1})	143	8,3	-	-	-	0,041	0,037
	K_m (μM)	34	32	-	-	-	≤ 2	4,8
OXA-20	k_{cat} (s^{-1})	80	13	-	-	6	-	-
	K_m (μM)	33	5	-	-	69	-	-
OXA-23	k_{cat} (s^{-1})	-	-	-	$<0,01$	0,24	0,35	0,036
	K_m (μM)	-	-	-	-	2400	≤ 2	0,001
OXA-24/40	k_{cat} (s^{-1})	5	3	$<0,001$	$>0,01$	-	1,7	0,084
	K_m (μM)	220	72	-	-	>3000	≤ 2	≤ 2
OXA-48	k_{cat} (s^{-1})	340	3	1	4	-	6,7	0,14
	K_m (μM)	5200	20	160	5100	-	≤ 2	≤ 2
OXA-58	k_{cat} (s^{-1})	88	19	$<0,01$	≤ 2	$<0,01$	1,8	0,014
	K_m (μM)	77	190	-	-	-	6	≤ 2
OXA-69	k_{cat} (s^{-1})	0,06	0,004	-	-	$<0,01$	0,1	-
	K_m (μM)	240	190	-	-	-	3600	-
OXA-134	k_{cat} (s^{-1})	150	-	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	0,1	-
	K_m (μM)	250	-	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	10	-

1.7.1. OXA-51 Grubu

OXA-51 grubunun ilk üyesi Arjantin’de izole edilen *A. baumannii* suşunda bulunmuştur. OXA-51 kodlayan gen, *A. baumannii*’lerin kromozomlarında doğal olarak bulunur. 2014 yılına kadar OXA-51’ in 95 varyantı tanımlanmıştır (OXA-51, OXA-64–OXA-71, OXA-75–OXA-80, OXA-82–OXA-84, OXA-86–OXA-95, OXA-98–OXA-100, OXA-104, OXA-106–OXA-113, OXA-115–OXA-117, OXA-120–OXA-128, OXA-130–OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148–OXA-150, OXA-172–OXA-180, OXA-194–OXA-197, OXA-200–OXA-203, OXA-206, OXA-208, OXA-216, OXA-217, OXA-219, OXA-223, OXA-241, OXA-242, OXA-248–OXA-250, OXA-254). Bu varyantlar, antibiyotik kullanımını oluşturduğu seçici baskı ile ortaya çıkmıştır ve antibiyotik direncinde önemli rol oynamaktadırlar. OXA-51 ve OXA-69’un kinetik özellikleri çalışılmıştır. Bu iki enzimin meropeneme ve imipeneme farklı afiniteleri olmasına karşı, karbapenemlere karşı iki enzim de zayıf hidrolitik aktivite göstermiştir. Bunun yanında bu enzimlerin *in vivo*’da izolatların karbapenemlere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarını önemli miktarda arttırdığı gözlenmiştir. OXA-51 grubuna ait enzimlerin duyarlı *A. baumannii* ve *A. nosocomialis* suşlarında karbapenem minimum inhibisyon konsantrasyonunda neden olduğu artışın kazanılmış OXA-tipi karbapenemazların neden olduğu artışa benzer olduğu bulunmuştur. OXA-51 grubu üyeleri ile sekans analizleri ve yapısal modellemeler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, β -laktam substratları OXA-51 modeline moleküler docking yöntemiyle yerleştirilmiş ve enzimin imipeneme en zayıf etkileşimi, seftazidim ile en güçlü etkileşimi kurduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu veriler seftazidimin hidrolizinin tespit edilmediği kinetik verilerle uyumsuzdur. Başka bir çalışmada, OXA-51’in oksasilinin parçalamayı termodinamik olarak imipenemi parçalanmasına tercih ettiği tespit edilmiştir (Evans ve Amyes, 2014). OXA-66, OXA-51 grubuna dahildir. Yapılan bir çalışmada OXA-66 *Acinetobacter baumannii* izolatlarında bulunmuş ve OXA-51 gibi imipenem direncinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Hu vd., 2007; Gonzalez vd., 2010).

OXA-51'in I129L ve L167V mutant enzimleri kinetik olarak karakterize edilmiş (Tablo 6) ve moleküler modelleme yöntemiyle incelenmiştir. OXA-51 ampisiline karşı yüksek K_m ve düşük k_{cat} göstermiştir. OXA-51'in karbapenemlere afinitesi yüksek bulunmuş fakat bu değerlerin OXA-23 ve OXA-24/40'ta görülen değerler kadar yüksek olmadığı belirtilmiştir. OXA-51 mutantlarının karbapenemlere afinitesinin OXA-51'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Modelleme çalışmaları I129'un metil grubunun tüm karbapenemlerde bulunan hidroksietil grubuyla çatıştığını göstermiş ve bunun OXA-24/40'a göre OXA-51'in karbapenemlere düşük afinitesinin nedeni olabileceği düşünülmüştür. Mutantların hidroksietil grubuyla çakışmadan başka bir yöne rotasyon yaptığı PyMOL programı kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 7). OXA-51 modeli, diğer sınıf D karbapenemazlarda bulunan hidrofobik köprünün OXA-51'de de bulunduğunu düşündürmüştür. OXA-51'de 222. pozisyonda triptofan bulunurken, OXA-24/40 ve OXA-23'te metiyonin bulunmaktadır. W222, OXA-51 konformasyonel esnekliğini azaltarak, ampisiline daha zayıf bağlanmasına neden olmuştur (Mitchell ve Leonard, 2014).



Şekil 7. OXA-24/40-doripenem (3PAE) (mavi) ve OXA-51/doripenem (yeşil) PyMOL gösterimi (Mitchell ve Leonard, 2014)

Tablo 6. OXA-51, OXA-51 I129L, OXA-51 L167V kinetik parametreleri (Mitchell ve Leonard, 2014)

	K_m (μM)	K_s (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
OXA-51				
Ampisilin	>10000		>25	
İmipenem	105±3	>79	0,66±0,005	0,0063±0,0002
Doripenem	4,7±0,2	>4,1	0,0730±0,0009	0,016±0,001
Sefotaksim			<0,02	
Seftriakson			<0,02	
Aztreonam			<0,02	
Sefoksitin			<0,02	
OXA-51 I129L				
Ampisilin	9100±900		160±6	0,018±0,002
İmipenem	<2	0,61±0,094	0,330±0,008	0,54±0,08
Doripenem	<2	0,110±0,010	0,140±0,003	1,4±0,2
Sefotaksim			<0,02	
Seftriakson			<0,02	
Aztreonam			<0,02	
Sefoksitin			<0,02	
OXA-51 L167V				
Ampisilin	8000±600		470±12	0,058±0,004
İmipenem	<2	0,190±0,040	0,150±0,003	0,81±0,20
Doripenem	<2	<0,05	0,032±0,002	>0,70
Sefotaksim			<0,02	
Seftriakson			<0,02	
Aztreonam			<0,02	
Sefoksitin			<0,02	

1.8. Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar (GSBL)

3. kuşak sefalosporinler β -laktamaz aracılı antibiyotik direnci ile savaşmak için 1980'li yılların başlarında klinik kullanıma sunulmuştur. Aminoglikozitlere ve

polimiksinlere göre düşük nefrotoksiteleriyle 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımı, ampisilin hidrolize eden TEM-1 ve SHV-1 gibi β -laktamazları barındıran bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde yararlı olmuştur. Ancak 1983'te genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri parçalayan plazmit kökenli bir β -laktamaz keşfedilmiştir. Bu β -laktamazı kodlayan gen, SHV-1'i kodlayan genden yalnızca tek nükleotidlik bir fark göstermiştir. Daha sonra, TEM-1 ve TEM-2'ye benzeyen fakat genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere direnç sağlayan β -laktamazlar ortaya çıkmıştır. Genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz ettiklerinden bu enzimler genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılmıştır.

Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar, penisilinleri, 1., 2. ve 3. kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz ederken, klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilirler. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasına göre GSBL'ler genellikle 2be grubu altında toplanır. Bunun yanısıra 2d, 2e ve 2f grubuna dahil GSBL özelliği gösteren varyantlarda ortaya çıkmıştır. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazları barındıran 2be, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi β -laktamazları barındıran 2b sınıfının alt grubudur. 2b grubuna dahil olan β -laktamazlar, penisilin ve ampisilini hidroliz ederken, genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz edemezler. 2b grubundaki β -laktamazlarda meydana gelen amino asit değişimleri substrat spektrumlarının genişlemesine neden olmaktadır. GSBL'ler OXA tipi enzimler dışında Ambler sınıflandırmasına göre, moleküler sınıf A' da yer almaktadır.

1.8.1. TEM-tipi GSBL

TEM-tipi GSBL'ler TEM-1 ve TEM-2'den köken almıştır. TEM-1, ampisilini karbenisilin, oksasilin ve sefalotine göre daha iyi oranda hidroliz edebilmektedir. Bunun yanısıra, klavulanik asit tarafından inhibe edilmektedir. TEM-2 ve TEM-13, TEM-1 ile aynı hidrolitik profili paylaşmaktadır. TEM-1, TEM-2 ve TEM-13 genişlemiş spektrumlu β -laktamaz değildir. Bununla birlikte, 1987'de *Klebsiella pneumoniae* izolatında sefotaksim hidroliz edebilen plazmit kökenli β -laktamaz bulunmuştur ve CTX-1 olarak adlandırılmıştır. Bu enzim, TEM-3 olarak yeniden adlandırılmıştır.

TEM-3, TEM-2'den iki amino asitle farklılaşmıştır. 1982'de TEM-3'ten önce seftazidim hidroliz eden plazmit kökenli β -laktamaz keşfedilmiştir ve şimdi bu β -laktamaz TEM-12 olarak bilinmektedir. Günümüze kadar çok sayıda TEM tipi β -laktamaz tanımlanmıştır ve bunların büyük çoğunluğu GSBL'dir.

1.8.2. SHV-tipi GSBL

SHV-tipi GSBL'ler, klinik izolatlarda diğer GSBL'lere oranla daha sık tespit edilmiştir. 1983'te seftoksimi hidroliz eden β -laktamazu barındıran *Klebsiella ozaenae* izolatı keşfedilmiştir. SHV-1 ile karşılaştırıldığında, 238. pozisyonda glisinine serine dönüşümünün genişlemiş spektrum özelliğini kazandırdığı görülmüştür. SHV-tipi GSBL barındıran *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. izolatları da rapor edilmiştir.

1.8.3. CTX-M-tipi GSBL ve Toho

CTX-M-tipi β -laktamazlar, seftoksimi seftazidimden daha iyi hidroliz ederler. Bununla birlikte CTX-M tipi GSBL'ler seftazidimi yüksek oranda hidroliz edebilme yeteneğini kazanmıştır. Toho-1 ve Toho-2 yapısal olarak CTX-M'e benzemektedir ve CTX-M'lerde olduğu gibi seftazidime göre seftoksimi daha iyi hidroliz etme potansiyelleri vardır. CTX-M tipi GSBL'ler hızlıca dünya geneline yayılmıştır.

1.8.4. OXA-tipi GSBL

Oksasilin ve kloksasilini benzilpenisilinden daha iyi hidroliz eden OXA tipi β -laktamazlar, çoğunlukla *Pseudomonas aeruginosa*'da tespit edilmiştir. Çoğu OXA tipi β -laktamaz genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz edemezler. OXA-10, seftoksim, seftriakson ve aztreonamı zayıf bir şekilde hidroliz ederek, genişlemiş spektrumlu β -laktamaz özelliği göstermiştir. Diğer OXA tipi GSBL'ler, OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35, ve -45'tir.

1.8.5. PER-tipi GSBL

PER-tipi GSBL'ler, TEM ve SHV tipi GSBL'lerle % 25-27 homoloji gösterirler. PER-1, penisilinleri ve sefalosporinleri hidroliz eder ve klavulanik asit tarafından inhibe edilir. PER-1 *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ve *Acinetobacter* izolatlarında tespit edilmiştir. Türkiye'de *Acinetobacter* spp. nozokomiyal izolatlarının % 46'sı ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının % 11'nin PER-1 ürettiği gözlenmiştir. PER-1 ile % 86 homoloji gösteren PER-2, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Vibrio cholerae* O1 El Tor'da tespit edilmiştir.

1.8.6. VEB-1, BES-1 ve Diğer GSBL'ler

VEB-1, PER-1 ve PER-2'ye % 38 homoloji göstermekte ve seftazidim, sefotaksim ve aztreonama karşı yüksek seviyede dirence neden olmaktadır. VEB tipi β -laktamazlar, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında tespit edilmiştir. GES, BES, TLA, SFO ve IBC değişik coğrafik alanlarda yayılım gösteren diğer genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardır (Paterson ve Bonomo, 2005).

1.8.7. GES-tipi GSBL

Genişlemiş spektrumlu β -laktamazların yeni ailesi Guyana genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GES) Ambler moleküler A sınıfına dahildir ve günümüze kadar 27 aleli tespit edilmiştir. Çeşitli genişlemiş spektrumlu β -laktamazları içeren bir çok β -laktamı hidroliz etmelerinin yanı sıra zayıf karbapenem hidrolizi ve β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmeleri ile tanımlanırlar. GES tipi β -laktamazları kodlayan genler genelde sınıf 1 integronlarda lokalize olmuştur. GES tipi GSBL'ler, çift disk sinerji testi ile fenotipik olarak tespit edilebilir. Klavulanat ve seftazidim, sefotaksim, sefepim, imipenem veya aztreonamdan birini içeren diskler kullanılabilir. *P. aeruginosa*'da GES-1'in fenotipik olarak belirlenmesi için seftazidim/seftazidim-klavulanat ve

sefepim/sefepim-klavulanat içeren E-test çubukları kullanılmıştır (Weldhagen, 2006). GES tipi β -laktamazların orijinleri ve enzimatik özellikleri Tablo 7’de özetlenmiştir.

GES-1’in, sefalosporinleri ve penisilini hidroliz ettiği, imipenem tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir. GES-1’in sefalosporinlere karşı olan afinitesinin TEM ve SHV-tipi GSBL’lerden daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. GES-1 amino asit dizisi, kromozom kökenli sınıf A sefalosporinaz, dar spektrumlu karbenisilinaz ve YENT’in amino asit dizileriyle % 36 oranında benzemektedir. GES-1, TEM-1, TEM-2, SHV-1, VEB-1, SFO-1, TOHO-1, TOHO-2, CTX-M-1-6, SME-1, NMC-A, IMI-1, PER-1 ve PER-2 ile amino asit dizilerine göre uzaktan ilişkilidir (Poirel vd., 2000).

GES-2, GES-1’den 170. pozisyonda glisin yerine asparajin bulunmasıyla farklılaşır. Glisinin asparajine dönüşümü enzimin imipenemi daha iyi hidroliz edebilmesine olanak sağlamıştır. β -laktamazlarda 69. ve 238. pozisyondaki amino asitler arasında oluşan disülfid köprüsü, enzimin katalitik bölgesinin imipeneme bağlanmasında rol oynar. GES-1 ve GES-2’de bu disülfid köprüsü oluşmaktadır. Ancak imipenemin hidrolizinde GES-2’de olduğu gibi (Gly170Asn) diğer residülerinde rol oynadığı düşünülmektedir. İnhibisyon deneyleri ile GES-2’nin GES-1’e göre tazobaktam ve klavulanik asite daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Poirel vd., 2001).

GES-4’te, GES-3’ten farklı olarak 170. pozisyonda glisin serine dönüşmüştür. GES-4 imipenemi ve sefamisinleri hidroliz edebilmektedir. Aynı zamanda GES-3’e göre β -laktamaz inhibitörlerine daha dirençlidir (Wachino vd., 2004). 170. pozisyonda glisin serin dönüşümü GES-5’in imipeneme karşı aktivitesini arttırmıştır (Baea vd., 2007).

GES-9’un, GES-1’den farkı 243. pozisyonda glisin yerine serin bulundurmasıdır. Ambler 243, CTX-M tipi β -laktamazlarda substrat hidroliz profilinin genişlemesinde rol oynayan 240. pozisyonun yanındadır. GES-9’da Gly243Ser değişiminin aztreonam hidrolizini arttırdığı gözlenmiştir (Poirel vd., 2005).

GES-11 243. pozisyonunda glisin yerine alanin bulundurur. GES-11'den GES-12 237. pozisyonunda treonin yerine alanin bulundurmasıyla, GES-14 ise 170. pozisyonunda glisin yerine serin bulundurmasıyla farklılaşır. 243. pozisyonda glisinin alanine değişiminin, GES-11'de GES-1 ile karşılaştırıldığında sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi oksimino- β -laktamların hidrolizlerini arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, GES-11 170. pozisyonda glisin bulundurur ve imipenem hidrolizi zayıftır. Ambler moleküler sınıf A β -laktamazlar 237. pozisyonlarında genellikle treonin bulundururlar. 237. pozisyon sınıf A β -laktamazların substrat seçiminde önem rol oynamaktadır. TEM, KOXY-2 ve SME-1'de bu pozisyonda alaninin treonine değişimi sefotaksime karşı katalitik etkinliği arttırmıştır. GES-12'nin, GES-11'e göre aztreonama ve seftazidime karşı iki kat fazla katalitik etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. GES-14'ün, 243. pozisyonunda glisin alanin ve 170. pozisyonunda glisin serin dönüşümü ile hem sefalosporinleri hem de karbapenemleri hidroliz ettiği gözlenmiştir. Aynı zamanda GES-14'te, GES-11 ve GES-5'e kıyasla sefoksitin hidrolizinin daha etkili olduğu keşfedilmiştir (Delbrück vd., 2012). GES-13, 104. pozisyonda lizin ve 170. pozisyonunda asparajin bulundurur. 170. pozisyonda asparajin bulundurmasına karşın GES-13'ün sefalosporinleri ve aztreonamı hidroliz ettiği ve imipenemi ölçülebilir oranda hidroliz edemediği gözlenmiştir (Kotsakis vd., 2010).

GES-18, GES-5'ten 80. pozisyonunda valin yerine izolösin, GES-1'den hem 80. pozisyonunda valin yerine izolösin hem de 170. pozisyonunda glisin yerine serin bulundurmasıyla farklılaşır. 80. pozisyonda valinin yerine izolösin bulunması GES-5 ile kıyaslandığında substrat profilinde herhangi bir değişime neden olmamıştır (Bebrone vd., 2013). GES-22 Türkiye kökenli *A.baumannii* izolatlarında tespit edilmiştir (Cicek vd., 2014; Castanheira vd., 2014). GES-22, GES-11'den 169. pozisyonunda metiyonin yerine lösin bulundurmasıyla farklılaşır. GES tipi β -laktamazların 169. pozisyonunda metiyonin bulunması tipiktir. GES-11 ve GES-22 sınıf 1 integron üzerinde lokalize olmuştur (Castanheira vd., 2014).

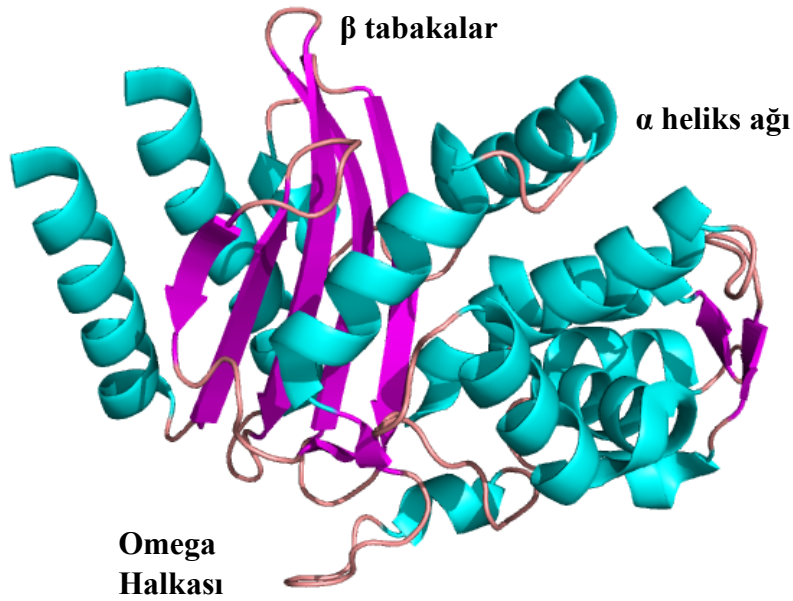
Tablo 7. GES-tipi β -laktamazlar

	Orijin	Bulunduğu bakteri türleri	Enzimatik Aktivite
GES-1	Fransa	<i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae</i>	Sefalosporin ve penisilin hidrolizi
GES-2	Güney Afrika	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporin ve penisilin hidrolizi
GES-3	Japonya	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sefalosporin, penisilin ve imipenem hidrolizi
GES-4	Japonya	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sefalosporin, penisilin ve imipenem hidrolizi
GES-5	Yunanistan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporin, penisilin ve imipenem hidrolizi
GES-6	Yunanistan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporin, penisilin ve imipenem hidrolizi
GES-7	Yunanistan	<i>Klebsiella pneumoniae, Aeromonas media, Aeromonas veronii</i>	-
GES-8	Yunanistan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
GES-9	Fransa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporin ve penisilin hidrolizi
GES-10	Avustralya	-	-
GES-11	Belçika	<i>Klebsiella oxytoca, Acinetobacter baumannii</i>	Sefalosporin ve penisilin hidrolizi
GES-12	Belçika	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sefalosporin ve penisilin hidrolizi
GES-13	Yunanistan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporin ve penisilin hidrolizi
GES-14	Belçika	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sefalosporin, penisilin ve imipenem hidrolizi
GES-15	Polonya	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
GES-16	Brezilya	<i>Serratia marcescens</i>	-
GES-17	Meksika	<i>Escherichia coli</i>	-
GES-18	Belçika	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporin, penisilin ve imipenem hidrolizi
GES-19	Meksika	<i>Escherichia coli</i>	-

Tablo 7 (devam). GES-tipi β -laktamazlar

	Orijin	Bulunduğu bakteri türleri	Enzimatik Aktivite
GES-20	Meksika	<i>Escherichia coli</i>	-
GES-21	Porto Riko	-	-
GES-22	Türkiye	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
GES-23	Meksika	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	-
GES-24	Japonya	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	-
GES-26	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

Sınıf A serin β -laktamazların tersiyer yapıları ve katalitik residüleri korunmuştur. Proteinlerin aktif bölgelerinin bir tarafında α heliks ağı ve bir tarafında beş β -tabaka bulunmaktadır. Aktif bölge cebinin aşağısında omega halkası bulunmaktadır. Diğer korunmuş motifler SXXK, KTG ve SDN'dir. Serin A β -laktamazlardaki tersiyer yapı (Şekil 8) ve korunmuş motifler GES tipi β -laktamazlarda da bulunmaktadır.



Şekil 8. GES-11 β -laktamaz kristal yapısının (3V3R) PyMOL gösterimi

Sınıf A β -laktamazlarda enzimin substrat profilini değiştiren birçok korunmuş amino asit bulunmaktadır. Bunlardan bazılarının katalitik etkileri ve GES tipi β -laktamazlardaki durumları Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. Serin A β -laktamazlarda korunmuş katalitik amino asitlerin etkileri ve bunların GES tipi β -laktamazlardaki durumları

Katalitik amino asit	Katalitik etki	GES tipi β -laktamazlar	
Ser70	Hidroksil oksijen β -laktam bağına nükleofilik atak yapar ve kovalent kompleks (E-S) oluşur.	Korunmuş	
Ser130	Substrat hidrolizi için β -laktam nitrojenine proton verir.		Cys130(GES-10)
Glu166	Serbest enzimin oluşması (deaçilasyon) için aktif bölge su molekülünü aktive eden katalitik bazdır. Ailasyonda da görev yapar.	Korunmuş	-
Gly238	β -tabakada yer alır. Aktif bölge cebi, GLy238Ser mutasyonu ile genişleyerek GSBL fenotipi kazanır.	-	Cys238 (tüm aleller)
Glu240	Gly238’ in yanında yer alır ve sefalosporin tanınmasında görev yapar.	-	Ala240 (tüm aleller)
Asp104	Büyük R1 yan zincirine sahip substratları tanımada görev yapar. Mutasyonlar genişlemiş spektrumlu β -laktamlara afinite de artışa neden olur.	-	Lys104 (GES-3, -6, -7, 13, -17) Glu104 (diğer aleller)
Arg244	Penisilinleri ve inhibitörlerin C3 karboksilatları ve sefalosporinlerin C4 karboksilatlarını tanır. Mutasyonlar inhibitör dirençli fenotiplerin oluşmasına neden olur.	Korunmuş	-

Penisilin G hidrolizinde GES-1’e göre yeni alellerin dönüşüm sayılarında artış gözlenirken substrata olan afinite de azalma gözlenmiştir. Yüksek k_{cat} ve K_m yeni GES alellerinde penisilin G’ye karşı katalitik etkinliği artırmıştır. Sefotaksime karşı GES alellerin dönüşüm katsayıları değişkenken, genel olarak afinite penisilin G’ye göre daha az bulunmuştur. GES alelleri için diğer sefalosporinler seftazidime ve sefalotine karşı

sefotaksime benzer kinetik parametreler tespit edilmiştir. Sefamisin grubunda yer alan sefoksitin hidrolizi genel olarak ölçülebilir değerin altında bulunmuştur. Fakat bazı aleller sefoksitini hidroliz edebilme özelliğini kazanmıştır. GES-1, -2, -3, -4 aztreonamı hidroliz edememektedir. GES-4'ten sonra aztreonam hidroliz edebilen aleller ortaya çıkmıştır. GES alellerinde imipenem hidrolizi sefoksitin hidrolizine benzer şekilde ya ölçülebilir değerin altındadır ya da çok zayıftır. Ambler pozisyonu 170'de meydana gelen mutasyonlar sonucu GES-5, GES-14 ve GES-18 gibi aleller imipenem hidroliz edebilme yeteneğini kazanmıştır. Tablo 9'daki veriler genel olarak değerlendirildiğinde GES alelleri penisilinleri hidroliz edebilmenin yanında sefalosporinleri hidroliz edebilme yeteneğini kazanmıştır. Sefalosporinaz ve penisilinaz yetenekleri yanısıra karbapenem ve sefamisin hidroliz edebilme yeteneğini kazanan aleller de mevcuttur.

Tablo 9. GES alellerinin kinetik parametreleri

		PEN	CTX	CAZ	CF	FOX	AZT	IMI
GES-1	k_{cat} (s ⁻¹)	2,8	68	380	179	0,9	ÖD	0,003
	K_m (μM)	40	4600	2000	3400	30	ÖD	45
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	70	15	188	52	33	ÖD	0,07
GES-2	k_{cat} (s ⁻¹)	0,4	2,2	ÖD	0,3	ÖD	ÖD	0,004
	K_m (μM)	4	890	>3000	3	ÖD	ÖD	0,45
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	96	2,5	ÖD	112	ÖD	ÖD	9
GES-3	k_{cat} (s ⁻¹)	15	120	23	-	ÖD	ÖD	ÖD
	K_m (μM)	33	1100	990	-	ÖD	ÖD	ÖD
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	450	110	23	-	ÖD	ÖD	ÖD
GES-4	k_{cat} (s ⁻¹)	130	17	2,5	-	85	ÖD	0,38
	K_m (μM)	160	700	1500	-	810	ÖD	4,7
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	780	24	1,5	-	110	ÖD	81
GES-5	k_{cat} (s ⁻¹)	317	2,9	0,3	49,7	9,6	-	1,2
	K_m (μM)	370	341	394	577	650	-	4,2
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	856,6	8,6	0,7	86,1	14,8	-	281

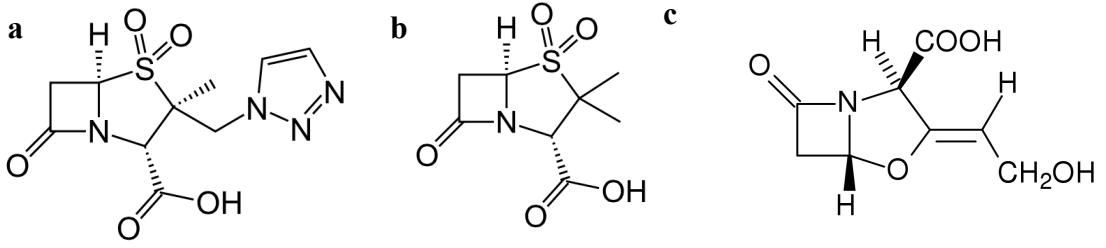
Tablo 9 (devam). GES alellerinin kinetik parametreleri

		PEN	CTX	CAZ	CF	FOX	AZT	IMI
GES-9	k_{cat} (s ⁻¹)	8	>10	>50	250	-	>300	<0,01
	K_m (μM)	12	>1500	>1000	850	-	>5000	ÖD
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	670	H	H	300	-	H	ÖD
GES-12	k_{cat} (s ⁻¹)	16	586	264	80	0,03	25	0,02
	K_m (μM)	60	9800	5350	5300	10	740	1
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	270	60	50	15	3	34	20
GES-13	k_{cat} (s ⁻¹)	13,5	69	30,4	10,1	-	35,6	<0,01
	K_m (μM)	139	63	229	106	-	405	ÖD
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	100	109	13	10	-	9	ÖD
GES-14	k_{cat} (s ⁻¹)	18	10	20	1,6	0,9	3,5	0,1
	K_m (μM)	200	4300	>5000	4800	163	>5000	2
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	90	2,5	1	0,5	5,4	>1000	50
GES-18	k_{cat} (s ⁻¹)	70	>20	>2,5	500	3,4	0,08	0,4
	K_m (μM)	400	>20000	>20000	6000	1000	3000	3,5
	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	175	1	0,125	80	3	0,02	110

ÖD: Ölçülebilir değerin altında, H: Hesaplanamamış

1.9. Sınıf A Serin β-laktamaz İnhibitörleri

β-laktamaz direnci ile mücadele etmenin yollarından biri aktif bölgeye bağlanarak enzimi inaktif hale getiren ajanlar geliştirmektir. Enzime dönüşümlü ya da dönüşümsüz yüksek afinitede bağlanarak, tercih edilmeyen sterik interaksiyonlara sahip açıl-enzim kompleksi oluşturan inhibitörler ve mekanizma temelli veya dönüşümsüz intihar inhibitörleri geliştirilmiştir. Dönüşümlü inhibisyonda substrat hidrolizi yavaş bir şekilde sürer. Dönüşümsüz intihar inhibitörleri enzimi sürekli inaktif eder. Dönüşümsüz inhibitörlere örnek klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam verilebilir. Bu ajanlar sınıf A β-laktamazların inhibitörleridir.



Şekil 9. β -laktamaz inhibitörleri. a. Tazobaktam, b. Sulbaktam, c. Klavulanik asit (URL-5, 2015; URL-6, 2015; URL-7, 2015)

Klavulanik asit, *Streptomyces clavuligerus*'dan izole edilen ve klinik kullanıma giren ilk β -laktamaz inhibitörüdür. Klavulanat (tuz formu) tek başına çok az antimikrobiyal aktivite gösterirken amoksisilin ile kombinasyonunun *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *E. coli*'ye karşı amoksisilin minimum inhibisyon konsantrasyonunu düşürdüğü gözlenmiştir. Sulbaktam ve tazobaktam daha sonra geliştirilen sentetik penisilinat sulfonlarıdır. Üç β -laktamaz inhibitörü de penisiline yapısal olarak benzer ve sınıf A β -laktamazları ifade eden birçok organizma üzerinde etkilidir. Fakat sınıf B, C, ve D β -laktamazlara karşı daha az etki gösterirler.

İnhibitörün etkinliği dönüşüm sayısı (tn) ile ifade edilir. Dönüşüm sayısı, enzim dönüşümsüz inhiye edilmeden önce belli bir zamanda hidroliz edilen inhibitörlerin sayısıdır. PC1 enzimi 1, TEM-1 150 ve diğer bir β -laktamaz 16.000 klavulanat molekülü ile inhiye olur. Klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam beş üyeli halkanın C-1 pozisyonunda β -laktamlardan farklı grup bulundurlar. Bu grup, ikinci halkanın açılmasına ve enzimin inaktif hale gelmesine neden olur. Sınıf A β -laktamazlardan SHV-1 sulbaktam tarafından inaktivasyona TEM-1'den daha dirençliyken klavulanat tarafından inaktivasyona daha duyarlıdır. TEM-1 ve SHV-1 kökenli GSBL'lerde klavulanat için IC_{50} değerleri sulbaktam IC_{50} değerlerinden sırasıyla 60 ve 580 kat daha azdır. Aynı yapıdaki inhibitörlerin farklı enzimlerde farklı inaktivasyona sebep olmalarının enzimlerin aktif bölgelerindeki yapısal değişimlerle ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada TEM-1 ve SHV-1'de Val216 ve Arg244 arasındaki uzaklığın değiştiği ve bu residülerin klavulanat inaktivasyon mekanizmasında su molekülünün konumlanmasında önemli olduğu bulunmuştur (Drawz ve Bonomo, 2010).

1.10. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter cinsi *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almaktadır. Bu cinse ait 25 tür tanımlanmıştır. *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genomik tür 3 ve *Acinetobacter* genomik tür 13TU fenotipik özelliklerinin benzerliklerinden dolayı, *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* kompleks adı altında toplanmışlardır. *Acinetobacter baumannii* fermentasyon yapamayan, Gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, koyun kanlı agarda hemoliz oluşturamayan bir türdür. *Acinetobacter* cinsine ait türler toprakta, suda ve insan vücudunun normal florasında bulunabilirken, *A. baumannii*'ye normal florada pek rastlanmamaktadır.

Acinetobacter baumannii'de polisakkarit yapıda kapsülün bakterinin virülansında etkili olduğu gösterilmiştir. Dış membranları lipopolisakkarit yapıda olup, endotoksin ve antijenik özellik göstermektedir. Ayrıca membran yapısında bulunan proteinler, bazı moleküllerin hücreye girişi ve çıkışında etkili olmaktadır. Periplazmik boşluklarında proteaz, fosfataz, lipaz ve nükleaz gibi enzimler bulunmaktadır (Dal vd., 2012).

Acinetobacter baumannii hastane-kökenli pnömoni etkenidir. ABD'de yoğun bakım kaynaklı pnönomilerin % 5-10'nunun etkeni olarak *A. baumannii* tespit edilmiştir. Avustralya ve Asya'nın tropikal bölgelerinde *A. baumannii*'nin neden olduğu toplum kökenli pnömoni olgularına rastlanmıştır. *A. baumannii* kan dolaşımı infeksiyonlarına neden olmaktadır ve yoğun bakım kaynaklı sepsislerin önemli bir kısmının etkenidir. Ayrıca yumuşak doku infeksiyonları, menenjit ve üriner sistem infeksiyonlarına da neden olmaktadır (Peleg vd., 2008).

1.10.1. *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Tüm β -laktamlara dirençli *A. baumannii* suşlarının dünya çapında hızlı yayılımı organizmanın çevresel seçici baskıya kolayca uyum sağlayabildiğini göstermektedir. Doğal direnç mekanizmalarının düzenlenmesi ve yeni direnç determinantlarının kazanılması antibiyotiklerin oluşturduğu seçici baskıya uyum sağlamada kritik öneme sahiptir. Yapılan bir çalışmada *A. baumannii* izolatında 86 kilobazlık direnç adası tespit edilmiş ve *AbaR1* olarak adlandırılmıştır. *AbaR1*'de 88 açık okuma zincirinden 82'si diğer Gram negatif organizmalardan köken almıştır. Direnç genlerinin % 86,5'i *AbaR1*'de lokalize olmuştur. *AbaR1*'in transpozonlar, insersiyon dizileri ve integronlar gibi hareketli genetik elemanları bulundurduğu tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda direnç genlerinin genomda farklı bölgelerde bulunması, organizmanın genetik esnekliğini göstermiştir.

1.10.1.1. β -laktamlara Dirençte Enzimatik Mekanizmalar

A. baumannii'de β -laktam direncinin oluşmasında en yaygın mekanizma β -laktamazlarla enzimatik yıkımdır. Bununla birlikte, birçok mekanizma bir araya gelerek antibiyotik direncini oluşturur. Tüm *A. baumannii*'ler kromozom kökenli AmpC sefalosporinazı ya da diğer adıyla *Acinetobacter* kökenli sefalosporinaz (ADC) kalıtlıdır. Ancak diğer organizmalardan farklı olarak AmpC ekspresyonu *A. baumannii*'de uyarılabilir değildir. AmpC'nin ekspresyonunu *ISAbal* adı verilen IS elementi artırır. AmpC ekspresyonu genişlemiş spektrumlu β -laktamlara direncin kazanılmasına katkı sağlar.

GSBL'ler *A. baumannii*'de tanımlanmıştır. AmpC varlığı, genişlemiş spektrumlu β -laktamazların laboratuvarında tespitini zorlaştırmaktadır. VEB-1, Fransa, Belçika, ve Arjantin'de bulunmuştur. PER-1 ve PER-2 Fransa, Türkiye, Belçika, Romanya, Kore, ABD ve Arjantin'de bulunmuştur. GES, Türkiye, Belçika ve Japonya'da bulunmuştur. TEM-92, TEM-116, SHV-12, CTX-M-2 ve CTX-M-43 *A. baumannii*'de tanımlanan diğer genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardır.

A. baumannii'nin karbapenem direncinde OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 gibi sınıf D β -laktamazlar önemli rol oynar. OXA-51'i kodlayan gen kromozom kökenlidir ve *A. baumannii*'de doğal olarak bulunur. OXA-51'in karbapenem direncine neden olması IS*AbaI* varlığına bağlıdır. IS*AbaI* gibi IS elementleri, transpozaz kodlamaları ve direnç determinantlarının ekspresyonunu arttıracak promotor bölgelerini içerirler.

A. baumannii'de sınıf D β -laktamazlar kadar sık tanımlanmamalarına rağmen katalitik etkinlikleriyle metallo β -laktamazlar karbapenem direncine katkı sağlarlar. IMP, VIM ve SIM İspanya, Singapur, Yunanistan, Avustralya'da izole edilen suşlarda bulunmuştur. Metallo β -laktamazların büyük çoğunluğu sınıf 1 integronlarda aminoglikozit modifiye edici enzimlerle birlikte bulunmuştur.

1.10.1.2. β -laktamlara Dirençte Enzimatik Olmayan Mekanizmalar

β -laktam direncine, dış zar porinlerinin (OMP), çoklu-ilaç efluks pompalarının ve penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) ifadesinde ya da afinitesinde meydana gelen değişimler neden olabilir. CarO olarak bilinen 29 kDa'luk dış zar porin kaybının, *A. baumannii*'de meropenem ve imipenem direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 47, 44, 37, 22, ve 33 kDa'luk dış zar porinlerin ifadesinin azalmasıyla ortaya çıkan karbapenem dirençli *A. baumannii*'lerin klinik salgını ABD ve İspanya'da tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada çoklu ilaç dirençli *A. baumannii* suşunun genomunun çoklu-ilaç efluks sistemlerini kodladığı tespit edilmiştir. Bu çoklu ilaç efluks sistemleri arasında özellikleri en iyi bilinen AdeABC sistemidir. AdeABC substrat profili, β -laktamlar, tetrasiklinler, flurokinolonlar, trimetoprim ve etidyum bromürü kapsar. AdeABC üç bileşenden oluşmaktadır. AdeB transmembran bileşeni, AdeA iç zar füzyon proteinini ve AdeC dış zar porinini oluşturur. AdeABC kromozomal olarak kodlanır ve iki bileşenli düzenleyici mekanizma ile kontrol edilir (Peleg vd., 2008).

1.10.2. Ülkemizde Hastane Kökenli *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci

Ülkemizde hastane kökenli *A. baumannii* suşlarının izole edildikleri örnekler göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılık oranları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan birinde, 212 *A. baumannii* suşunun örnekler göre dağılımının; 102 (% 48,1) trakeal aspirat, 32 (% 15,1) kan, 30 (% 14,2) idrar, 22 (% 10,4) yara, 14 (% 6,6) balgam ve 13 (% 6,1) diğer şeklinde olduğu saptanmıştır. Suşların kolistine (% 100), tigesikline (% 69,1) ve amikasine (%41,4) duyarlı oldukları ve karbapenemlere (> % 80) dirençli oldukları tespit edilmiştir (Atasoy vd., 2014). Kan kültürlerinden izole edilen 224 *A. baumannii* suşunda amikasine (% 69), tetrasikline (% 67), sefoperazon-sulbaktama (% 75), imipeneme (% 75), siprofloksasine (% 75), gentamisine (% 79), seftazidime (% 80), piperasilin-tazobaktama (% 81), sefepime (% 86) ve sefotaksime (% 96) direnç saptanmıştır (Dağı vd., 2011). Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2010-2011 yılları arasında izole edilen 270 *A. baumannii* suşunda amikasin (% 76), ampisillin/sulbaktam (% 94), aztreonam (% 96), sefepim (% 95), sefotaksim (% 98), seftazidim (% 95), siprofloksasin (% 93), kolistin (% 6), gentamisin (% 94), imipenem (% 87), levofloksasin (% 87), meropenem (% 87), piperasillin/tazobaktam (% 92), tetrasiklin (% 84), trimetoprim/sulfametoksazole (% 82) direnç tespit edilmiştir (Yolbaş vd., 2013). 2009-2014 yılları arasında izole edilen 308 *A. baumannii* ile yapılan bir diğer çalışmaya göre, en çok yoğun bakım ünitesinden gönderilen klinik örneklerden (% 92,9) ve derin trakeal aspirat örneklerinden (% 64,6) izole edildikleri ve kolistin için duyarlılık oranı % 92,8, tigesiklin için % 85,3 ve netilmisin için % 82, tobramisin için % 76,4, gentamisin için % 47,8, amikasin için % 46,3 olduğu tespit edilmiştir (Korkmaz vd., 2015). 172 *A. baumannii* suşunun %44'ünün trakeal aspirat, % 25'nin yara yeri, % 24'nün kan kültürü ve % 7'sinin idrardan izole edildiği çalışmada, direnç oranları amikasin için % 64, gentamisin için % 67, levofloksasin için % 73, siprofloksasin için % 76, sefoperazon sulbaktam için % 79, piperasilin-tazobaktam için % 84, meropenem ve imipenem için ise % 92 olarak tespit edilmiştir (Dede vd., 2013). 2009-2011 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatarak tedavi edilen hastaların çeşitli klinik örneklerinden

izole edilen toplam 237 *Acinetobacter baumannii* suşunda sefepim (% 99,6), sefotaksim (% 99,6), seftazidim (% 98,7), imipenem (% 60,8) ve meropenem (% 71,7) için direnç gözlenmiştir (Özseven vd., 2012). Çok merkezli olarak yapılan bir çalışmada 155 *A. baumannii* suşunda direnç oranları seftriakson için % 95,5, seftazidim için % 82,6, sefepim için % 77,5, imipenem için % 52,2, sefoperazon-sulbaktam için % 41,3 ve piperasilin-tazobaktam için % 78,7 olarak belirlenmiştir (Gür vd., 2008). Ülkemizde yapılan bu çalışmalar ve diğer birçok çalışmada *A. baumannii* suşlarında artan antibiyotik direnç oranları gösterilmiştir. Genel olarak *A.baumannii* 'de direnç oranları sefalosporinler için % 91-100, imipenem için % 24-93, meropenem için %16-94, tigesiklin için % 11-39 ve kolistin için % 0-9 arasında tespit edilmiştir (Korkmaz vd., 2015).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

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

Çalışmada kullanılan kimyasallar: HisPur™ Kobalt (Thermo Fischer Scientific), Bradford Boyası (Bio-Rad), Guanidine HCl (Sigma), Karboksi-metil selüloz (CM-23, Sigma), agaroz (Biomax), gliserol (Sigma), dNTP (Fermentas), MgCl₂ (Sigma), etidyum bromür (Bio-Rad), kanamisin (Sigma), etanol (Sigma), Tripton (LABM), maya ekstraktı (Conda), metanol (J.T. Baker), glasiyal asetik asit (Sigma), SDS (Merck), akrilamid (Merck), bisakrilamid (Amresco), TEMED (Bio-Rad), amonyum persülfat (Sigma), Commassie Brilliant Blue R-250, glisin (Fischer Scientific), β-merkaptoetanol, bromofenol mavisi, imidazol (Merck), NaH₂PO₄ (Merck), NaCl (Sigma), EMB (Merck), Tris-HCl (Sigma), Tris-Base (Merck), EDTA (Merck), agar (Fluka), DNA markırı (Sigma Chemicals), CaCl₂·2H₂O (Merck), IPTG (Sigma), X-gal (Qiagen), ampisilin (Sigma), penisilin G (Sigma), seftazidim (Sigma), sefotaksim (Sigma), sefoksitin (Sigma), seftriakson (Sigma), imipenem (Primaxin), aztreonam (Sigma), nitrosefin (Calbiochem), doripenem (Doribax), sefalotin (Sigma), sefepim (Sigma), sulbaktam, klavulanat, tazobaktam, rifampisin, Halt Proteaz İnhibitör Kokteyli (Pierce).

Çalışmada kullanılan E-test çubukları: Amoksisilin, sefiksim, piperasilin/tazobaktam, sefoperazon/sulbaktam, meropenem, tikarsilin/klavulanik asit, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, sefaklor ve imipenem (BioMérieux).

Çalışma kullanılan enzimler: Paq DNA Polimeraz (Agilent technologies), Lizozim (Amresco), DNA polimeraz I (GoTaq, Promega), DNA polimeraz I (Bio-Rad), EcoRI (Fermentas), XhoI (Fermentas), NdeI (Fermentas), DpnI (Thermo Fischer Scientific), T4 DNA ligaz (Promega), Dnaz I (Promega).

Çalışmada kullanılan kitler ve vektörler: Plazmit DNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific), pGEM-T Klonlama Kiti (Promega), PCR Temizleme Kiti (Vivantis), Jel

Ekstraksiyon Kiti (Qiagen), pET-28a (Novagen), pET-24a, Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen).

2.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Besiyeriler

Çalışmada kullanılan çözeltiler, tamponlar ve besiyerilerinin bileşenleri Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. Çözeltiler, tamponlar ve besiyerilerin bileşenleri

	Bileşenler
LB (Luria-Bertani)	% 1 tripton, % 0,5 maya ekstraktı, % 0,5 NaCl
LB (Luria-Bertani) Agar	% 1 tripton, % 0,5 maya ekstraktı, % 0,5 NaCl, % 1,5 agar
50X TAE	242 gr Tris-Base, 57,1 ml glasiyal asetik asit, 100 mL 0,5 M EDTA
% 1 Agaroz Jel	1 gr agaroz, 100 mL 1X TAE
%30 Akrilamid	% 29 akrilamid, % 1 bisakrilamid
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	7,2 gr glisin, 1,5 gr Tris-Base, % 10 SDS
SDS-PAGE Yükleme Boyası	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, % 10 SDS, % 30 gliserol, % 5 β-merkaptotanol, % 0,02 bromofenol mavisi
SDS-PAGE Protein Görüntüleme Boyası	% 10 glasiyal asetik asit, 0,125 gr Commassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol
SDS-PAGE Jel Yıkama Solusyonu	% 10 glasiyal asetik asit, % 50 metanol, % 40 ddH ₂ O
Afinite Kromatografisinde Kullanılan Tampon A	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4
Afinite Kromatografisinde Kullanılan Tampon B	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 25 mM imidazol, pH 7,4
Afinite Kromatografisinde Kullanılan Tampon C	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,4
Afinite Kromatografisinde Kullanılan Diyaliz Tamponu	50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4
Lizis Tamponu	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA, pH 7,0
İyon Değişim Kromatografisinde Kullanılan Diyaliz Tamponu	5 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,8
İyon Değişim Kromatografisinde Kullanılan Elüsyon Tamponu	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0

2.3. *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Temini ve Antibiyotik Duyarlılık Oranlarının Belirlenmesi

101 *Acinetobacter baumannii* suşu Kasım 2011-Temmuz 2012 tarihleri arasında Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi'nde tedavi gören hastalardan izole edilmiştir. Suşların % 17'si trakeal aspirattan, % 36'sı balgamdan, % 21,9'u yaradan, % 19'u kandan, % 3'ü kateterden, % 0,9'u abdominal örneklerden, % 0,9'u beyin-omurilik sıvısından, % 0,9'u plevral sıvıdan ve % 0,9'u idrardan izole edilmiştir. Suşlar, VITEK 2 (bioMerieux, Durham, NC, USA) sistem kullanılarak tanımlanmıştır. Suşların antimikrobiyal duyarlılıkları, VITEK 2 (bioMer-ieux, Craaponne, France) sistemi ve E-test kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü Kuralları'na (CLSI, 2012) göre değerlendirilmiştir. Suşların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkların belirlenmesi Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı'nda yapılmıştır.

2.4. *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Stoklanması ve Total DNA İzolasyonu

Acinetobacter baumannii izolatlarından birer koloni seçilerek 4 ml antibiyotiksiz Luria-Bertani (LB) besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de çalkalamalı inkübatörde üretildi. Bakteriyel süspansiyonların 800'er µl'si alınarak % 20'lik gliserol stoklar hazırlandı. Bakteriyel süspansiyonların 1000'er µl'si 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletler, 1000'er µl distile suda çözülerek 10 dakika kaynatıldı. Daha sonra 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantın 500'er µl'si ependorflara aktarıldı.

2.5. *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Taranması

*bla*_{OXA} genlerinin tespiti için Multipleks PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi kullanıldı. Multipleks PZR'da kullanılan primerler Tablo 11'de verildi. Polimeraz zincir reaksiyonu; 1,5 ünite DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz, Promega),

5 µl genomik DNA, 10 µl DNA polimeraz tamponu, 4 µl 2,5 mM her bir dNTP, 2 µl her bir primer stoku (20 pmol/µl), 3 µl 25 mM MgCl₂ ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon için döngü şartları, 94°C'de 3 dk, 25 sn 94°C'de, 40 sn 52°C'de ve 50 sn 72°C'de (19 döngü) ve son sentez 72°C'de 5 dk olacak şekilde belirlendi.

Tablo 11. Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler

Genler	Primerler 5'→3'	Amplikon Büyüklikleri	Referanslar
<i>bla</i> _{OXA-51}	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	(Woofdord vd., 2006)
<i>bla</i> _{OXA-23}	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	(Woofdord vd., 2006)
<i>bla</i> _{OXA-24}	F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	(Woofdord vd., 2006)
<i>bla</i> _{OXA-58}	F: AAGTAT TGGGGCTTGTGCTG R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	(Woofdord vd., 2006)
<i>ISAbal</i>	F: CACGAATGCAGAAGT TG R: CGACGAATACTATGACAC	549	(Segal vd., 2005)
<i>bla</i> _{GES}	F: ATGCGCTTCATTCACGCAC R: CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	863	(Moubareck vd., 2009)
<i>bla</i> _{VEB}	F: ATTTCCCGATGCAAAGCGT R: TTATTCGGGAAGTCCCTGT	542	(Moubareck vd., 2009)
<i>bla</i> _{PER-2}	F: ATGAATGTCATCACAAAATG R: TCAATCCGGACTCACT	927	(Celenza vd., 2006)
<i>Aac-3-Ia</i>	F: ATGGGCATCATTCGCACA R: TCTCGGCTTGAACGAATTGT	484	(Ning vd., 2010)
<i>Aac-6-Ib</i>	F: ATGACTGAGCATGACCTT G R: AAGGGT TAGGCAACACTG	524	(Ning vd., 2010)
<i>bla</i> _{IMP}	F: CATGGTTTGGTGGTTCTTGT R: ATAATTTGGCGGACTTTGGC	488	(Jeon vd., 2005)
<i>bla</i> _{VIM}	F: ATTGGTCTATTTGACCGCGTC R: TGCTACTCAACGACTGAGCG	780	(Jeon vd., 2005)
<i>bla</i> _{NDM-1}	F GAGATTGCCGAGCGACTTG R CGAATGTCTGGCAGCACACTT	497	(Çiçek vd., 2014)

ISAbal geni, genişlemiş spektrumlu β-laktamazları kodlayan genleri, metallo β-laktamazları kodlayan genleri ve aminoglikozit modifiye edici enzimleri kodlayan genleri tespit etmek için kullanılan primerler Tablo 11'de verildi. Polimeraz zincir reaksiyonu; 1,5 ünite DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz, Promega), 5 µl genomik DNA, 10 µl DNA polimeraz tamponu, 4 µl 2,5 mM her bir dNTP, 2 µl her bir primer stoku (20 pmol/µL), 3 µl 25 mM MgCl₂ ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon için döngü şartları Tablo 12'de verildi. PZR ürünleri 0,5 mg/L EtBr içeren % 1' lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

Tablo 12. Termal döngü şartları

İlk denatürasyon	35 Döngü	Son sentez	
95°C 5 dk	45 s 95°C	5 dk 72°C	
	45 sn		56°C (<i>ISAbal</i> , <i>bla_{GES}</i> , <i>bla_{IMP}</i>)
	55°C (<i>bla_{VEB}</i> , <i>aac-3-Ia</i>)		
	50°C (<i>bla_{PER-2}</i>)		
	54°C (<i>aac-6-Ib</i>)		
	58°C (<i>bla_{VIM}</i>)		
	57°C (<i>bla_{NDM-1}</i>)		
	3 dk 72°C		

2.6. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* DH5 α ve *E. coli* BL21(DE3)pLysS suşlarına ait kompetent hücreler kalsiyum klorür metodu takip edilerek hazırlandı (Maniatis vd., 1989). Öze ile 3 mL LB besiyerine 1 gece önceden tek bir koloni seçilerek ekim yapıldı ve sıvı kültür gece boyunca 37°C'de 200 rpm'de sallanarak büyütüldü. Hazırlanan gece kültürünün yoğunluğu 600 nm'de ölçülerek belirlendi ve 0,1 olacak şekilde yeniden 30 ml LB besiyerine ekildi. Optik yoğunluk 600 nm'de 0,4–0,6 arasına ulaşınca hücreler 4°C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 10 mL soğuk 0,1 M CaCl₂ ilave edilerek çözüldü ve 30 dakika buz içinde bekletildi. Sonrasında 4°C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve pellet 2 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisinde süspanse edilerek 200 μ l hacimlerde steril ependorflara bölünerek kullanıldı.

2.7. PZR Ürünlerinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması ve Baz Dizini Analizi

PZR ürünleri pGEM-T vektörüne protokolda belirtildiği şekliyle T:A klonlaması yapıldı (Promega). Ligasyon toplam hacim 4 μ l olacak şekilde, 0,2 μ l pGEM-T vektör,

1,6 µl insert DNA, 2 µl 10X T4 ligaz tamponu (Promega) ve 0,2 µl T4 DNA ligaz (Promega) 16°C'de bir gece inkübe edildi. Ligasyon ürünleri *E.coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için 50 µg/ml ampisilin içeren LB agar besiyerlerine 40 µl IPTG (100mM stok) ve 40 µl X-Gal (stok 40 mg/ml) yayıldı. Son konsantrasyonu 50 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek bir beyaz koloniden ekim yapıldı ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve bakteri pelletinden Plazmit DNA İzolasyon Kitinde (Thermo Scientific) verilen protokole uygun şekilde plazmit DNA izole edildi. Plazmitler %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve baz dizin analizi için Macrogen'e (Seoul, Korea) gönderildi. Baz dizin analizi sonuçları biyoinformatik programlar kullanılarak analiz edildi (Altschul vd., 1990).

2.8. Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (REP-PZR)

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. REP-PZR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmak izi tekniğidir. Tekrarlanan ekstrasjenik palindromik (REP) diziler, 35-40 baz çifti büyüklüğündedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

REP-PZR *A. baumannii* izolatlarını genotiplendirilmesinde kullanıldı. REP1 (5'-III GCG CCG ICA TCA GGC-3') ve REP 2 (5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC-3') primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu; 1,5 ünite DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz, Promega), 5 µl genomik DNA, 10 µl DNA polimeraz tamponu, 4 µl 2,5 mM her bir dNTP, 2 µl her bir primer stoku (20 pmol/µl), 3 µl 25 mM MgCl₂ ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon için döngü şartları, 94°C'de 3 dk, 45 sn 94°C'de, 1 dk

45,8°C’de ve 8 dk 72°C’de (30 döngü) ve son sentez 72°C’de 16 dk olacak şekilde belirlendi. Amplifikasyon ürünleri ve 1 kilobazlık DNA markırı (Sigma, Canada) % 1,5’lik agaroz jelde yürütüldü. Suşların DNA parmak izleri, UV Görüntüleme Cihazı (UVP, Upland, CA, USA) kullanılarak kaydedildi ve Phoretix Jel Analiz Programı (Nonlinear USA, Inc., Durham, NC, USA) kullanılarak analiz edildi.

2.9. Konjugasyon

Alıcı bakteri olarak *Escherichia coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) kullanıldı. Verici hücreler olarak GES-11 ve GES-22’yi barındıran *A. baumannii* izolatları ve pozitif kontrol olarak daha önceki bir çalışmada konjugatif olarak belirlenen *E. coli* KD8 suşu (Ozgumus vd., 2009) kullanıldı. Verici ve alıcı hücreler antibiyotik içermeyen 3mL Luria-Bertani (LB) besiyerine aynı miktarda inoküle edildi. Çalkalayıcılı bir inkübatörde 37°C’de 18-24 saat atmosferik ortamda üretildi. Verici ve alıcı hücreleri içeren kültürler eşit hacimde (1:1) karıştırıldıktan sonra 35°C’ye ayarlı etüvde 18-20 saat sallanmadan inkübe edildi. Transkonjugantların seçimi için ekimleri yapılacak selektif besiyeri olarak 100 µg/mL rifampisin ve verici bakterinin dirençli olduğu antibiyotiği içeren (ampisilin) EMB agar kullanıldı (Ozgumus vd., 2008).

2.10. *bla*_{GES} Genlerinin pET100/D-TOPO Vektörüne Klonlanması

*bla*_{GES-11} ve *bla*_{GES-22} pET100/D-TOPO vektörüne klonlanarak, rekombinant vektörler *One Shot*® *TOP10* hücrelerine transform edilerek bazı antibiyotikler için MİK değerlerinin belirlenmesi hedeflendi. *bla*_{GES-11} ve *bla*_{GES-22} Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen) kullanılarak pET100/D-TOPO vektörlerine klonlandı. Bunun için öncelikle TOPO_GES_F_5’-CACC ATG CGC TTC ATT CAC GCAC-3’ ve TOPO_GES_R_5’-CTA TTT GTC CGT GCT CAG GATG-3’ primerleri dizayn edildi. TOPO primerleri ve High Fidelity Taq polimeraz (Bio-RAD) kullanılarak *bla*_{GES} genleri çoğaltıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu; 1,5 ünite DNA polimeraz I (iProof™ High-Fidelity, BioRAD), 3 µl DNA, 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 5 µl 2 mM her bir dNTP, 1 µL her bir primer stoku (25

pmol/ μ L) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 μ l'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon için döngü şartları: 30 sn 98°C, 7 sn 98°C, 1 dk 55°C, 50 sn 72°C (24 döngü) ve son sentez 5 dk 72°C'dir. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Amplifikasyon ürünleri PZR temizleme kiti (Vivantis) kullanılarak saflaştırıldı. Saf PZR ürünleri pET100/D-TOPO vektörüne klonlandı. Ligasyon 6 μ l toplam hacim olacak şekilde, 1 μ l pET100/D-TOPO vektör, 3 μ l insert DNA, 1 μ l 10X T4 ligaz tamponu (Promega), tuz solusyonu ve 1 μ l steril su 25°C'de 7 dakika inkübe edildi. Ligasyon ürünleri *One Shot® TOP10* kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Hücreler 2 saat 37°C'de çalkalayıcıda inkübe edildi. 2 saat sonunda hücreler ampisilinli (50 μ g/ml) LB agar besiyerlerine yayıldı.

2.10.1. Pozitif Klonların Seçimi ve Baz Dizin Analizi

Petriden koloniler seçildi. Son konsantrasyonu 50 μ g/ml ampisilin içeren 3 ml LB besiyerine seçilen kolonilerden ekim yapıldı ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve bakteri pelletinden Plazmit DNA İzolasyon Kitinde (Thermo Scientific) verilen protokole uygun şekilde plazmit DNA izole edildi. Plazmitler % 1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Plazmitlerle TOPO_GES_F ve TOPO_GES_R primerleri kullanılarak PZR yapıldı. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülendi. PZR'da *bla_{GES}* geni için pozitif sonuç veren plazmitler baz dizin analizi için Macrogen'e (Seoul, Korea) gönderildi. Baz dizin analizi sonuçları biyoinformatik programlar kullanılarak analiz edildi (Altschul vd., 1990).

2.11. GES-11 ve GES-22'yi Barındıran Hücrelerin Bazı Antibiyotikler İçin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

pET100/D-TOPO_GES-11 ve pET100/D-TOPO_GES-22 vektörlerini içeren *One Shot® TOP10* hücrelerinin ve GES-11 ve GES-22'yi bulundurduğu tespit edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarının ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/

tazobaktam, seftazidim, sefoperazon/sulbaktam, sefepim, imipenem ve meropenem için minimum inhibisyon konsantrasyonları VITEK 2 (bioMer-ieux, Craaponne, France) sistemi ile belirlendi.

2.12. pET100/D-TOPO_GES-22 ile Yönlendirilmiş Mutasyonların Yapılması

GES-22'nin Ambler 169., 276., 30., 220., 179., 251., 290. ve 216. pozisyonlarındaki amino asitlerin alanine dönüştürülmesi için mutasyon primerleri dizayn edildi (Tablo 13). Bu primerlerle polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu; 1,5 ünite DNA polimeraz I (Paq DNA polimeraz, Agilent Technologies), 1 µl plazmit DNA, 5 µl Paq DNA polimeraz tamponu, 5 µl 2 mM her bir dNTP, 1µL her bir primer stoku (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon için döngü şartları: 2 dk 94°C, 45 sn 94°C, 1 dk 52°C, 12 dk 68°C (19 döngü) ve son sentez 20 dk 68°C. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Amplifikasyonun gerçekleştiği tüm örnekler PZR Temizleme Kiti kullanarak (Vivantis) temizledikten sonra DpnI enzimi ile 2 saat boyunca kesim gerçekleştirildi. Kesim sonrası ürünler tekrar PZR Temizleme Kiti ile temizlendikten sonra *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Daha sonra petrilere ekilen belli sayıda hücreden plazmit izole edildi ve baz dizin analizi için Macrogen'e (Seoul, Korea) gönderildi. Baz dizin analizi sonuçları biyoinformatik programlar kullanılarak analiz edildi (Altschul vd., 1990).

Tablo 13. Mutasyonlarda kullanılan primerler

Primerler	Primer Dizileri
GES22_D276A	F:5'-GAAACTATCGGCCGTAGAACGTGCCGAATTAGTTGCCTCTGT-3' R:5'-ACAGAGGCAACTAATTCGGCACGTTCTACGGCCGATAGTTTC-3'
GES22_L169A	F:5'-TAGACCGGAAAGAGCCGGAGGGCGGGCGACAACACACCTGGCGA-3' R:5'-TCGCCAGGTGTGTTGTGCGCCGCCTCCGGCTCTTCCGGTCTA-3'
GES22_D179A	F:5'- CCTGGCGACCTCAGAGCAACAACACTACGCCTATTG -3' R:5'- CAATAGGCGTAGTTGTTGCTCTGAGGTCGCCAGG -3'
GES22_K30A	F: 5'-TCGGAAAAATTAACCTTCGCGACCGATCTTGAGAAGCTA-3' R: 5'-TAGCTTCTCAAGATCGGTCGCGAAGGTTAATTTTTCCGA-3'
GES22_T216A	F: 5'-TGGCTGATCGGAAACCAAGCGGGAGACGCGACACTACGA-3' R: 5'-TCGTAGTGTGCGGTCTCCCGCTTGGTTTCCGATCAGCCA-3'
GES22_T220A	F: 5'-CAAACGGGAGACGCGGCACTACGAGCGGGTTTTCT-3' R: 5'-AGGAAAACCCGCTCGTAGTGCCGCGTCTCCCGTTTG-3'
GES22_K251A	F: 5'-AACGACATTGGTTTTTTTGCAGCCCAGGAGAGAGATTAC-3' R: 5'-GTAATCTCTCTCTGGGCTGCAAAAAACCAATGTCGTT-3'
GES22_I290A	F: 5'-GGTCAAGTTATTACACAACCTCGCCCTGAGCACGGACAAA-3' R: 5'-TTTGTCCGTGCTCAGGGCGAGTTGTGTAATAACTTGACC-3'

2.13. GES-22'de Alanin Mutasyonlarının MİK Üzerine Etkilerinin E-test Yöntemiyle Belirlenmesi

GES-22 ve alanin mutantlarını barındıran *E. coli* DH5 α hücrelerinde bazı antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için E-test yöntemi kullanıldı. Bunun için, rekombinant vektörleri içeren *E. coli* DH5 α hücreleri 0,5 McFarland standartına uygun serum fizyolojide süspansiyon edilerek steril eküvyon çubuklarıyla Mueller-Hinton agar plaklarına ekildi. Daha sonra amoksisilin, sefiksim, piperasilin/tazobaktam, sefoperazon/sulbaktam, meropenem, tikarsilin/klavulanik asit, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, sefaklor ve imipenem E-test çubukları (BioMérieux, France) üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygulandı. 37°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirildi.

2.14. *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in pET-28a' ya Klonlanması

GES-11 ve GES-22'nin *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerinde ekspresyonunu arttırmak için pET-28a vektörüne EcoRI-XhoI kesim bölgelerinden sinyal sırasız bir şekilde *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in klonlanması amaçlandı.

2.14.1. pET-28a Klonlanması İçin Primer Dizaynı

*bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in pET-28a vektörüne EcoRI-XhoI kesim bölgelerinden klonlamak için primerler dizayn edildi. GES-22 ve GES-11'in sinyal sıraları SignalP 4.1 Server (URL-8, 2014) kullanılarak tespit edildi. İleri primer dizayn edilirken 18 amino asitlik sinyal sırası çıkarıldı. GES_EcoRI_F: 5'-GAA TTC TCG GAA AAA TTA ACC TTC AAG ACC-3' ve GES_XhoI_R: 5'-CTC GAG CTA TTT GTC CGT GCT CAG GAT GA-3' primerleri dizayn edildi. GES_EcoRI_F ve GES_XhoI_R primerleri kullanılarak daha önceden *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11} bulundurduğu tespit edilen total DNA'lar ile PZR yapıldı. *bla*_{GES} amplifikasyonunun gerçekleştirildiği PZR ürünleri pGEM-T vektörüne protokolda belirtildiği şekliyle T:A klonlaması yapıldı (Promega). Klonlama sonucunda elde edilen pozitif klonlardan Plazmit DNA İzolasyon kitiyle (Thermo Scientific) plazmit DNA izole edildi.

2.14.2. XhoI Kesim Bölgesini Değiştirmek İçin Yönlendirilmiş Mutasyon

pGEMT'ye klonlanan *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in içinde bulunan XhoI CTCGAG kesim bölgesini amino asit değişimi olmamasına dikkat edilerek CTCGAA olacak şekilde değiştirmek için primer dizayn edildi (XhoI_F ve XhoI_R). XhoI_F: 5'-CAT CGG GAC ACA TGA CGG TTC TCG AAG CAG CGC AAG CTG CGG T-3' ve XhoI_R: 5'-ACC GCA GCT TGC GCT GCT TCG AGA ACC GTC ATG TGT CCC GAT G-3' primerleriyle pGEMT_*bla*_{GES-22} ve pGEMT_*bla*_{GES-11} vektörleri üzerinden PZR yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu; 1,5 ünite DNA polimeraz I (GoTaq DNA polimeraz, Thermo Scientific), 1 µl plazmid DNA, 5 µl DNA polimeraz tamponu, 5 µl 2 mM her bir dNTP, 1µL her bir primer stoku (25 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize

su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon için döngü şartları: 30 sn 94°C; 45 sn 94°C, 1 dk 52°C, 3 dk 72°C (22 döngü) ve son sentez 20 dk 72°C. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Amplifikasyonun gerçekleştirildiği tüm örnekler PZR temizleme kiti kullanarak (Vivantis) temizledikten sonra DpnI enzimi ile 2 saat boyunca kesim gerçekleştirildi. Kesim sonrası ürün tekrar PZR temizleme kiti ile temizlendikten sonra *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Daha sonra ampisilinli petrilere ekilen belli sayıda hücreden Plazmit DNA İzolasyon kitiyle (Thermo Scientific) plazmit DNA izole edildi ve baz dizin analizi için MacroGen'e (Seoul, Korea) gönderildi. Baz dizin analizi sonuçları biyoinformatik programlar kullanılarak analiz edildi (Altschul vd., 1990).

2.14.3. XhoI Kesim Bölgesi Değiştirilmiş *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in pET-28a'ya Klolanması

pGEMT_XhoI_ *bla*_{GES-22}, pGEMT_XhoI_ *bla*_{GES-11} ve pET-28a vektörü EcoRI ve XhoI ile kesildi. Kesim sonucunda vektör ve PZR ürünleri jelden Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırıldı. Vektör ve PZR ürünlerinin ligasyonu 10 ünite T4 DNA ligaz ile (Fermentas) 1X T4 ligasyon tamponu kullanılarak 10 µl hacimde 16°C'de gece boyu inkübe edilerek sağlandı. Elde edilen ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden Plazmit DNA İzolasyon kitiyle (Thermo Scientific) plazmit DNA izole edildi. Plazmitlerle EcoRI-XhoI kesimi yapıldı. Kesim sonucuyla *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in PZR ürünü ile aynı büyüklükte parçaları barındırdığı tespit edilen plazmitler baz dizin analizi için MacroGen'e (Seoul, Korea) gönderildi. Baz dizin analizi sonuçları biyoinformatik programlar kullanılarak analiz edildi (Altschul vd., 1990).

2.15. pET-28a_XhoI_bla_{GES-22} ve pET-28a_XhoI_bla_{GES-11}'in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Hücrelerine Transforme Edilmesi ve Ekspresyonunun İndüklenmesi

pET-28a_XhoI_bla_{GES-22} ve pET-28a_XhoI_bla_{GES-11} *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Transformasyon sonucunda rastgele birer koloni seçildi ve ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyon için seçilen koloniler gece boyunca 25 µg/ml kanamisin içeren 50 ml LB'de 37°C'de büyütüldükten sonra 25 µg/ml kanamisin içeren 1000 ml LB besiyerlerine yeniden ekildi ve 4 saat 37°C'de inkübe edildi. OD 600'de 0,6-0,8 olunca son hacim 0,1 mM IPTG (izopropil β-D-1-Tiyogalaktopiranozit) ile indüklenerek gece boyu 18°C'de büyütüldü.

2.16. GES-11 ve GES-22' nin Kobalt Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

İndüklemeler sonrası hücreler 7500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Pelletler 20 ml tampon A (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM İmidazol, pH 7,4) ve HALT proteaz inhibitör kokteyli (Pierce) ile süspansiyon edildi. Daha sonra 1 ml lizozim (10 mg/ml) eklenerek viskozitenin artması için beklendi. Viskozite iyice artınca 10 µl DNaz I (5 mg/ml) ve 100 µl 1 M MgCl₂ eklendi. 2 dk aralıklarla buzda bekletilerek 6 kez 30 sn sonikasyon yapıldı. Sonikasyonun ardından hücre lizatları 15.000 rpm'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar daha önceden 3 kez tampon A ile yıkanan HisPurTM Kobalt ile 50 ml konikal tüpte birleştirilerek süpernatant ve dolgu maddesinin etkileşime geçmesi için 1 saat boyunca 4°C'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Sonrasında kolondan akış sağlanarak kobalta bağlanmayan proteinler toplandı. Kolon 10 ml tampon A ile yıkandı. Ardından kolondan 25 ml tampon B (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 25 mM İmidazol, pH 7,4) geçirildi. 15 ml tampon C (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 250 mM İmidazol, pH 7,4) ile arzu edilen proteinler elüe edildi. Saflaştırma basamakları 4°C'de gerçekleştirildi. Bradford deneyi (10 µl fraksiyon ve 1X 5 µl Bradford boyası) ile hangi fraksiyonların SDS-PAGE yükleneceğine karar verildi.

2.17. SDS-PAGE Analizi

Bileşenleri Tablo 14’te verilen oranlara göre hazırlanan ayırma jeli karışımı (% 8’lik), elektroforez aletinin aparatında, iki cam kaseti arasına doldurularak polimerizasyona bırakıldı. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için polimerizasyon başlamadan önce jelin yüzeyi çok ince bir su ile kapatıldı.

Tablo 14. SDS-PAGE bileşenleri

Bileşenler	%5’ lik Yığıma Jeli (ml)	%8’ lik Ayırma Jeli (ml)
Saf su	2,7	2,3
%30 Akrilamid	0,67	1,3
0.5 M Tris pH 6.8	0,5	-
1.5 M Tris pH 8.8	-	1,3
%10 SDS	0,04	0,05
%10 APS	0,04	0,05
TEMED	0,004	0,005

Ayırma jeli polimerizasyonu tamamlandıktan sonra yığıma jeli döküldü. Protein örneklerinden 20 µl ve yükleme boyasından 10 µl alındı, 95°C de 5 dk bekletildi. Yığıma jeli polimerize olunca jel kaseti tankın içine yerleştirildi, tankın içi yürütme tamponu ile dolduruldu ve örnekler kuyucuklara yüklendi. Tank kapağı kapatıldı ve güç kaynağına bağlandı. 16 mA geçecek şekilde akım ayarlandı. 1,5-2 saat yürütme sonrasında güç kaynağı durduruldu. Jel kasetinden jel çıkarıldı ve protein görüntüleme boyasında yarım saat tutuldu. Daha sonra jelde bantların görünür hale gelmesi için jel, yıkama solusyonunda bekletildi (Temizkan vd., 2008).

2.18. GES-11 ve GES-22'nin Diyalizi ve Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Diyaliz tamponu (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,4) hazırlandı. Diyaliz membranı (10 kDa MWCO) distile su ile yıkandı. Diyaliz membranının kenarları diyaliz kısıkaçlarıyla kapatıldı ve içine SDS-PAGE ile belirlenen fraksiyonlar konuldu. 1 lt diyaliz tamponunda 4°C'de gece boyu diyaliz edildi. Ertesi gün diyaliz tamponu iki kez değiştirilerek 8 saat daha diyaliz yapıldı.

Protein konsantrasyonlarını belirlemek için GES-11 ve GES-22'nin moleküler ağırlıkları ve ekstinksiyon katsayıları ExPASy ProtParam (URL-9, 2015) yardımıyla belirlendi. Daha sonra proteinler Guanidine HCl ile seyreltilerek 270 nm-400 nm arasında (Beckmann DU 800, USA) absorbansları ölçüldü. Moleküler ağırlıkları, ekstinksiyon katsayıları ve absorbansları ile Beer-Lambert yasası kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Daha sonra proteinler 200'er µl olacak şekilde ependorflara konuldu. Proteinler sıvı azotta dondurularak -80°C'de saklandı.

2.19. GES-22 ve GES-11'in β-Laktamlar İçin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Michaelis-Menten denkleminde yararlanılarak tek substratlı enzimlerin reaksiyon hızları ile substrat konsantrasyonları arasındaki ilişkilerin kantitatif niteliklerinin açıklanabilmektedir. Enzim konsantrasyonunu sabit tutmak ve fakat değişik başlangıç substrat konsantrasyonları uygulamak suretiyle başlangıç reaksiyonlarının hızlarını saptanabilir.

Başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonlarının grafiğe işlenmesi sonucu bir enzimin K_m değeri bulunabilir. V_{maks} ilgili enzimin, belirli substratla, belirli şartlar ve zaman ünitesi içerisinde reaksiyona girdiğinde ulaşabileceği en yüksek katalitik etki düzeyini göstermektedir. K_m (Michaelis-Menten Konstantı) ise böyle bir reaksiyonda enzim aktivitenin en yüksek katalitik aktivitenin yarı hızına ulaştığı sıradaki substrat konsantrasyonunu belirlemektedir (Bingöl, 1977). Turnover sayısı (k_{cat}), enzim

substratla doyduğunda belli bir zamanda ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısını ifade eder. k_{cat}/K_m ise katalitik etkinliği ifade etmektedir (Berg vd., 2002).

2.19.1. K_m ve k_{cat}/K_m Değerlerinin Belirlenmesi

GES-11 ve GES-22'nin β -laktamlara karşı kinetik özelliklerinin belirlenmesi için Michealis-Menten denkleminde yararlanıldı. 100 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) enzim ve farklı konsantrasyonlarda substratlarla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda kullanılacak enzim konsantrasyonlarına, farklı enzim konsantrasyonları ve sabit substrat konsantrasyonlarında deneyler yapılarak karar verildi. Deneylerde kullanılan β -laktamlara özgü ekstinksiyon katsayıları, dalga boyları ve faktörler Tablo 15'te verildi.

Tablo 15. β -laktamlara özgü ekstinksiyon katsayıları, dalga boyları ve faktörler

β -Laktam Sınıfı	β -laktam	Dalga Boyu (nm)	Molar Ekstinksiyon Katsayısı ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Faktör
Penisilinler	Ampisilin	235	-900	1111,11
	Penisilin G	240	-560	1785,71
Sefalosporinler	Seftazidim	260	-8660	115,47
	Sefotaksim	260	-7500	133,33
	Sefoksitin	260	-7700	129,87
	Seftriakson	260	-9400	106,38
Karbapenem	İmipenem	300	-9000	111,11
Monobaktam	Aztreonam	320	-700	1428,57
Kromojenik Sefalosporin	Nitrosefin	482	+15000	66,67

Spektrofotometrik okumalarda 1 cm ve 0,2 cm'lik kuvars küvetler kullanıldı. β -laktam halkalarının parçalanmasıyla oluşan zamana bağlı absorbans değişimleri spektrofotometrik (Agilent, Cary 60) olarak belirlendi. Kinetics programıyla başlangıç hızları hesaplandı. Moları mikromolara çevirmek için Beer-Lambert yasasından

yararlanılarak elde edilen faktörler, program tarafından ilk 10 saniyede alınan eğim ile çarpıldı. Başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonlarıyla Excel+SDAS programında Michealis-Menten denkleminde yararlanılarak grafikler çizildi.

2.19.2. Bazı β -Laktamlar İçin K_d Değerlerinin Belirlenmesi

GES-22 ve GES-11'e zayıf ya da çok güçlü bağlanan β -laktamlara karşı bağlanma afinitelerini tespit etmek için yarışmalı inhibisyon deneyleri yapıldı. Deneylerde raportör substrat olarak ampisilin veya nitrosefin kullanıldı. Nitrosefin ve ampisilinin konsantrasyonları sabit tutularak, substratların konsantrasyonları değiştirildi. Deneyler 100 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirildi. K_m değerlerine yakın konsantrasyonlar, reaksiyonlarda raportör substratların konsantrasyonları olarak kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 16'da verildi.

Tablo 16. Yarışmalı inhibisyon reaksiyon bileşenleri

GES-11			GES-22		
Enzim	Substrat	Raportör Substrat	Enzim	Substrat	Raportör Substrat
0,005 μ M	Seftazidim (0-20004 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,005 μ M	Seftazidim (0-19992 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
0,005 μ M	Seftriakson (0-30000 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,005 μ M	Seftriakson (0-30000 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
0,005 μ M	Sefotaksim (0-30000 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,005 μ M	Sefotaksim (0-300018 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
0,005 μ M	Aztreonam (0-24008 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,005 μ M	Aztreonam (0-24404 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
0,051 μ M	İmipenem (0-8 μ M)	Ampisilin (80 μ M)	0,05 μ M	İmipenem (0-8 μ M)	Ampisilin (80 μ M)

Spektrofotometrik okumalarda 1 ve 0,2 cm'lik kuvars küvetler kullanıldı. β -laktam halkalarının parçalanmasıyla oluşan zamana bağlı absorbans değişimleri spektrofotometrik (Agilent, Cary 60) olarak belirlendi. Substrat konsantrasyonunu arttırmaya raportör substratın parçalanmadığı noktaya gelene kadar devam edildi. Kinetics programı kullanılarak başlangıç hızları hesaplandı. Excel+SDAS programında başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonlarıyla Michealis-Menten denkleminde

yararlanılarak elde edilen formülle (1) grafikler çizildi. V_u raportör substratın inhibe edilmemiş hızı ve K_{dg} %50 V_u 'yu veren inhibitör konsantrasyonudur (Kaitany vd., 2013).

$$V_o = V_u - \frac{V_u \cdot [I]}{K_{dg} + [I]} \quad (1)$$

Grafiklerden elde edilen K_{dg} değerleri ve aşağıda verilen formüllerden (2, 3) faydalanılarak her substrat için K_d (K_m substrat) hesaplandı (Cheng ve Prusoff, 1973).

$$a_s = \frac{K_{dg}}{K_m \text{ substrat}} = 1 + \frac{[\text{raportör}]}{K_m \text{ raportör}} \quad (2)$$

$$K_m \text{ substrat} = \frac{K_{dg}}{1 + \frac{[\text{raportör}]}{K_m \text{ raportör}}} \quad (3)$$

2.20. GES-22 ve GES-11'nin β -Laktamaz İnhibitörlerine Karşı Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Sulbaktam, tazobaktam ve klavulanik asitin serin A β -laktamazları inhibe ettiği bilinmektedir. Sulbaktam, klavulanat ve tazobaktama karşı GES-11 ve GES-22'nin kinetik parametreleri belirlendi. Reaksiyon bileşenleri Tablo 17'de verildi. Spektrofotometrik okumalarda 1 ve 0,2 cm'lik kuvars küvetler kullanıldı. β -laktam halkalarının parçalanmasıyla oluşan zamana bağlı absorbans değişimleri spektrofotometrik (Agilent, Cary 60) olarak belirlendi. Kinetics programıyla başlangıç hızları hesaplandı. K_m ve k_{cat}/K_m değerlerinin belirlenmesi için başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonlarıyla Excel+SDAS programında Michealis-Menten denkleminde yararlanılarak grafikler çizildi. K_d değerlerinin belirlenmesi için ise

başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonları ile Excel+SDAS programında formül (1) ile grafikler çizildi ve formül (2) ve formül (3) kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Tablo 17. β -laktamaz inhibitörleri ile yapılan reaksiyonların bileşenleri

GES-11			GES-22		
Enzim	Substrat	Raportör Substrat	Enzim	Substrat	Raportör Substrat
0,005 μ M	Sulbaktam (0-100 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,005 μ M	Sulbaktam (0-100 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
0,003 μ M	Tazobaktam (0-40 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,002 μ M	Tazobaktam (0-15 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
0,003 μ M	Klavulanat (0-126 μ M)	Nitrosefin (200 μ M)	0,002 μ M	Klavulanat (0-23 μ M)	Nitrosefin (160 μ M)
3,426 μ M	Sulbaktam (0-2000 μ M)	-	4,635 μ M	Sulbaktam (0-2000 μ M)	-
1,371 μ M	Klavulanat (0-584 μ M)	-	1,391 μ M	Klavulanat (0-156 μ M)	-

2.21. PyMOL ile GES-11'in Hidrofobik Etkileşimlerinin Gösterilmesi ve Sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile Süperpozisyonu

GES-11 (PDB: 3V3R) ve Toho-1 E166A-sefotaksim kompleksi (PDB: 1IYO) protein veri bankasından .pdb uzantılarıyla indirildi. Bu yapılar PyMOL (Schrödinger, 2014) programına yüklendi, GES-11'in Toho-1 ile süperpozisyon görüntüsü elde edilmeye çalışıldı. Programın mutagenesis özelliği kullanılarak GES-11'de 169. pozisyon lösine dönüştürüldü. GES-11'de M169'un hidrofobik etkileşimleri belirlendi.

2.22. W222L, I129V ve P130Q Klinik Mutasyonlarının OXA-66'nın β -Laktam Hidroliz Profili Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Acinetobacter baumannii'de bulunduğu belirlenen OXA-51 grubuna dahil OXA-66'da (Hu vd., 2007; Gonzalez vd., 2010) OXA-51'de meydana gelen klinik mutasyonlar yapılarak, bu mutasyonların substrat hidroliz profili üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

2.22.1. OXA-66/W222L üzerinde I129V ve P130Q Mutasyonlarının Yapılması

pET24a-OXA-66/W222L (sinyal sırasız) vektörü Grand Valley State University Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edildi. Rekombinant vektör kalıp olarak kullanılarak I129V ve P130Q mutasyonlar yapıldı. Mutasyonlar iki basamaklı PZR ile gerçekleştirildi. Birinci PZR basamağında NdeI ve XhoI kesim bölgeleri bulunduran mutasyon primerleri (P130Q_F : 5'-GCT TCC GCT ATT CAG GTT TAT CAA G -3'; P130Q_R: 5'-ATC TTG ATA AAC CTG AAT AGC GGA AGC- 3'; I129V_F: 5'-CCG CTG TTC CGG TTT ATC AAG ATT TAG-3'; I129V_R: 5'-CCG GAA CAG CGG AAG CTT TCA TAG C-3') ve T7 ileri ve geri primerleri kullanılarak genler iki parça halinde elde edildi. PZR bileşenleri Tablo 18'de verildi. Amplifikasyon için döngü şartları: 5 dk 98°C; 30 sn 98°C, 30 sn 52°C, 1 dk 72°C (29 döngü) ve son sentez 10 dk 72°C. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

İkinci PZR basamağında ise T7 ileri ve geri primerleri ve kalıp olarak birinci PZR basamağında elde edilen amplifikasyon ürünleri kullanılarak NdeI-XhoI kesim bölgeleri bulunduran genlerin tamamı çoğaltıldı. PZR bileşenleri Tablo 19'da verildi. Amplifikasyon için döngü şartları: 5 dk 98°C, 30 sn 98°C, 30 sn 52°C, 1 dk 72°C (29 döngü) ve son sentez 10 dk 72°C. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Tablo 18. Birinci PZR basamağı reaksiyon bileşenleri

	1 (µl)	2 (µl)	3 (µl)	4 (µl)
dd H ₂ O	31,5 µl	31,5 µl	31,5 µl	31,5 µl
Tampon HF	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
dNTPs	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
I129V_F	1 µl			
P130Q_F			1 µl	
I129V_R		1 µl		
P130Q_R				1 µl
T7_F		1 µl		1 µl
T7_R	1 µl		1 µl	
pET24a-OXA-66/W222L	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Polimeraz	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Toplam Hacim	50	50	50	50

Tablo 19. İkinci PZR basamağı reaksiyon bileşenleri

	1 (µl)	2 (µl)
dd H ₂ O	22,5	22,5
Tampon HF	10	10
dNTPs	5	5
T7_F		1
T7_R	1	
Polimeraz	0,5	0,5
1. PZR ürünü	5	
2. PZR ürünü	5	
3. PZR ürünü		5
4. PZR ürünü		5
Toplam Hacim	50	50

PZR ürünleri Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) ile jelden saflaştırıldı. DNA miktarları NanoDrop yardımıyla belirlendi. PZR ürünleri ve pET-24a ile 37°C'de 90 dakika boyunca NdeI ve XhoI kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Kesim sonucunda vektör jelden Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırıldı. Vektör, PZR

ürünleri, 10 ünite T4 DNA ligaz (Promega) ve 1X T4 ligasyon tamponu 20 µl hacimde 16°C’de gece boyu inkübe edilerek ligasyon sağlandı. Elde edilen ligasyon ürünleri NEB 5α hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden Plazmit DNA İzolasyon kitiyle (Thermo Scientific) plazmit DNA izole edildi. Plazmitlerle 37°C’de 90 dakika boyunca NdeI-XhoI kesimi yapıldı. Kesim sonucuna göre arzu edilen genleri taşıdığı düşünülen plazmitler baz dizin analizine gönderildi.

2.22.2 pET-24a-OXA-66/W222L, pET-24a-OXA-66/W222L/P130Q ve pET-24a-OXA-66/W222L/I129V’nin *E. coli* BL21’e Transformasyonu ve Ekspresyonun İndüklenmesi

*bla*_{OXA-66/W222L}, *bla*_{OXA-66/W222L/P130Q} ve *bla*_{OXA-66/W222L/I129V} genlerini içeren plazmitler *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Transformasyon sonucunda rastgele birer koloni seçildi ve ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyonun için seçilen koloniler gece boyunca 37°C’de 25 µg/ml kanamisin içeren 50 ml besiyerinde büyütüldükten sonra 25 µg/ml kanamisin içeren 2000 ml LB besiyerlerine yeniden ekildi ve 37°C’de inkübe edildi. OD 600’de 0,6-0,8 olunca son hacim 0,1 mM IPTG (izopropil β-D-1-Tiyogalaktopiranozit) ile indüklenerek 3 saat 37°C’de büyütüldü.

2.22.3 OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V’nin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

İndüklemeler sonucunda hücreler 7500 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Lizisi kolaylaştırmak için pelletler bir gece -20°C’de bekletildi. Pelletler 20 ml lizis tamponu (50 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,0) ve HALT proteaz inhibitör kokteyli (Pierce) ile süspansiyon edildi. Daha sonra 1 ml lizozim (10 mg/ml) eklenerek viskozitenin artması için beklendi. Viskozite iyice artınca 10 µl DNaz I (5 mg/ml) ve 100 µl 1 M MgCl₂ eklendi. Viskozite tamamen ortadan kalkınca 15.000 rpm’de 4°C’de 30 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar 4 L diyaliz tamponunda (5 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) 4°C’de bir gece boyunca diyaliz edildi.

Karboksi-metil selüloz (CM-23, Sigma) kolonu 1,5 x 3 cm boyutlarında hazırlandı ve 100 ml diyaliz tamponu ile (5 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) dengelendi. Süpernatantlar kolona yüklenerek kolondan akması sağlandı. Daha sonra yaklaşık 10 ml diyaliz tamponu ile (5 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) kolon çeperleri iyice temizlendi. Fraksiyon toplayıcısına 30 tane deney tüpü yerleştirildi. Kolon 25 ml diyaliz tamponu (5 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) ile yıkandı. Diyaliz tamponu (5 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) ve elüsyon tamponu (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) ile gradiyent oluşturarak her bir tüpe 160 damla birikecek şekilde fraksiyon toplayıcı çalıştırıldı. Saflaştırma basamakları 4°C'de gerçekleştirildi. Bradford deneyi (20 µl fraksiyon ve 1X 10 µl Bradford boyası) ile hangi fraksiyonların SDS-PAGE'e yüklenileceğine karar verildi. SDS-PAGE analizi yapıldı.

2.22.4 OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Konsantre Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Proteinler Amicon Ultra 10 kDa MWCO (Millipore) ile konsantre edildi. Proteinlerin moleküler ağırlıkları ve ekstinksiyon katsayıları ExPASy ProtParam (URL-9, 2015) yardımıyla belirlendi. Daha sonra proteinler Guanidine HCl ile seyreltilerek 270 nm-400 nm arasında (Beckmann DU 800, USA) absorbanları ölçüldü. Beer-Lambert yasasından yararlanılarak moleküler ağırlıkları, ekstinksiyon katsayıları ve absorbanları kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Daha sonra proteinler 300'er µl olacak şekilde ependorflara konuldu. Proteinler sıvı azotta dondurularak, -80°C'de saklandı.

2.22.5. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi

50 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ tamponunda (pH 7,4) enzim ve farklı konsantrasyonlarda substratlarla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda kullanılacak enzim konsantrasyonlarına, farklı enzim konsantrasyonları ve sabit substrat

konsantrasyonlarında deneyler yapılarak karar verildi. Deneylerde kullanılan β -laktamların ekstinksiyon katsayıları, dalga boyları ve faktörler Tablo 20’de verildi.

Tablo 20. β -laktamlara özgü ekstinksiyon katsayıları, dalga boyları ve faktörler

Beta-Laktam Sınıfı	β -laktam	Dalga Boyu (nm)	Molar Ekstinksiyon Katsayısı ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Faktör
Penisilinler	Ampisilin	235	-900	1111,11
Sefalosporinler	Seftazidim	260	-8660	115,47
	Sefotaksim	260	-7500	133,33
	Sefalotin	260	-6500	153,83
	Seftriakson	260	-9400	106,38
	Sefepim	260	-10000	100
Karbapenem	İmipenem	300	-9000	111,11
	Doripenem	297	-11460	87,26
Monobaktam	Aztreonam	320	-700	1428,57

Spektrofotometrik okumalarda 1 cm ve 0,2 cm’ lik kuvars küvetler kullanıldı. β -laktam halkalarının parçalanmasıyla oluşan zamana bağlı absorbans değişimleri spektrofotometrik (Agilent, Cary 60) olarak belirlendi. Kinetics programıyla başlangıç hızları hesaplandı. Moları mikromolara çevirmek için Beer-Lambert yasasından yararlanılarak elde edilen faktörler, program tarafından ilk 10 saniyede alınan eğim ile çarpıldı. Başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonlarıyla Excel+SDAS programında Michealis-Menten denkleminde yararlanılarak grafikler çizildi.

Enzimlere bağlanma afinitesi yüksek olan imipenem ve doripenemin enzimlere olan bağlanma afinitelerini tespit etmek için yarışmalı inhibisyon deneyleri yapıldı. Deneylerde raportör substrat olarak ampisilin kullanıldı. Ampisilin konsantrasyonları sabit tutularak, substratların konsantrasyonları değiştirildi. Deneyler 50 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 tamponunda (pH 7,4) gerçekleştirildi. K_m değerlerine yakın konsantrasyonlar, reaksiyonlarda raportör substratların konsantrasyonları olarak

kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 21’de verildi. Spektrofotometrik okumalar sonucunda Kinetics programıyla başlangıç hızları hesaplandı. K_d değerlerinin belirlenmesi için başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonları ile Excel+SDAS programında formül (1) ile grafikler çizildi ve formül (2) ve formül (3) kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Tablo 21. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/129V ve OXA-66/W222L/P130Q yarışmalı inhibisyon reaksiyon bileşenleri

		İmipenem	Doripenem
OXA-66/W222L	Enzim	0,044 μM	0,044 μM
	Substrat	(0-51,84 μM)	(0-6,4 μM)
	Raportör Substrat	Ampisilin (2019 μM)	Ampisilin (2000 μM)
OXA-66/W222L/P130Q	Enzim	0,029 μM	0,018 μM
	Substrat	(0-8 μM)	(0-1,92 μM)
	Raportör Substrat	Ampisilin (727 μM)	Ampisilin (727 μM)
OXA-66/W222L/I129V	Enzim	0,022 μM	0,022 μM
	Substrat	(0-1,92 μM)	(0-0,82 μM)
	Raportör Substrat	Ampisilin (1850 μM)	Ampisilin (1814 μM)

3. BULGULAR

3.1. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Oranları

A. baumannii izolatlarının çoğu imipeneneme (% 95) ve meropeneneme (% 94) dirençli bulundu. Direnç oranları, ampisilin-sulbaktam için % 97, piperasilin için % 97, piperasilin-tazobaktam için % 97, seftazidim için % 97, sefoparozon-sulbaktam için % 87, sefepim için % 97, amikasin için % 63, siprofloksasin için % 94, levofloksasin için % 89, tetrasiklin için % 70, trimetoprim-sulfometaksozol için % 69 ve gentamisin için % 48 olarak belirlendi. Tigesiklin ve netilmisin için dirençlilik oranları sırasıyla % 8 ve % 11 olarak belirlendi (Tablo 22). Tüm izolatlar kolistine duyarlı bulundu. İki antibiyotik grubundan daha fazlasına direnç gösteren suşlar çoklu ilaç dirençli, beş antibiyotik grubuna direnç gösteren suşlar yaygın ilaç dirençli olarak tanımlanmaktadır (Magiorakos vd., 2012). Antibiyotik duyarlılıklarına göre suşların % 96'sı çoklu ilaç dirençli suş olarak belirlendi. Bunların % 98'i yaygın ilaç dirençli olarak belirlendi.

Tablo 22. Antibiyotik duyarlılık oranları

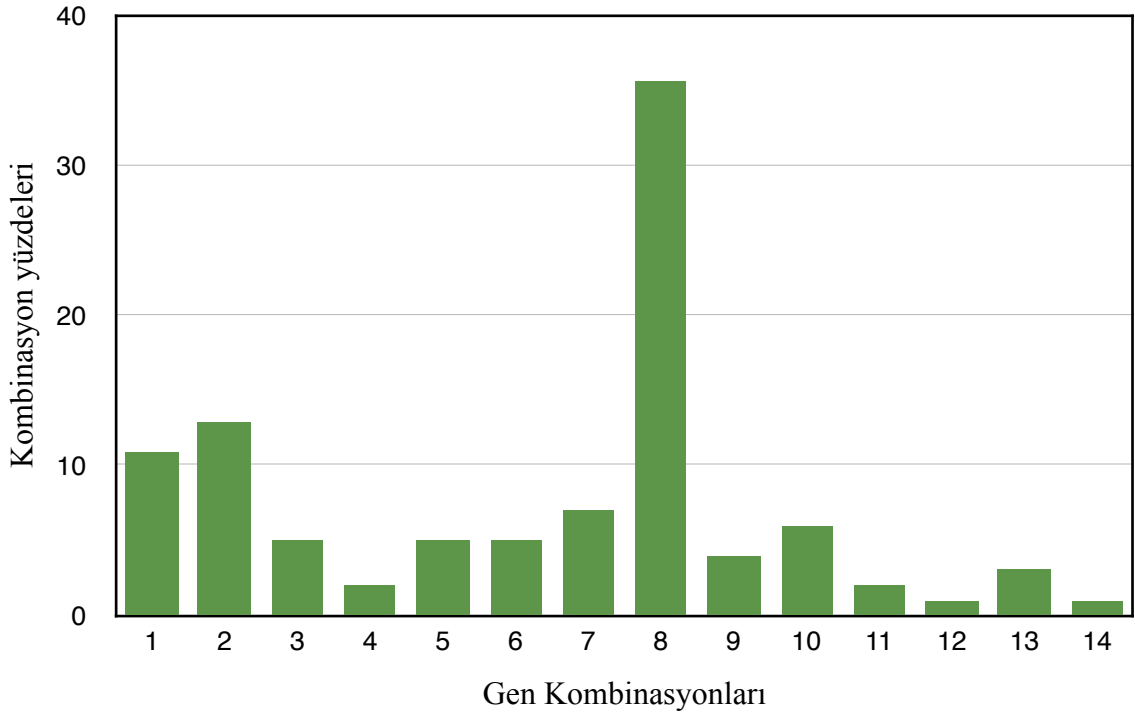
Antibiyotikler	Antibiyotik Duyarlılıkları (n=101)		
	% Dirençli	% Orta Duyarlı	% Duyarlı
Ampisilin-Sulbaktam	97	0	3
Piperasilin	97	0	3
Piperasilin-tazobaktam	97	0	3
Seftazidim	97	0	3
Sefoparozon-sulbaktam	87	6	7
Sefepim	97	0	3
Amikasin	63	2	35
Gentamisin	48	10	42
Netilmisin	11	14	75
Siprofloksasin	94	3	3
Levofloksasin	89	8	3

Tablo 22 (devam). Antibiyotik Duyarlılık Oranları

Antibiyotikler	Antibiyotik Duyarlılıkları (s=101)		
	% Dirençli	% Orta Duyarlı	% Duyarlı
Tetrasiklin	70	11	19
Tigesiklin	8	27	65
Kolistin	0	0	100
Trimetoprim-sulfametoksazol	69	0	31
İmipenem	95	2	3
Meropenem	94	3	3

3.2. Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Tespit Edilmesi ve Baz Dizin Analizi

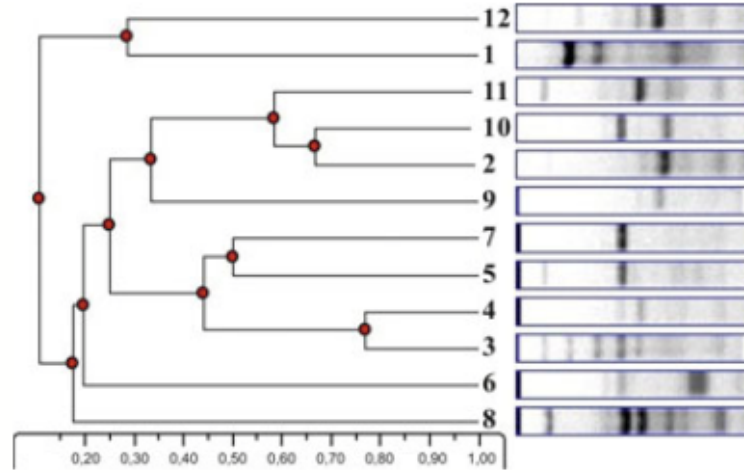
79 suş *bla_{OXA-23}* benzeri genler için pozitif sonuç verdi. Suşlardan sadece birinde *bla_{OXA-40}* benzeri gen tespit edildi. *bla_{OXA-51}* benzeri genler tüm suşlarda bulundu. Bu suşların % 80'inde *bla_{OXA-51}* ile birlikte *ISAbal* elementinin bulunduğu gözlemlendi. 66 suşun *bla_{OXA-51}*, *ISAbal* ve *bla_{OXA-23}* birlikte bulundurduğu tespit edildi. *bla_{OXA-40}* benzeri geni taşıyan suşta *bla_{OXA-51}* benzeri gen ve *ISAbal* elementi bulunduğu gözlemlendi. *bla_{GES}* benzeri genler 24 suşta tespit edildi. Aminoglikozit modifiye edici enzimleri kodlayan *aac-3-Ia* geni 13 suşta ve *aac-6'-Ib* geni 15 suşta bulundu. Suşların % 95'nin birden fazla direnç genini taşıdığı gözlemlendi. *bla_{OXA-51}/ISAbal/bla_{OXA-23}/bla_{GES}/aac-6'-Ib* bir arada 16 suşta bulunurken bu genlerin kombinasyonu ve *aac-6'-Ib* yerine *aac-3-Ia* bulunduran 4 suş tespit edildi. *bla_{OXA-58}*, *bla_{VEB}*, *bla_{PER-2}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM-1}* ve *bla_{NDM-1}* genleri tespit edilmedi. pGEMT'ye klonlanan 24 *bla_{GES}* PZR ürünü nün baz dizin analiz sonucunda 16 GES-11 ve 8 GES-22 tipi β-laktamaz tespit edildi. Şekil 10'da gen kombinasyonları ve gen kombinasyonlarının suşlarda bulunma oranları verilmiştir. Şekil 10'a göre suşlar arasında en fazla *bla_{OXA-51}*, *ISAbal* ve *bla_{OXA-23}* kombinasyonu bulunmaktadır.



Şekil 10. 101 *A. baumannii* suşunda tespit edilen gen kombinasyon yüzdeleri. 1: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*bla*_{GES}, 2: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}, 3: *bla*_{OXA-51}, 4: *bla*_{OXA-51}/*aac-6'-Ib*, 5: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-6'-Ib*, 6: *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*, 7: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-6'-Ib*/*bla*_{GES}, 8: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*, 9: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-3-Ia*/*bla*_{GES}, 10: *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*/*aac-3-Ia*, 11: *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*/*bla*_{GES}, 12: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-24}/*ISAbal*, 13: *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-3-Ia*, 14: *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*/*aac-6'-Ib*.

3.3. Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (REP-PZR)

101 *A. baumannii* izolatının PEP-PZR ile klonal ilişkileri belirlendi. REP-PZR sonuçlarına göre izolatlar 12 genotip grubuna dahil edildi (Şekil 11). Genotip 6 ve 9, izolatlar arasında en yaygın olan genotiplerdir. Genotip 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 ve 12 izolatlarda sırasıyla % 9,9, % 3,96, % 5,94, % 9,9, % 13,86, %19,8, % 0,99, % 6,93, %19,8, % 1,98, % 1,98 ve % 4,95 oranlarında bulundu. Genotip 1, 12 ve diğer genotiplerden oluşan iki ana grubun olduğu belirlendi. En yüksek benzerliğin genotip 3 ve 4'te olduğu gözlemlendi. 12 genotipe dahil olan izolat sayılarının oranları ve bu suşların barındırdığı gen kombinasyonları Tablo 23'te verildi.



Şekil 11. 101 *A. baumannii* izolatının REP-PZR profilleri

Tablo 23. Genotipler ve gen kombinasyonları

Genotipler	Oran	Gen kombinasyonları
Genotip 1	% 9,9	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAb</i> <i>1</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-6'-Ib</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-3-Ia</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-3-Ia</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-24} / <i>ISAb</i> <i>1</i>
Genotip 2	% 3,96	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-6'-Ib</i> / <i>bla</i> _{GES}
Genotip 3	% 5,94	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>aac-6'-Ib</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAb</i> <i>1</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i>
Genotip 4	% 9,9	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-6'-Ib</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-3-Ia</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-3-Ia</i>
Genotip 5	% 13,86	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>aac-6'-Ib</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i>
Genotip 6	% 19,8	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-6'-Ib</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAb</i> <i>1</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i>
Genotip 7	% 0,99	<i>bla</i> _{OXA-51}
Genotip 8	% 6,93	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i> / <i>aac-6'-Ib</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAb</i> <i>1</i>

Tablo 23 (devam). Genotipler ve gen kombinasyonları

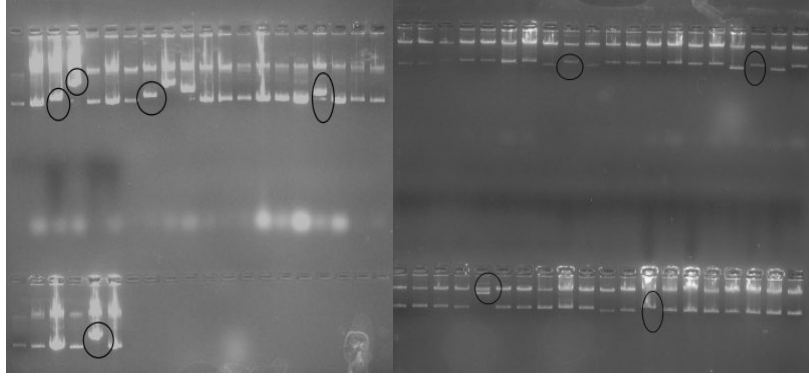
Genotipler	Oran	Gen kombinasyonları
Genotip 9	% 19,8	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> / <i>aac-6'-Ib</i> , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> , <i>aac-6'-Ib</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> / <i>aac-3-Ia</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAba1</i> / <i>aac-3-Ia</i> <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>ISAba1</i> / <i>aac-6'-Ib</i>
Genotip 10	% 1,98	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i>
Genotip 11	% 1,98	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> / <i>aac-3-Ia</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> / <i>aac-6'-Ib</i>
Genotip 12	% 4,95	<i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23} / <i>ISAba1</i> / <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-51} / <i>bla</i> _{OXA-23}

3.4. Konjugasyon

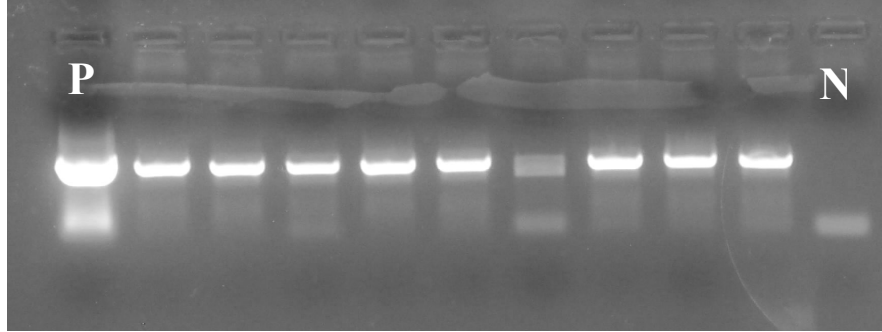
Pozitif kontrol suşunda konjugasyon deneyi başarıyla gerçekleştirildi. GES-11 ve GES-22 barındıran *A. baumannii* izolatları ile yapılan konjugasyon deneyleri sonucunda ampisilin ve rifampisinli EMB'de büyüyen *Escherichia coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) transkonjugantları tespit edilmedi. *Escherichia coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) alıcı hücrelerine GES-11 ve GES-22 genleri aktarılamadığı belirlendi.

3.5. *bla*_{GES} Genlerinin pET100/D-TOPO Vektörüne Klonlanması

Klonlama sonucunda seçilen kolonilerden izole edilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü Şekil 12'de verildi. Plazmitler kalıp olarak *bla*_{GES} primerleriyle yapılan PZR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 13'te verildi.



Şekil 12. Plazmid izolasyon sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi (yuvarlak içine alınanlar PZR'da kalıp olarak kullanılan plazmitler)



Şekil 13. GES PZR sonuçlarının görüntülenmesi. P: pozitif kontrol N: negatif kontrol

3.5.1. Baz Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elde edilen nükleotid sıraları Expasy Proteomics Server (URL-10, 2014) kullanılarak amino asit sırasına çevrildi. Başlangıç ve stop kodununu içeren 5'→3' yönündeki açık okuma zincirleri BLAST'a girilerek veri tabanındaki benzer proteinlerle karşılaştırma yapıldı (Altschul vd., 1990). GES-11 ve GES-22 proteinlerinin doğru oryantasyonda pET100/D-TOPO vektörüne klonlandığı tespit edildi (Tablo 24).

Tablo 24. BLAST analizi sonuçları

Amino asit sırası	GES aleli
MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFFKTDLEKLE EREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRFAM CSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGP DMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQAAVQL SDNGATNLLREIGGPAAMTQYFRKIGDSVS RLDRKEPELGDNTPGDLRDTTTPIAMARTVA KVLYGGALTSTSTHTIERWLIQNTGDATLR AGFPKDWVVGEEKTGTCANGARNDIGFFKAQE RDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVIT QLILSTDK	GES-22 287 amino asit %99 GES-11'e benzer (M169L)
MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFFKTDLEKLERE KAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRFAMCSTFKF PLAALVFERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPA TERFLASGHMTVLEAAQAAVQLSDNGATNLLRE IGGPAAMTQYFRKIGDSVSRLLDRKEPEMGDNTPG DLRDTTTPIAMARTVAKVLYGGALTSTSTHTIER WLIQNTGDATLRAGFPKDWVVGEEKTGTCANGAR NDIGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVA SVGQVITQLILSTDK	GES-11 286 amino asit

3.6. GES-11 ve GES-22'yi Barındıran Hücrelerin Bazı Antibiyotikler İçin MİK Değerleri

pET100/D-TOPO_GES-11 ve pET100/D-TOPO_GES-22 vektörlerini içeren *One Shot® TOP10* hücrelerinin ve GES-11 ve GES-22'yi bulundurduğu tespit edilen *Acinetobacter baumannii* izolatlarının ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefoperazon/sulbaktam, sefepim, imipenem ve meropenem için MİK değerleri belirlendi (VITEK 2 System). Tüm antibiyotikler arasında sadece piperasilin-tazobaktama karşı pET100/D-TOPO_GES-11 ve pET100/D-TOPO_GES-22 vektörlerini içeren *One Shot® TOP10* hücrelerinin MİK değerlerinde farklılık gözlemlendi. Ayrıca ampisilin/sulbaktam ve piperasiline karşı MİK değerlerinin klinik izolatdaki MİK değerleriyle aynı olduğu gözlemlendi (Tablo 25).

Tablo 25. Bazı antibiyotikler için MİK değerleri

	GES-11 (One Shot® TOP10)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (GES-11)	GES-22 (One Shot® TOP10)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (GES-22)
Ampisilin/Sulbaktam	>=32	>=32	>=32	>=32
Piperasilin	>=128	>=128	>=128	>=128
Piperasilin/Tazobaktam	<=4	>=128	64	>=128
Seftazidim	<=1	>=64	<=1	>=64
Sefoperazon/Sulbaktam	<=8	>=64	<=8	>=64
Sefepim	<=1	>=64	<=1	>=64
İmipenem	<=0,25	>=16	<=0,25	>=16
Meropenem	<=0,25	>=16	<=0,25	>=16

3.7. GES-22’de Yapılan Alanin Mutasyonlarının MİK Üzerine Etkileri

Amoksisilin için MİK değerlerinin GES-22 ve alanin mutantlarında aynı olduğu belirlendi. GES-22 ve varyantlarının sefiksime, sefoperazon/sulbaktam, meropenem, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, imipenem için MİK değerlerinin benzer olduğu gözlemlendi. GES-22 T216A’da sefaklor için MİK değerinin GES-22’nin MİK değerinin 4 katına çıktığı gözlemlendi. Bazı hücrelerin piperasilin/tazobaktam ve tikarsilin/klavulanik asit için MİK değerlerinde % 62,5-% 97,6 azalma gözlemlendi (Tablo 26).

Tablo 26. *Oneshot E. coli* hücrelerinin bazı antibiyotikler için MİK değerleri

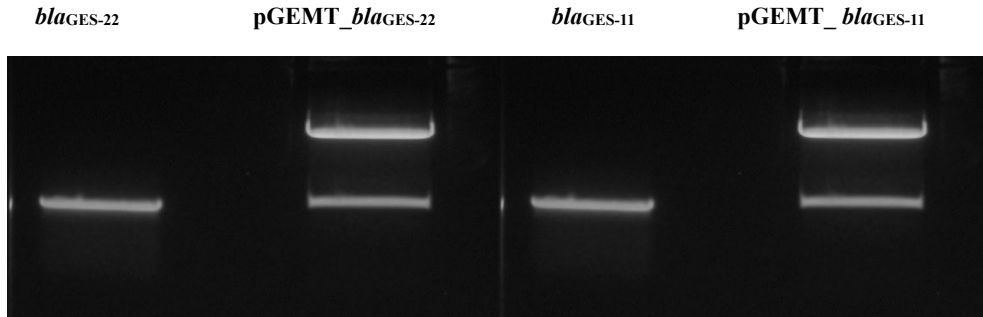
Antibiyotik	<i>Oneshot E. coli</i> (pTOPO-GES-22)								
	L169A	D276A	K30A	T220A	D179A	K251A	I290A	T216A	
AC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
IX	0,25	0,25	0,19	0,25	0,25	0,38	>0,19	>0,125	>0,125
PTC	>256	>256	>256	>256	>256	>32	16	6	>256
CPS	6	6	>8	6	8	8	>8	8	8
MEM	0,015	0,015	>0,015	0,015	0,03	>0,015	>0,015	>0,015	>0,015
TLC	>256	>256	>256	>256	>256	96	>256	>256	>256

Tablo 26 (devam). *Oneshot E. coli* hücrelerinin bazı antibiyotikler için MİK değerleri

<i>Oneshot E. coli</i> (pTOPO-GES-22)									
Antibiyotik	L169A	D276A	K30A	T220A	D179A	K251A	I290A	T216A	
XL	16	12	16	>16	16	12	>12	12	>12
FX	>4	3	3	6	4	3	>2	3	3
CF	4	4	12	6	8	12	8	8	16
IPM	0,5	>0,5	1	0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5

3.8. *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in pET-28a'ya Klonlanması

*bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'in XhoI kesim bölgelerinin (CTCGAG) baz dizin analiz sonucuna göre yönlendirilmiş mutasyonla "CTCGAA" olarak değiştirildiği tespit edildi. Yapılan sessiz mutasyon GES-22 ve GES-11'in amino asit sıralarında herhangi bir değişime neden olmadı. *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11} pGEMT vektöründen EcoRI-XhoI kesimiyle çıkarıldı (Şekil 14). Bu genler EcoRI ve XhoI kesim bölgelerinden pET-28a'ya klonlandı. EcoRI ve XhoI kesimi ile *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'i içine alan plazmitler tespit edildi (Şekil 15). Baz dizin analizi sonuçlarından elde edilen nükleotid sıraları ExPASy Proteomics Server (URL-10, 2014) kullanılarak amino asit sırasına çevrildi. Başlangıç ve stop kodununu içeren 5'→3' yönündeki açık okuma zincirleri BLAST'a girilerek veri tabanındaki benzer proteinlerle karşılaştırma yapıldı (Altschul vd., 1990). *bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'nin pET-28a'ya aktarıldığı doğrulandı.



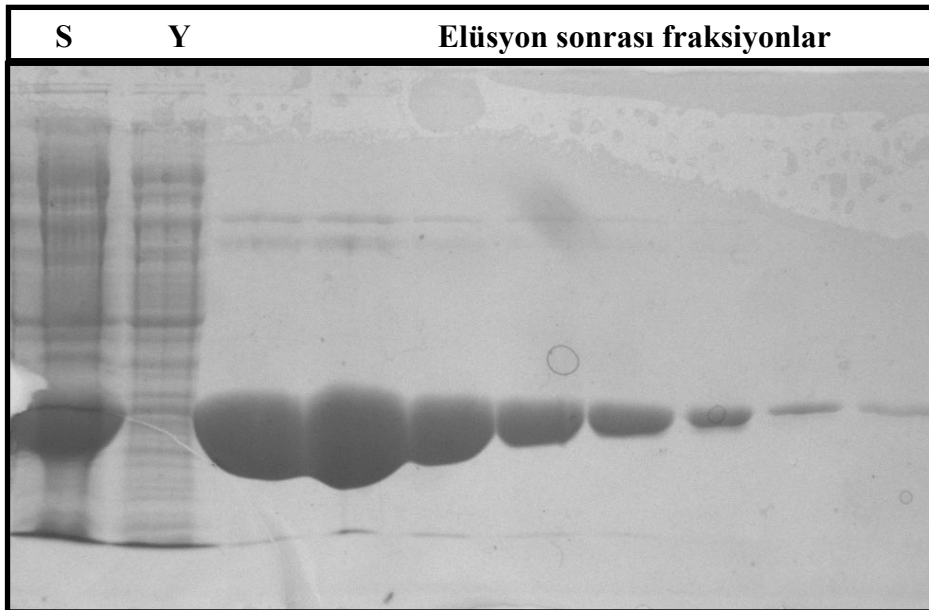
Şekil 14. pGEMT_XhoI_ *bla*_{GES-22} ve pGEMT_XhoI_ *bla*_{GES-11}'in EcoRI-XhoI kesim sonucunun % 1'lik agaroz jel görüntüsü



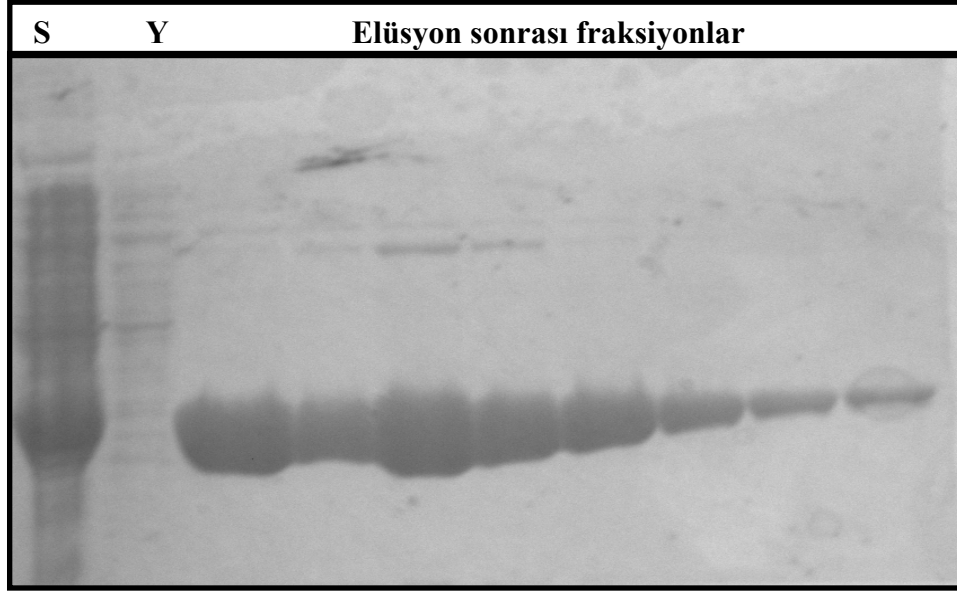
Şekil 15. pET-28a_XhoI_ *bla*_{GES-22} ve pET-28a_XhoI_ *bla*_{GES-11}' in EcoRI-XhoI kesim sonucunun %1'lik agaroz jel görüntüsü K: Kontrol P: Geni içine aldığı düşünülen plazmitler

3.9. GES-11 ve GES-22' nin Saflaştırılması

*bla*_{GES-22} ve *bla*_{GES-11}'i içeren rekombinant vektörler *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine transforme edilerek proteinlerin ekspresyonu indüklendi. Ekspresyonun gözlendiği süpernatant kullanılarak Kobalt Afinite Kromatografisi yöntemiyle saflaştırma yapıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü Şekil 16 ve Şekil 17'de verildi. SDS-PAGE analizine göre, 15 ml tampon C'nin (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 250 mM İmidazol, pH 7,4) kolondan geçirilmesiyle proteinlerin büyük bir kısmı >%95'in üzerinde saflıkta elde edildi.



Şekil 16. GES-22'nin saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü S: Süpernatant Y: Yıkama sonrası elde edilen fraksiyon



Şekil 17. GES-11'nin saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü S: Süpernatant Y: Yıkama sonrası elde edilen fraksiyon

3.10. GES-11 ve GES-22'nin Konsantrasyonları

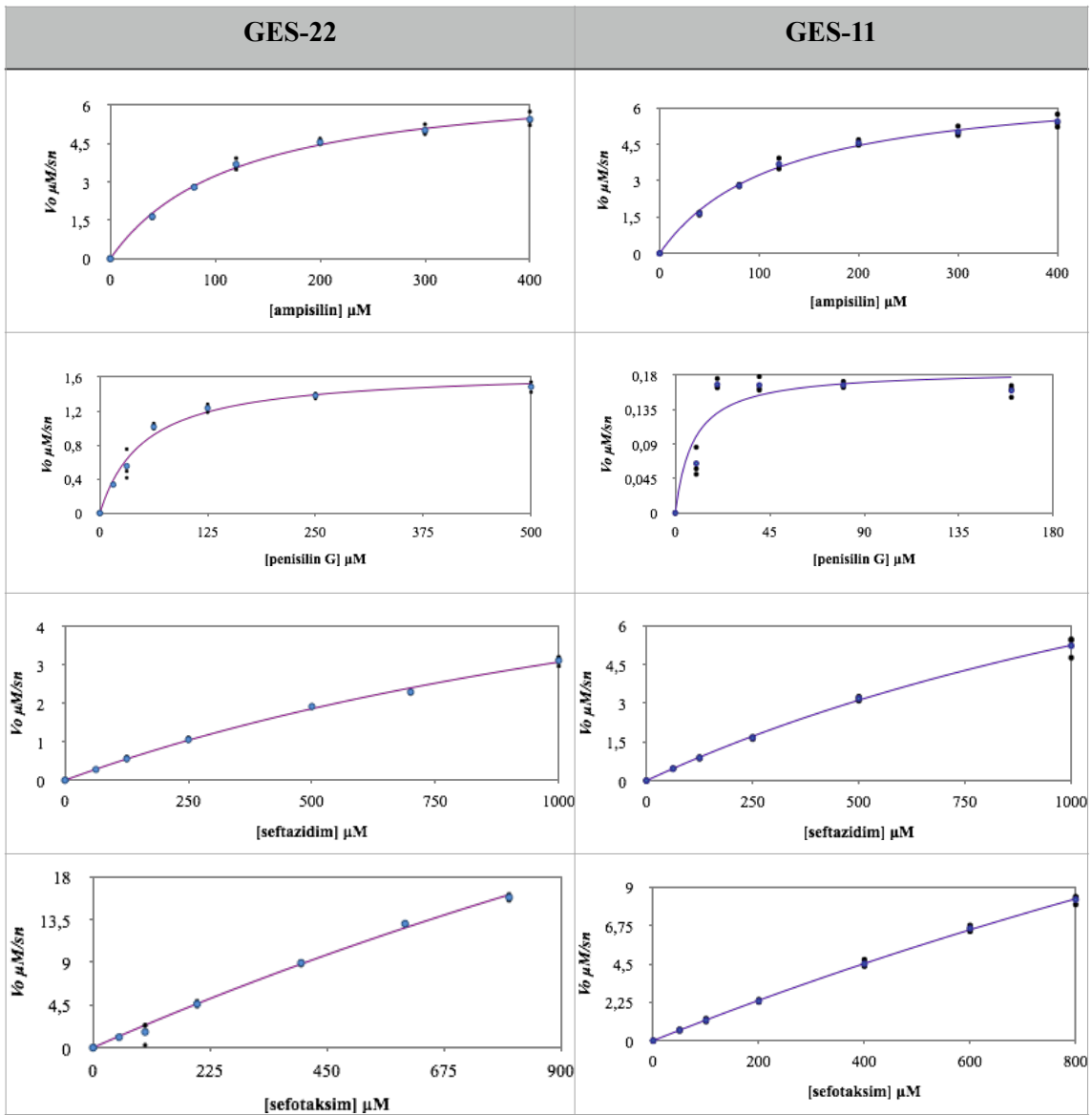
Diyaliz sonrası proteinlerin Guanidin HCl ile seyreltilerek 270 nm-400 nm arasında (Beckmann DU 800, USA) ölçülen absorbans değerleri, moleküler ağırlıkları, ekstinksiyon katsayıları ve dilüsyon faktörleri kullanılarak hesaplanan konsantrasyonlar Tablo 27' de verildi.

Tablo 27. GES-11 ve GES-22'nin konsantrasyonları

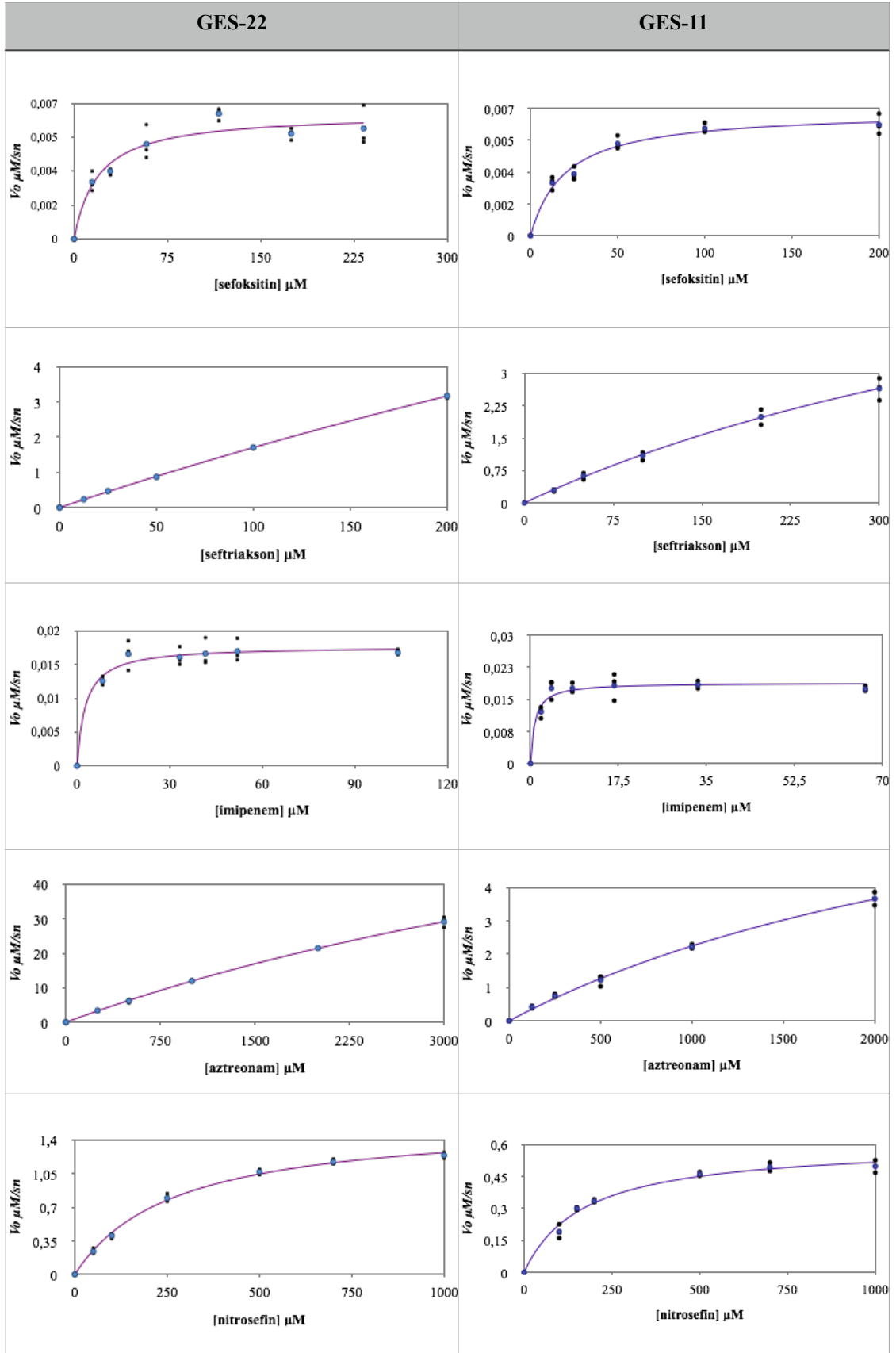
	GES-11	GES-22
Moleküler ağırlık	32192,4	32174,4
Ekstinksiyon katsayısı	24075	24075
Dilüsyon Faktörü	10	10
Absorbans	0,8249	0,558
Konsantrasyon	342,637 μM 11,03 mg/ml	231,77 μM 7,457 mg/ml

3.11. GES-22 ve GES-11'in Bazı Beta-Laktamlar İçin Kinetik Parametreleri

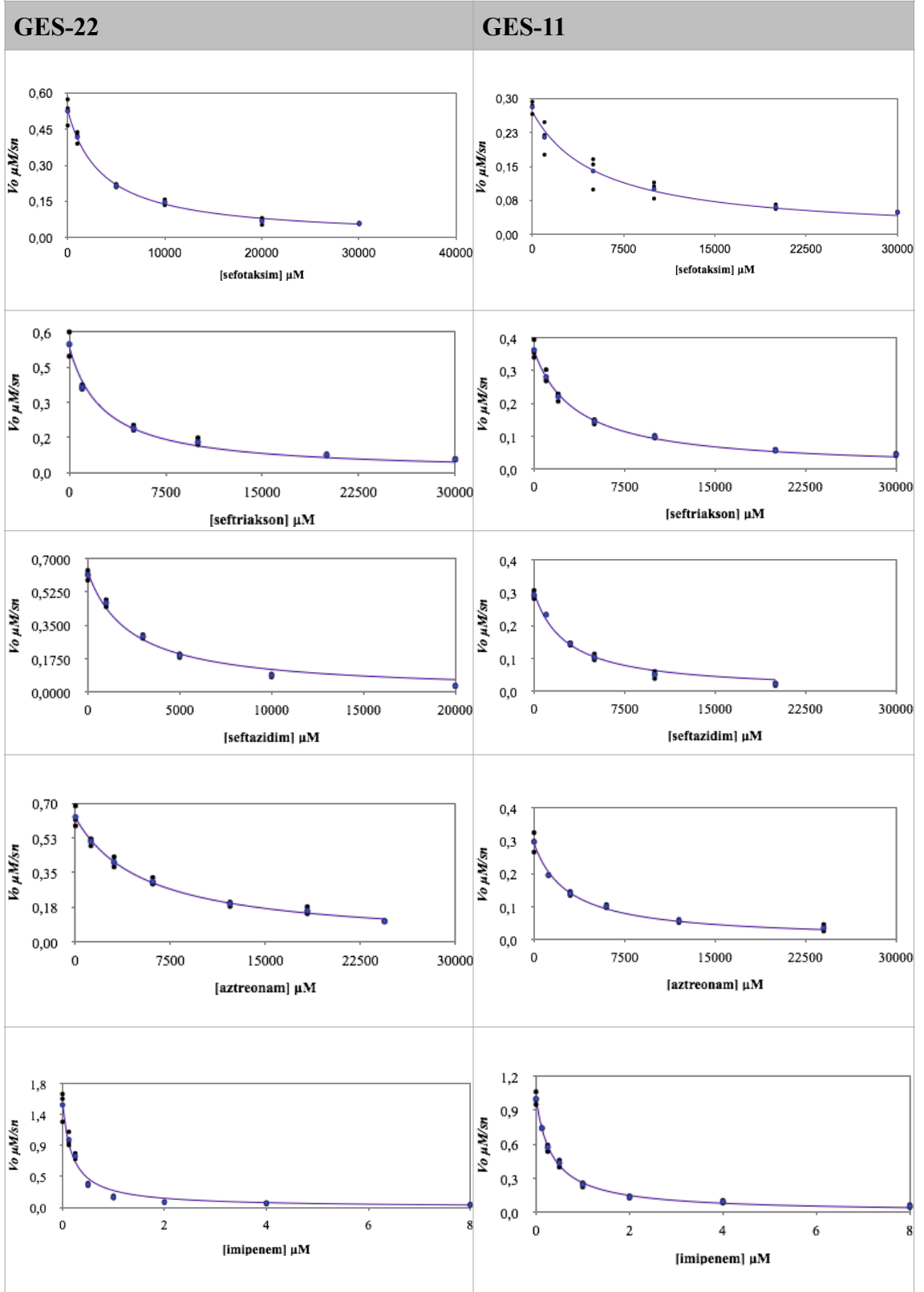
GES-11 ve GES-22' nin ampisilin, penisilin G, seftazidim, sefotaksim, sefoksitin, seftriakson, imipenem, aztreonam ve nitrosefin ile yapılan kinetik deneylerden elde edilen verilere göre Michealis-Menten grafikleri çizildi (Şekil 18). Seftazidim, sefotaksim, seftriakson, imipenem ve aztreonam ile yarışmalı inhibisyon deneylerinden elde edilen grafikler Şekil 19' de verildi.



Şekil 18. GES-11 ve GES-22 için Michealis-Menten grafikleri (Ampisilin, penisilin G, seftazidim, sefotaksim)



Şekil 18 (devam). GES-11 ve GES-22 için Michealis-Menten grafikleri (Sefoksitin, seftriakson, imipenem, aztreonam, nitrosefin)



Şekil 19. GES-22 ve GES-11 ile yarışmalı inhibisyondan elde edilen grafikler (Sefotaksim, seftriakson, seftazidim, aztreonam, imipenem)

Test edilen bütün β -laktamlar arasında GES-22, en yüksek k_{cat} değerini seftriaksona karşı gösterdi ve bu değer GES-11'inkinden daha yüksektir. Ayrıca seftriakson için GES-22, GES-11 göre daha düşük K_m değerine sahiptir. Seftriakson için düşük K_m ve yüksek k_{cat} ile GES-22, GES-11'den daha yüksek katalitik etkinlik oranı gösterdi. Sefotaksim için GES-11 ve GES-22'de benzer k_{cat} değerleri gözlenmesine rağmen GES-22'de daha yüksek afiniteyle GES-11 göre biraz daha yüksek k_{cat}/K_m değeri saptandı. GES-11 ve GES-22'de seftazidime karşı benzer K_m değerleri gözlenirken GES-11 için k_{cat} 'ın GES-22'ye göre yaklaşık 2,4 katı olduğu belirlendi. Dönüşüm sayısındaki bu artış katalitik etkinliğe yansiyarak GES-11'in GES-22'nin yaklaşık 2,3 katı k_{cat}/K_m göstermesine neden oldu (Tablo 28). Bu sonuçlara göre, seftriakson ve sefotaksim sefalosporinleri için GES-22'de GES-11'e göre aktivitede kazanç ve seftazidim için aktivitede kayıp gözlendi.

Genellikle GES tipi β -laktamazlar sefamisinleri parçalayamaz. Tablo 28'deki sonuçlara göre GES-11 ve GES-22 için bu eğilimin varolduğu gözlendi. GES-11'in GES-22'nin yaklaşık 2,4 katı katalitik etkinlik göstermesine rağmen iki enzimin de sefoksitine karşı yüksek afinite ve zayıf hidroliz gösterdiği belirlendi.

GES-22 aztreonama karşı GES-11'in yaklaşık 2,2 katı K_m değerine sahiptir. Buna karşın, GES-22'nin aztreonam için GES-11'in 5 katı dönüşüm sayısı ile bu substratı daha yüksek katalitik etkinlikle parçaladığı belirlendi. GES-22'de seftriakson ve sefotaksim için gözlenen artan katalitik etkinliğin aztreonamda da sürdüğü belirlendi.

Nitrosefin, kromojenik bir sefalosporindir. Yarışmalı inhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere nitrosefin kinetik deneyleri gerçekleştirildi. GES-11'in nitrosefine karşı afinitesinin daha yüksek olduğu fakat GES-22'nin dönüşüm sayısındaki artışla GES-11'e göre katalitik etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlendi.

Penisilin grubu antibiyotiklere karşı (penisilin G ve ampisilin) GES-11'in daha fazla afinitesi olduğu belirlendi. Bununla birlikte, GES-22 için bu antibiyotiklere karşı daha yüksek k_{cat}/K_m ve k_{cat} değerleri belirlendi. GES-11 ve GES-22'nin imipenemi afinitelerinin çok yüksek olduğu ve imipenemi etkili bir biçimde hidroliz edemedikleri belirlendi.

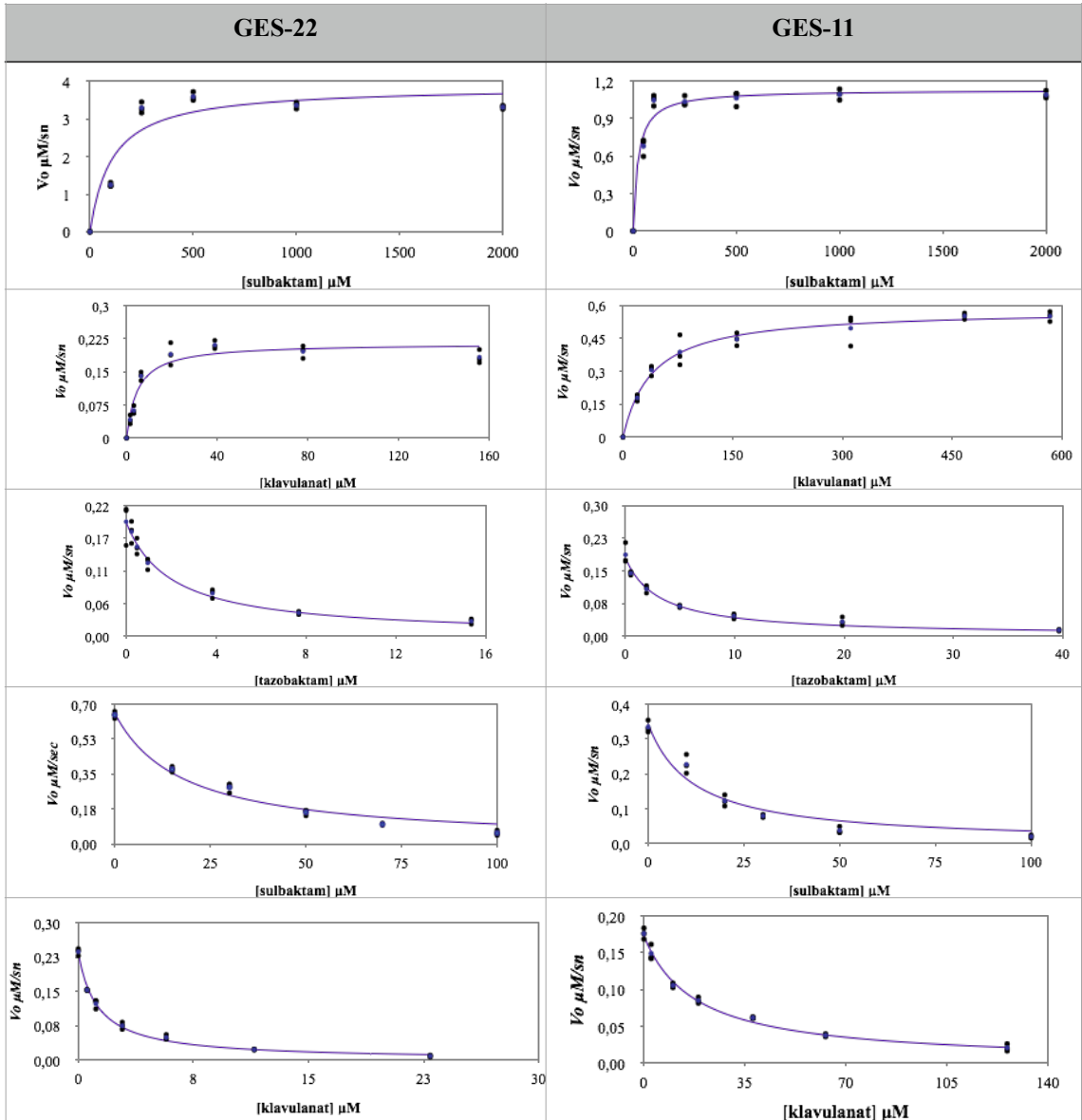
Tablo 28. GES-11 ve GES-22' nin bazı β -laktamlara karşı kinetik parametreleri

	K_m veya K_d (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
GES-11			
Ampisilin	51 \pm 3	21 \pm 0,3	0,41 \pm 0,02
Penisilin G	<15	3,7 \pm 0,2	>0,25
Seftazidim	1400 \pm 250 ^a	40 \pm 7	0,029 \pm 0,001
Sefotaksim	2800 \pm 500 ^a	340 \pm 60	0,12 \pm 0,01
Sefoksitin	20 \pm 3	0,033 \pm 0,002	0,0017 \pm 0,0003
Seftriakson	1800 \pm 300 ^a	260 \pm 40	0,14 \pm 0,01
Aztreonam	1500 \pm 200 ^a	24 \pm 4	0,016 \pm 0,001
İmipenem	0,13 \pm 0,01 ^a	0,0092 \pm 0,0004	0,070 \pm 0,006
Nitrosefin	170 \pm 20	120 \pm 5	0,68 \pm 0,10
GES-22			
Ampisilin	121 \pm 10	71 \pm 2	0,59 \pm 0,05
Penisilin G	52 \pm 8	34 \pm 1	0,65 \pm 0,10
Seftazidim	1350 \pm 210 ^a	17 \pm 3	0,013 \pm 0,001
Sefotaksim	2050 \pm 190 ^a	320 \pm 30	0,16 \pm 0,01
Sefoksitin	19 \pm 6	0,014 \pm 0,001	0,00072 \pm 0,00022
Seftriakson	1550 \pm 220 ^a	340 \pm 50	0,22 \pm 0,01
Aztreonam	3200 \pm 280 ^a	120 \pm 10	0,039 \pm 0,001
İmipenem	0,11 \pm 0,02 ^a	0,013 \pm 0,001	0,11 \pm 0,02
Nitrosefin	270 \pm 20	320 \pm 10	1,2 \pm 0,1

a. K_d

3.12. GES-22 ve GES-11'in β -Laktamaz İnhibitörlerine Karşı Kinetik Özellikleri

Başlangıç hızları ve substrat konsantrasyonları kullanılarak Excel+SDAS programı ile çizilen grafikler Şekil 20'de verildi. Grafiklerden elde edilen K_d değerlerinden faydalanılarak hesaplanan K_d değerleri ve kinetik deneyler sonucunda elde edilen diğer parametreler Tablo 29'da verildi.



Şekil 20. İnhibitörlerle GES-22 ve GES-11'in kinetik deneyleri sonucunda elde edilen grafikler (sulbaktam, klavulanat, tazobaktam)

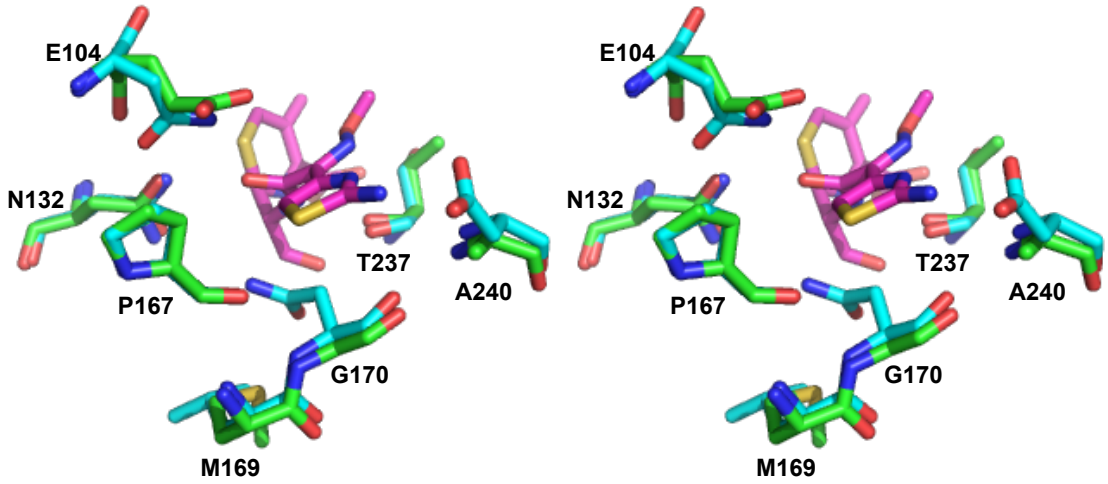
Tablo 29. GES-11 ve GES-22'nin β -laktamaz inhibitörlerine karşı kinetik parametreleri

	K_d (μM)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
GES-11				
Tazobaktam	1,6 \pm 0,3	-	-	-
Klavulanat	9,3 \pm 1,4	41 \pm 4	0,42 \pm 0,01	0,011 \pm 0,0001
Sulbaktam	6,1 \pm 1,6	23 \pm 7	0,33 \pm 0,01	0,014 \pm 0,004
GES-22				
Tazobaktam	1,2 \pm 0,14	-	-	-
Klavulanat	0,73 \pm 0,08	4,8 \pm 1,4	0,15 \pm 0,01	0,032 \pm 0,0095
Sulbaktam	10 \pm 2	110 \pm 61	0,83 \pm 0,10	0,0078 \pm 0,0045

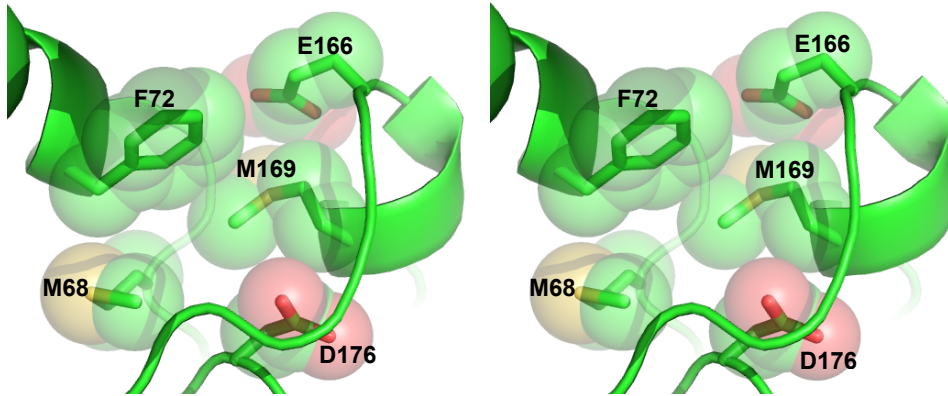
GES-11 ve GES-22'nin tazobaktam için benzer K_m değerlerine sahip olduğu belirlendi. GES-11 ve GES-22'nin sınıf A β -laktamazların kovalent inhibitörleri sulbaktam ve klavulanatı hidroliz ettiği tespit edildi. GES-22'de klavulanat için K_m değerinde yaklaşık 9 kat azalma gözlemlendi (41 μM -4,8 μM). Bağlanma afinitesindeki bu belirgin artış k_{cat} değerindeki azalmayla dengelenmesine rağmen k_{cat}/K_m oranı yaklaşık 3 katına çıktı (0,011 $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ -0,032 $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). GES-22'de sulbaktam için k_{cat} ve K_m değerlerinde artma ve k_{cat}/K_m oranında yaklaşık % 50 azalma gözlemlendi (Tablo 29).

3.13. GES-11'de M169'un Hidrofobik Etkileşimleri ve GES-11'in Sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile Süperpozisyonu

PyMOL ile GES-11'de M169 lösine çevrildiğinde γ -dallanmış yan zincirin herhangi bir sterik engellemeye neden olmadığı belirlendi. GES-11'in sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile süperpozisyonunda (Şekil 21), P167, N170, S237, D240 ve R274'ün Toho-1 E166A'nın sefotaksim büyük thiazolidin yan zinciri ile bağlanma bölgesi oluşturduğu görüldü. GES-11'de M169'un yan zincirinin F72, M68, E166'nın γ -karbonu ve D176'nın β -karbonu ile etkileşim yaptığı tespit edildi (Şekil 22).



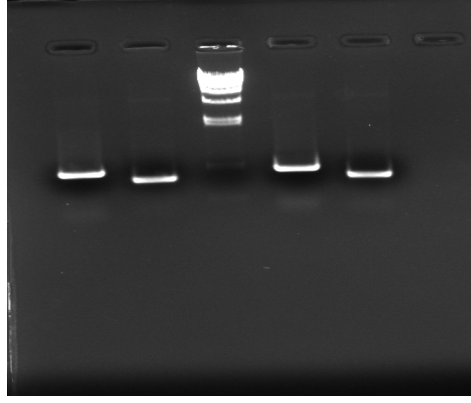
Şekil 21. GES-11'in sefotaksim bağlı Toho-1 E166A ile süperpozisyonu. GES-11: Yeşil, Toho-1 E166A: Mavi, Sefotaksim: Pembe



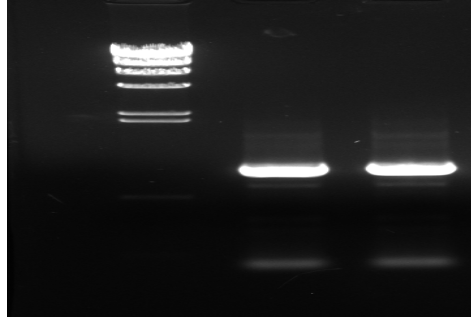
Şekil 22. M169'un hidrofobik etkileşimleri

3.14. pET-24a_OXA-66/W222L'de I129V ve P130Q Klinik Mutasyonlarının Elde Edilmesi

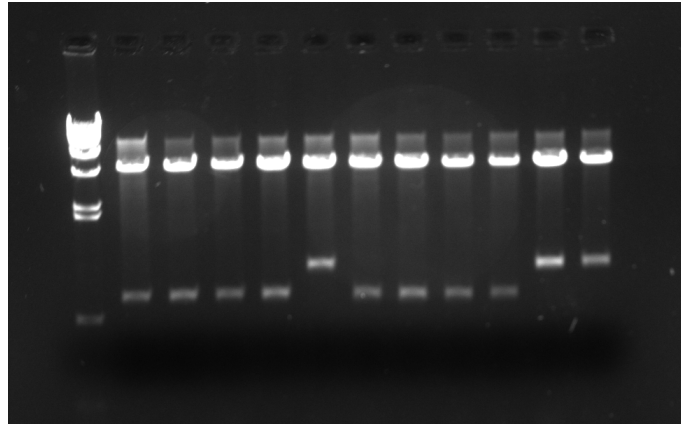
Birinci ve ikinci PZR basamaklarında elde edilen amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüleri Şekil 23 ve 24'te verildi. Şekil 25'te klonlama sonucu seçilen hücrelerden izole edilen plazmitlerle yapılan NdeI-XhoI kesim sonucunun agaroz jel görüntüsü verildi. Baz dizin analizi sonuçları değerlendirilerek (Altschul vd., 1990) pET-24a_OXA-66/W222L'de I129V ve P130Q mutasyonların yapıldığı belirlendi.



Şekil 23. Birinci PZR basamağında elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü



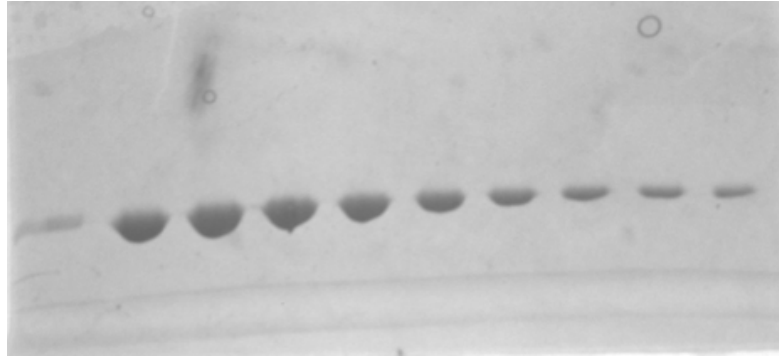
Şekil 24. İkinci PZR basamağında elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü



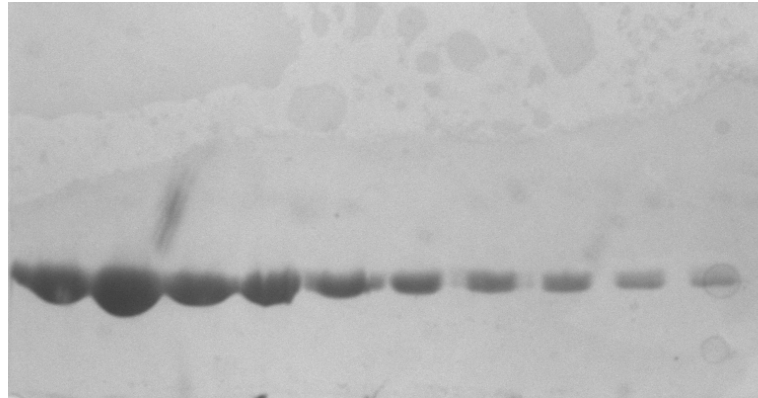
Şekil 25. Plazmitlerle yapılan NdeI-XhoI kesim sonucunun % 1'lik agaroz jel görüntüsü

3.15. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Saflaştırılması

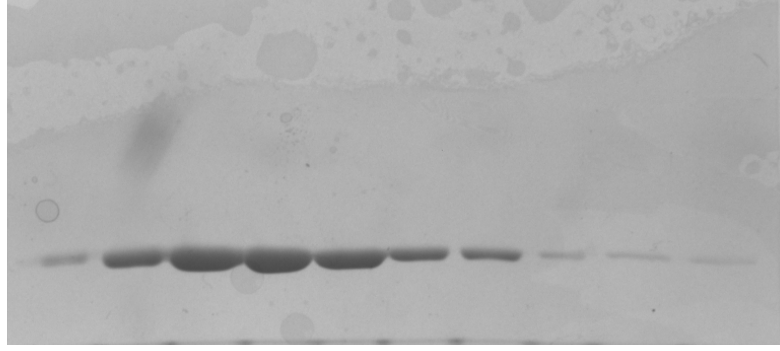
OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V içeren rekombinant vektörler *E. coli* BL21(DE3)pLysS hücrelerine transforme edilerek indüklemeye yapıldı. Ekspresyonun gözlendiği süpernatantlar kullanılarak İyon Değişim Kromatografisiyle saflaştırma yapıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüleri Şekil 26, 27 ve 28' deki gibidir.



Şekil 26. OXA-66/W222L saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 27. OXA-66/W222L/P130Q saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 28. OXA-66/W222L/I129V saflaştırılması sonucu elde edilen fraksiyonların % 8'lik SDS-PAGE görüntüsü

3.16. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

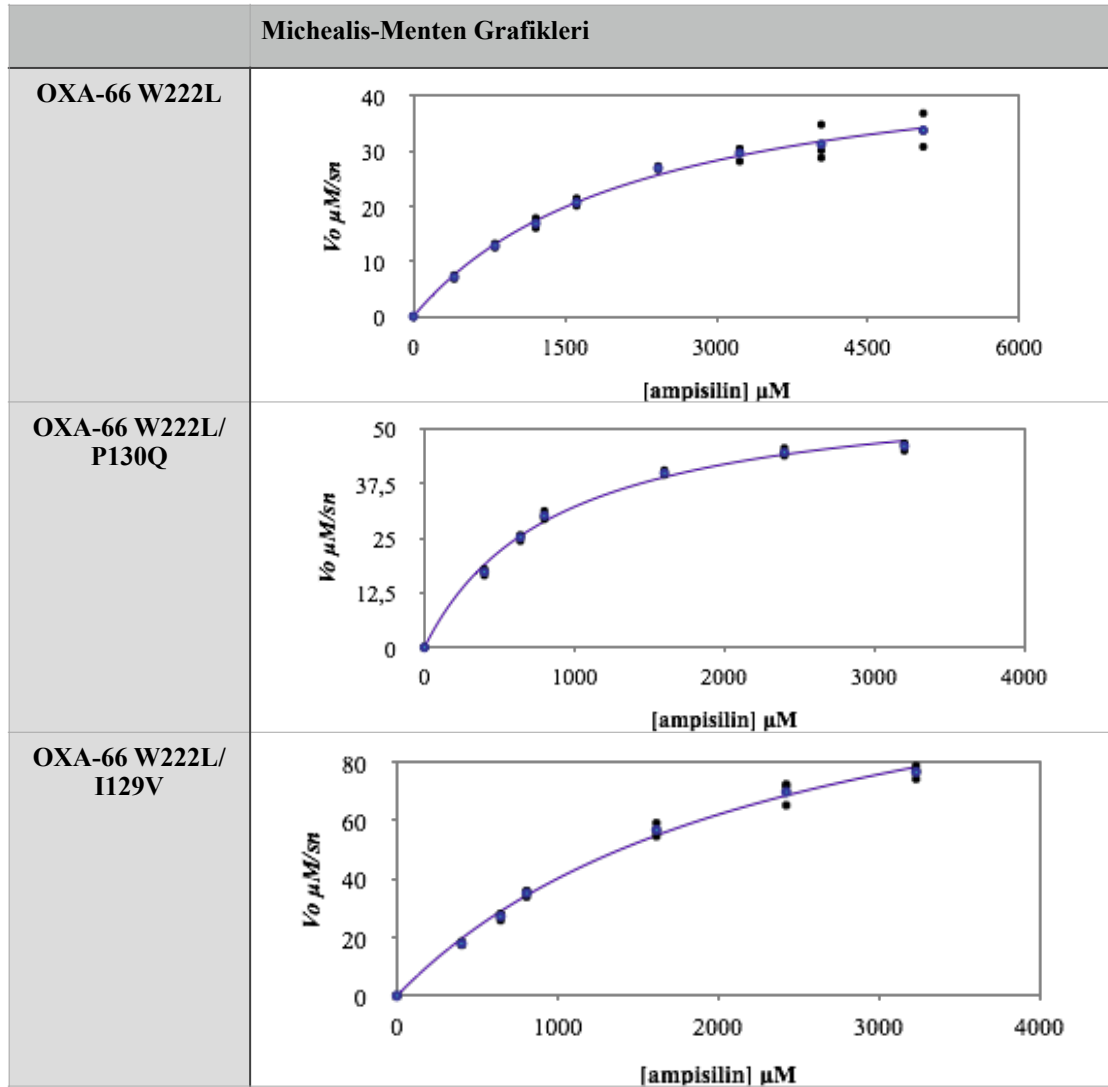
Konsantre edilen proteinlerin Guanidin HCl ile seyreltilerek 270 nm-400 nm arasında (Beckmann DU 800, USA) ölçülen absorbans değerleri, moleküler ağırlıkları, ekstinksiyon katsayıları ve dilüsyon faktörleri kullanılarak hesaplanan konsantrasyonlar Tablo 30'da verildi.

Tablo 30. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin konsantrasyonları

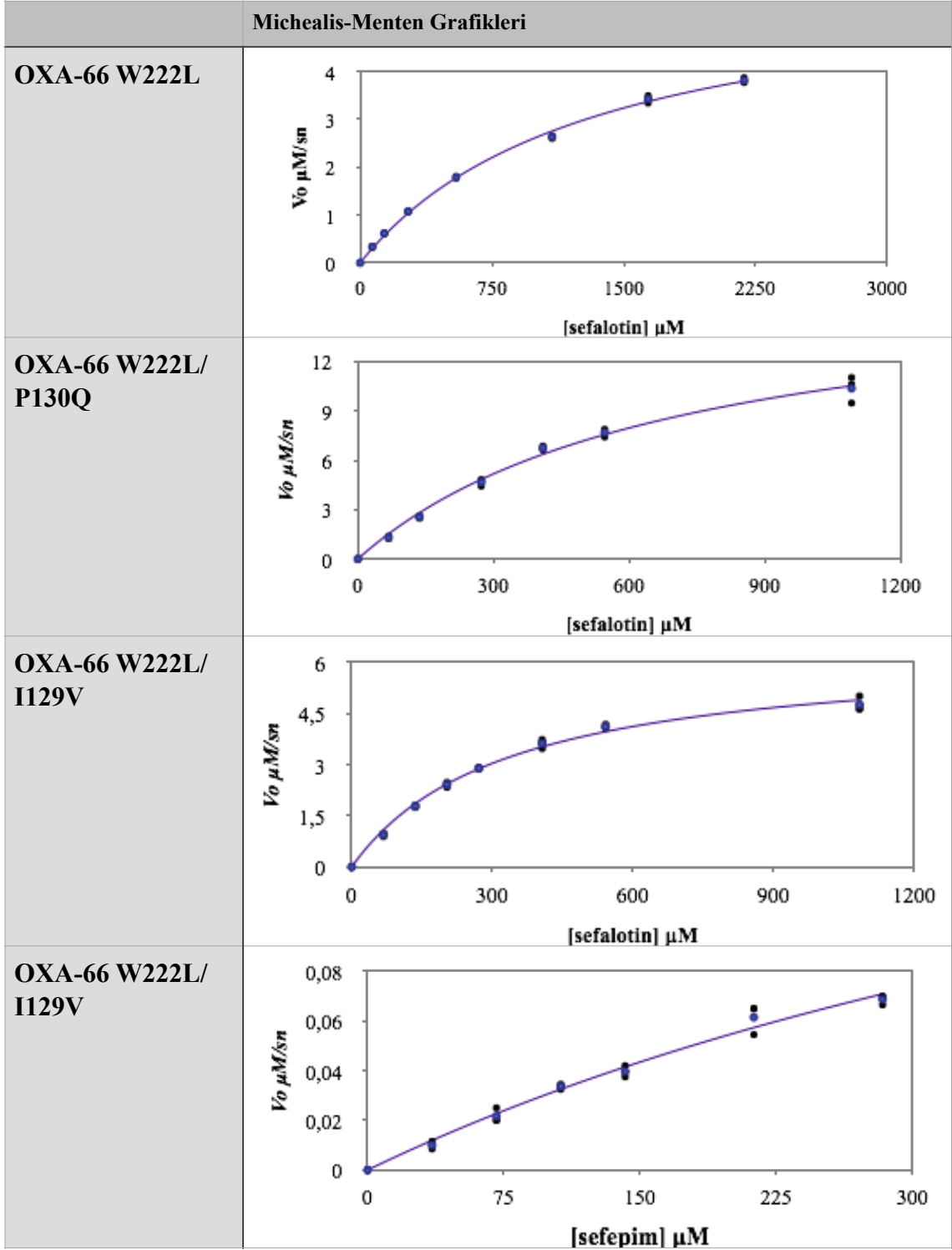
	OXA-66/W222L	OXA-66/W222L/ P130Q	OXA-66/W222L/ I129V
Moleküler ağırlık	27989	28020,1	27975
Ekstinksiyon katsayısı	43430	43430	43430
Dilüsyon Faktörü	15	15	15
Absorbans	0,6384	0,8448	0,6376
Konsantrasyon	220,492 μ M 6,171 mg/ml	291,77 μ M 8,17 mg/ml	220,216 μ M 6,16 mg/ml

3.17. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin β -laktamlar için Kinetik Parametreleri

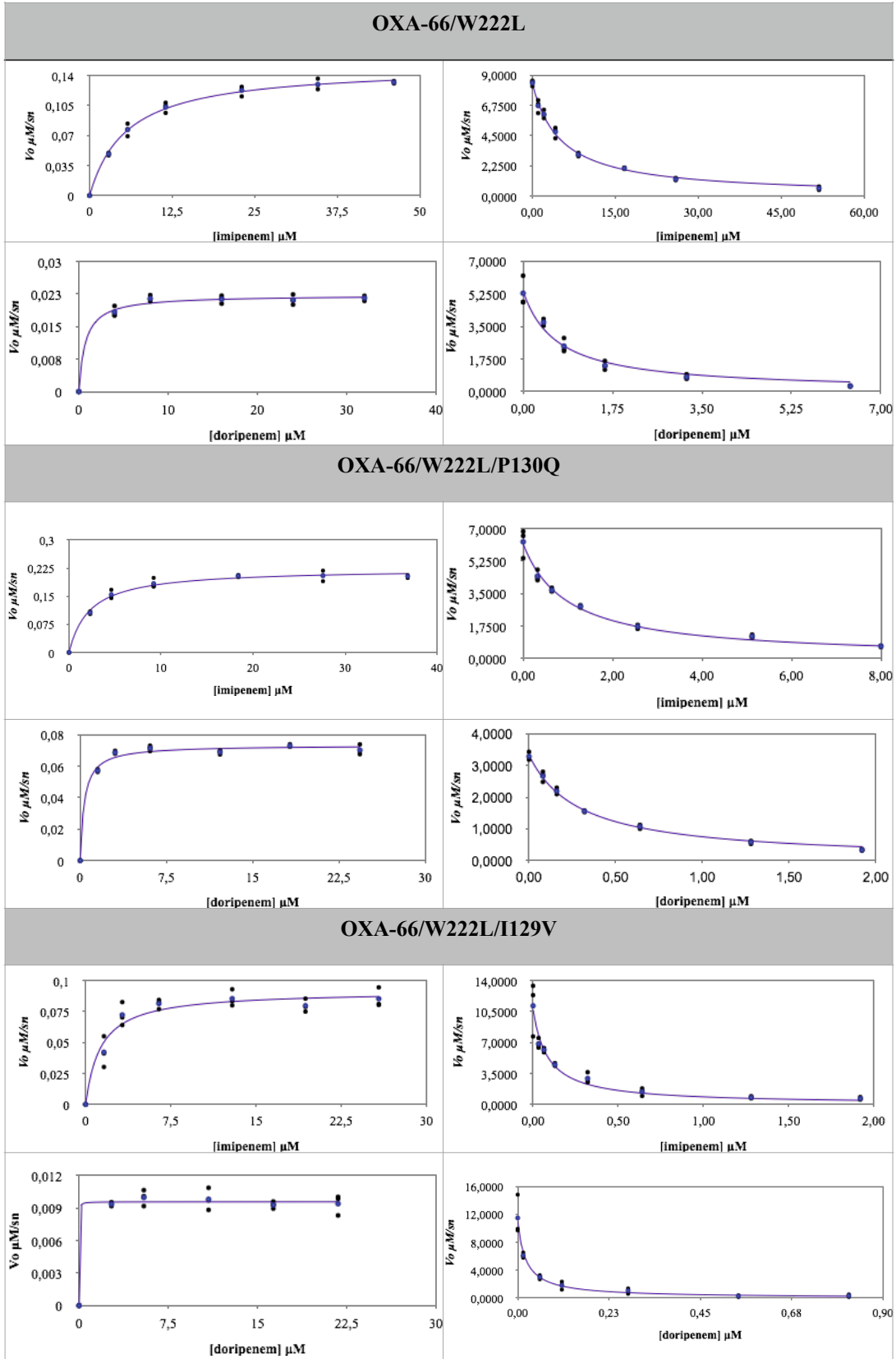
OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin ampisilin, sefalotin ve sefepim ile yapılan kinetik deneylerden elde edilen verilere göre Michealis-Menten grafikleri çizildi (Şekil 29). Şekil 30'da üç enzime ait imipenem ve doripenem yarışmalı inhibisyon deneylerinden elde edilen grafikler verildi. Grafiklerden elde edilen kinetik parametreler Tablo 31'de verildi.



Şekil 29. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Michealis-Menten Grafikleri (Ampisilin)



Şekil 29 (devam). OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin Michealis-Menten Grafikleri (Sefalotin, sefepim)



Şekil 30. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin imipenem ve doripenem ile kinetik deneylerinden elde edilen grafikler

OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve aztreonama karşı hidrolitik aktivitelerinin belirlenebilecek seviyenin altında olduğu tespit edildi (Tablo 31). OXA-66/W222L ve OXA-66/W222L/P130Q sefepime hidrolitik aktivite göstermezken OXA-66/W222L/I129V düşük bağlanma afinitesi ($>686 \mu\text{M}$) ve düşük dönüşüm sayısı ile sefepimi parçalayabildiği belirlendi. Aynı zamanda üç enzimin sefalotini farklı katalitik etkinliklerde parçaladığı tespit edildi (OXA-66/W222L için $0,00207 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, OXA-66/W222L/P130Q için $0,0105 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ve OXA-66/W222L/I129V için $0,11 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V için ampisiline karşı OXA-66'ya kıyasla düşük K_m değerleri gözlemlendi (OXA-66/W222L için $2234 \mu\text{M}$, OXA-66/W222L/P130Q için $869 \mu\text{M}$ ve OXA-66/W222L/I129V için $2402 \mu\text{M}$). OXA-66 W222L'de imipenem bağlanma afinitesinin ($K_m = 2,67 \mu\text{M}$) OXA-66'ya göre yaklaşık 10 katına, katalitik etkinlik oranının (k_{cat}/K_m) yaklaşık 3 katına çıktığı gözlemlendi. Aynı şekilde, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'de düşük K_m ile imipeneme karşı katalitik etkinlik oranlarında artış gözlemlendi. OXA-66/W222L/I129V'nin imipenemi OXA-66/W222L ve OXA-66/W222L/P130Q'ya göre yüksek katalitik etkinlik oranıyla ($k_{cat}=2,834 \text{s}^{-1}$) hidroliz ettiği belirlendi. Üç enziminde doripeneme bağlanma afinitelerinin imipeneme kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin doripenemi düşük K_m ile hidroliz ettiği ve bunun sonucunda da OXA-66'ya göre katalitik etkinlik oranlarının arttığı gözlemlendi.

Tablo 31. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin β -laktamlara karşı kinetik parametreleri

	K_m veya K_d (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
OXA-66^a			
Ampisilin	33650±5034	504,8±50,12	0,0150±0,0027
İmipenem	28,5±15 ^b	0,54±0,028	0,019±0,01
Doripenem	2,7±0,6 ^b	0,0516±0,00075	0,0191±0,00426
Sefotaksim	-	<0,02	-
Seftriakson	-	<0,02	-
Seftazidim	-	<0,02	-
Sefalotin	>500	>0,1955	-
Sefepim	-	<0,02	-
Aztreonam	-	<0,02	-
OXA-66 W222L			
Ampisilin	2234±159	372±12	0,167±0,0130
İmipenem	2,67±0,246 ^b	0,137±0,0019	0,0513±0,0048
Doripenem	0,3349±0,0537 ^b	0,0336±0,00077	0,1±0,0163
Sefotaksim	-	<0,02	-
Seftriakson	-	<0,02	-
Seftazidim	-	<0,02	-
Sefalotin	1336±110	2,77±0,113	0,00207±0,000191
Sefepim	-	<0,02	-
Aztreonam	-	<0,02	-

Tablo 31 (devam). OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin β -laktamlara karşı kinetik parametreleri

	K_m veya K_d (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
OXA-66 W222L P130Q			
Ampisilin	869 \pm 85	343 \pm 12	0,395 \pm 0,0410
İmipenem	0,54 \pm 0,066 ^b	0,255 \pm 0,0053	0,472 \pm 0,059
Doripenem	0,1592 \pm 0,0178 ^b	0,126 \pm 0,00264	0,792 \pm 0,09
Sefotaksim	-	<0,02	-
Seftriakson	-	<0,02	-
Seftazidim	-	<0,02	-
Sefalotin	704 \pm 85	7,4 \pm 0,482	0,0105 \pm 0,00144
Sefepim	-	<0,02	-
Aztreonam	-	<0,02	-
OXA-66 W222L I129V			
Ampisilin	2402 \pm 265	774 \pm 47	0,322 \pm 0,0406
İmipenem	0,0487 \pm 0,009 ^b	0,138 \pm 0,00731	2,834 \pm 0,545
Doripenem	0,0114 \pm 0,00126 ^b	0,0217 \pm 0,000501	1,904 \pm 0,363
Sefotaksim	-	<0,02	-
Seftriakson	-	<0,02	-
Seftazidim	-	<0,02	-
Sefalotin	332 \pm 29	36,23 \pm 1,36	0,11 \pm 0,0103
Sefepim	>686	>0,11	-
Aztreonam	-	<0,02	-

^a Yayınlanmamış veri (Leonard vd.)

^b K_d

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Acinetobacter baumannii bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olan önemli bir bakteriyel patojendir. Özellikle sağlık hizmeti verilen kurumlarda çoklu ilaç dirençli suşların salgınlarının artışıyla önemli infeksiyon ajanı olarak yeniden ortaya çıktı. Çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* beş antibiyotik grubundan (sefalosporinler, karbapenemler, ampisilin/sulbaktam, florokinolonlar, aminoglikozitler) ikisinden fazlasına direnç göstermesiyle tanımlanır (Peleg vd., 2008). Çalışmada kullanılan suşların birçoğunda, sadece kolistine duyarlılık ve diğer beş antibiyotik grubuna dirençlilik gözlemlendi. Bu özellikleri gösteren suşlar yaygın ilaç dirençli olarak adlandırılır (Magiorakos vd., 2012). Bakterinin kolistin ve tigesiklini de içeren tüm antibiyotiklere dirençli olduğu pan ilaç dirençli suşlar gözlemlenmedi. Seftazidim ve sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlerin, karbapenemlerin ve florokinolonların yaygın kullanımı çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter* türlerinin artışı ile ilişkilidir (Peleg vd., 2008). Uzun yıllar, karbapenemler *A. baumannii* infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir seçenek olarak düşünülmüştür. Fakat son yıllarda dünya genelinde karbapenem direnci yaygın hale gelmiştir (Jones vd., 2007).

Bu çalışmada incelenen 101 *A. baumannii* suşunda, karbapenemlere yüksek oranda direnç gözlemlendi (imipenem % 95 ve meropenem % 94). Karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları dünya genelinde rapor edilmiştir. Karbapenemazların, metallo β -laktamazların ve bazı oksasilinazların *A. baumannii*'de karbapenem direncine katkı sağladığı belirlenmiştir (Lolans vd., 2006). OXA-tip karbapenemazlar, özellikle OXA-23 salgınları *A. baumannii*'de yaygın olarak tespit edilmiştir (Peleg vd., 2008).

OXA-40 grubu Portekiz, İspanya, İran ve ABD'de rapor edilmiştir. OXA-51 benzeri enzimler (örneğin; OXA-64-66, OXA-68-71, OXA-78-80, OXA-82, OXA-86, OXA-92 ve OXA104-112) gibi doğal olarak bulunan OXA karbapenemazlar, *A. baumannii* izolatlarında dünya genelinde rapor edilmiştir. İtalya, Belçika, Fransa, Yunanistan, İran, ABD ve Arjantin'de OXA-58 türevlerini barındıran suşlar tespit edilmiştir (Nowak vd., 2012). Daha önceki çalışmalarda OXA-58 ve OXA-51 Türkiye'

de rapor edilmiştir (Peleg vd., 2008). Bu çalışmada ilk kez Türkiye’de OXA-40 barındıran klinik *A. baumannii* suşu rapor edildi. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm suşlarda *bla*_{OXA-51} benzeri genin bulunması suşların *A. baumannii* olarak tanımlanmasını destekledi (Turton vd., 2006b).

Suşların % 80’inde *bla*_{OXA-51} geninin yukarı bölgesinde *ISAbal* elementi tespit edildi ve bu kombinasyonun yüksek seviyede karbapenem direncine neden olduğu gösterilmiştir (Turton vd., 2006a). *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*bla*_{GES}, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-51}/*aac-6'-Ib*, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-6'-Ib*, *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-6'-Ib*/*bla*_{GES}, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-3-Ia*/*bla*_{GES}, *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*/*aac-3-Ia*, *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*/*bla*_{GES}, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-24}/*ISAbal*, *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}/*ISAbal*/*aac-3-Ia*, *bla*_{OXA-51}/*ISAbal*/*aac-6'-Ib* gen kombinasyonları sırasıyla 11, 13, 5, 2, 5, 5, 7, 36, 4, 6, 2, 1, 3, 1 suşta tespit edildi. Türkiye’de ilk kez tespit edilen OXA-40’ın (OXA-24) *bla*_{OXA-51} ve *ISAbal* ile birlikte bulunduğu belirlendi. *ISAbal*/*bla*_{OXA-51}, *ISAbal*/*bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23}, *ISAbal*/*bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-40} kombinasyonları daha önce yapılan çalışmalarda *A. baumannii* suşlarında tespit edilmiştir (Lolans vd., 2006).

A. baumannii’de karbapenem direnci çoğunlukla sınıf D β-laktamazlar (OXA-23 benzeri, OXA-40 benzeri ve OXA-58 benzeri) ve metallo β-laktamazlarla ilişkilidir. Son yıllarda Ambler sınıf A β-laktamazlar, GES ve KPC (karbapenemazlar) *A. baumannii*’de rapor edilmiştir. GES-tipi β-laktamazlar, karbapenemlere yüksek seviyede dirence neden olabilmektedir. *bla*_{GES} genleri Avrupa, Asya, Güney Amerika ve Güney Afrika’da rapor edilmiştir (Bogaerts vd., 2010). Bu çalışmada baz dizin analiz sonuçlarına göre iki tip *bla*_{GES} geni tespit edildi. 16 suşta *bla*_{GES-11}, 8 suşta *bla*_{GES-22} bulundu. GES-11 (AFU25739.1) daha önce Belçika’da bir Türk hastadan elde edilen izolatta tanımlanmıştır (Bogaerts vd., 2010). Bu çalışmada karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarında önemli sayıda bulunan GES-11’in Türkiye’de bulunması Belçika’da yapılan çalışmayı (Bogaerts vd., 2010) destekledi.

Çalışmada, *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{GES-11} birlikte aynı suşta tespit edildi. Kuveyt'te yapılan bir çalışmada da 33 izolatta *bla*_{OXA-23} and *bla*_{GES-11} birlikte bulunmuştur (Bonnin vd., 2013). GES ailesi enzimlerinin en önemli özelliği karbapenemazlara evrimleşebilme yetenekleridir (Delbrück vd., 2012). Analiz edilen suşlarda, GES ve OXA-tip enzimler yüksek karbapenem direncinden sorumludur. OXA-40 barındıran suş 88 yaşındaki yaşlı bir hastadan izole edilmiştir. Hastada acil bölümünde PEG etrafında kızarıklık ve akıntı tespit edilmiştir. Bu vakada, *A. baumannii* irinden izole edilmiştir. İzolatın sadece kolistin ve tigesikline duyarlı, meropenem ve tetrasikline orta duyarlı ve diğer tüm antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. Hasta yoğun bakımda tigesiklin ile tedavi edilmeye başlanmış ve 17 gün sonra ölmüştür.

REP-PZR'ın hemen hemen PFGE kadar ayırıcı gücü olduğu gösterilmiştir. REP-PZR'ın PFGE'ye göre daha kolay olması çok sayıda suşun çalışılmasını kolaylaştırmaktadır. REP-PZR, *A. baumannii* izolatlarının genomik çeşitliliğini belirlemek için yapıldı (Higgins vd., 2012). 12 genotip belirlendi. Çeşitli REP genotiplerinde, aynı antibiyotik duyarlılık profili ve direnç genleri bulundu. Bu sonuca göre, direnç determinantlarının yatay olarak transfer edildiği düşünüldü.

İlaç direncinin artışı ve polimiksinlerin diğer antibiyotiklerle kullanımının güvenilirliğini, *Acinetobacter* cinsi üyelerinin neden olduğu infeksiyonların tedavi seçeneklerini sınırlandırmıştır. Kolistin imipenem dirençli Gram negatif basillerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Diğer bir seçenek olan tigesiklinde *A. baumannii*'ye karşı aktivitesi kanıtlanmıştır (Lolans vd., 2006). Başka bir çalışmada kolistin ve tigesiklinin karbapenem dirençli *A. baumannii* tedavisinde etkili alternatif antimikrobiyal ajanlar oldukları tespit edilmiştir (Somily vd., 2012). Kuveyt'te *A. baumannii*'de GES tipi GSBL'lerin bulunması (Bonnin vd., 2013) Orta Doğu Bölgesi'nin karbapenemaz üreten *A. baumannii* için rezervuar olabileceğini düşündürdü. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre Türkiye'nin GES-tipi β -laktamaz üreten *A. baumannii*'ler için rezervuar olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca Türkiye'de elde edilen karbapenem dirençli *A. baumannii*'lerde OXA tipi karbapenemazların IS*Abal* ve GES-tipi β -laktamazlarla veya tek başlarına yaygın olarak bulunduğu tespit edildi.

Konjugasyon deneyi ile *Escherichia coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) alıcı hücrelerine GES-11 ve GES-22 genlerinin aktarılamadığı tespit edildi. Bununla birlikte, daha önce yapılan bir çalışmada elektroporasyonla (*E. coli* TOP10, *A. baumannii* CIP7010 ve N9040364 alıcı hücrelerine) GES-11 ve GES-12 barındıran transformantlar elde edilmiştir ve genlerin plazmit üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Bogaerts vd., 2010). Yapılan bir çalışmada da GES-22'nin 75 kilobazlık plazmit üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Castanheira vd., 2014).

pET100/D-TOPO_GES-11 ve pET100/D-TOPO_GES-22 vektörlerini içeren (*One Shot® TOP10*) hücrelerin ampisilin/sulbaktam, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefoperazon/sulbaktam, sefepim, imipenem ve meropenem için MİK değerleri arasında GES-22'nin piperasilin/tazobaktam için MİK değerinin 16 katına çıktığı (64) gözlemlendi. Ampisilin/sulbaktam (≥ 32) ve piperasilin (≥ 128) MİK değerlerinin sadece GES-tipi β -laktamaz içeren hücre ile klinik suşlarda aynı olduğu gözlemlendi.

Alanin, küçük amino asitlerden biridir (Betts ve Russell, 2003) ve amino asitlerin küçük bir amino asitle yer değişimi protein yapısında değişikliklere yol açabilir. Çalışmada, Ambler 169., 276., 30., 220., 179., 251., 290. ve 216. pozisyonlarındaki sırasıyla lösin, aspartik asit, lizin, treonin, aspartik asit, lizin, izolösin ve treonin yönlendirilmiş mutagenezle alanine dönüştürüldü. GES-22'de yukarıda verilen pozisyonlardaki amino asitlerin alanine dönüştürülmesinin bazı antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyon üzerine etkisi incelendi. Daha önce yapılan çalışmalarda 276., 30., 220., 251., 290. ve 216. pozisyonlardaki amino asitlerin sınıf A β -laktamazlarda substrat bağlanmasında ve hidrolizinde önemli oldukları belirlenmiştir (Drawz vd., 2009; Clouthier vd., 2012; Marciano vd., 2009; Salverda vd., 2010; Sabbagh vd., 1998). Ayrıca, 169. ve 179. pozisyonlardaki amino asitler GES-tipi β -laktamazların omega halkasında bulunur (Wachino vd., 2004). E-test sonuçlarına göre, piperasilin/tazobaktam ve tikarsilin/klavulanik asite karşı bazı mutantların mik değerlerinde % 62,5-% 97,6 azalma gözlemlendi. TEM ve SHV β -laktamazların birçoğu 179. pozisyonlarında aspartik asit bulundurulur. GES tipi beta laktamazlarda da 179.

pozisyonda aspartik asit bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, SHV-1 Asp179Asn mutasyonunun β -laktam/ β -laktamaz inhibitörüne karşı MİK değerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Hujer vd., 2001). Benzer şekilde, GES-22 Asp179Ala mutantında piperasilin/tazobaktam MİK değerinde GES-22'ye göre % 87,5 ve tikarsilin/klavulanik asit MİK değerinde ise % 62,5 azalma belirlendi. GES-tipi β -laktamazların 251. pozisyonlarında lizin varken 290. pozisyonlarında izolösin bulunur. GES-22'de Lys251Ala ve Ile290Ala mutasyonları piperasilin/tazobaktam MİK değerinde GES-22'ye göre sırasıyla % 93,75 ve % 97,6 azalmaya neden oldu. 251. ve 290. amino asitlerin α/β domainin yapısal çekirdeklerinde buldukları ve bu amino asitlerdeki değişimlerin β -laktamaz kimeralarının kinetikleri üzerine etkileri olduğu belirlenmiştir (Clouthier vd., 2012). β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonu, piperasilin/tazobaktam Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisi vardır (Dilay vd., 2007). Yapılan bir çalışmada GSBL üreten *Escherichia coli* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde piperasilin/tazobaktamın karbapenemlere benzer bir seçenek olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Ofer-Friedman vd., 2015). Bu çalışmada, GSBL tipi bir β -laktamazda bazı noktalarda yapılan alanin mutasyonlarıyla tedavi seçeneklerinden biri olan piperasilin/tazobaktama karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunun değişebileceği gösterildi.

Bu çalışmada, GES-22 ve GES-11 kinetik olarak karakterize edilerek, M169L klinik mutasyonunun GES-tipi β -laktamazların hidrolitik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. 169. pozisyonda lösin bulunmasının, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam için aktivitede artışa neden olurken seftazidime karşı aktivitenin azalışına neden olduğu tespit edildi. Klinik mutasyonun, penisilinlere aynı zamanda klavulanik asite karşı hidrolitik aktivitede az oranda artışa neden olduğu belirlendi. Bu sonuçlar dağınık gözüksede diğer sınıf A β -laktamazların homolog pozisyonlarıyla yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. CTX-M-27'de (CTX-M-93'te glutamin) bu pozisyonda lösin varlığı, sefotaksim, aztreonam ve çeşitli penisilinlere karşı yüksek aktivite ve seftazidime karşı düşük aktivite ile ilişkilendirilmiştir (Djamdjian vd., 2011). 169. pozisyonunda lösin bulduran diğer bir β -laktamaz SHV-1, SHV-57 (169. pozisyonda arjinin) ile karşılaştırıldığında seftazidime karşı düşük aktivite fakat

sefotaksim ve penisilinlere karşı yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Ma vd., 2005). TLA-2'de C169L substitüsyonu sefalosporinler ve penisilinlere karşı aktivite de artışa neden olmuştur (Naas vd., 2013). 168. ve 169. pozisyonda iki delesyon bulunduran OXY-2-2'de, OXY-2-15 ile kıyaslandığında seftazidim direnci düşerken penisilin ve aztreonama direncin arttığı gözlenmiştir (Nijhuis vd., 2015). SHV-1 ve TLA-2'de lösün bulunması klavulanik asit duyarlılığını arttırdığı tespit edilmiştir. GES-11 ve GES-22 kinetik karakterizasyonundan elde edilen sonuçlar ve yukarıda belirtilen çalışmalara göre, omega halkasındaki amino asitlerin sınıf A β -laktamazlarda sefalosporinlerin hidrolizinde rol oynadıkları söylenebilir. Bunun yanı sıra bu amino asitlerin penisilinler, klavulanik asit ve sulbaktama karşı aktiviteleri düzenlemektedir.

M169'un GES-11 yapısında lokasyonu dolayısıyla sefalosporin bağlanması ve dönüşümünü etkilemesi süpriz değildir. Omega halkanın parçası olan M169'un, sınıf A, C ve D β -laktamazların substrat seçiminde etkili olduğu bilinmektedir (Mitchell vd., 2015). PyMOL programı kullanılarak sefotaksim bağlanmış Toho-1 E166A, GES-11 ile karşılaştırıldığında, sefotaksimin büyük thiazolidin halkasının P167'nin β -karbon (3.3 Å) ve karbonil oksijeni (3.0 Å) ile çok yakın etkileşim içinde olması beklenir (Şekil 21) (Shimamura vd., 2002). M169, hidrofobik çekirdeğin merkezinde bulunur ve F72, M68 yan zincirleri, E166'nın γ -karbonu ve D176'nın β -karbonuyla van der waals etkileşimi içindedir (Şekil 22). PyMOL ile GES-11'de M169 lösine çevrildiğinde γ -dallanmış yan zincir herhangi bir sterik engellemeye neden olmadı. F72, E166, M68 ve D176 ile etkileşim içinde olan M169'un terminal metil grubunun kaybı omega halkasının yeniden düzenlenmesine neden olabilir. Omega halkasının yeniden düzenlenmesi sefotaksim veya diğer büyük sefalosporinlerin thiazolidin halkası ile etkileşimleri değiştirebilir.

İmipenem bağlı GES-1 kristal yapısıyla (PDB: 4GOG), inhibitörün hidroksietil kısmının G170'in α -karbonu (4.3 Å) ve nitrojeni (4.7 Å) ile çok yakın etkileşim yaptığı gösterilmiştir (Smith vd., 2012; Docquier vd., 2009). Birden fazla β -laktamaz grubunda karbapenem hidroksietil kısmının ilaçların deaçilasyonu için gerekli su molekülünün aktivasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle, 170. pozisyondaki değişimlerin

karbapenemlere karşı hidrolitik aktiviteyi etkilemesi süpriz değildir (Poirel vd., 2001; Delbrück vd., 2012; Bebrone vd., 2013). G170'e çok yakın olan M169L birçok β -laktamın bağlanması ve hidrolizinde artışa neden olurken karbapenemlere etkisinin olmaması şaşırtıcıdır. Bunun nedeni karbapenemlere karşı fonksiyon kazanımının diğer substratlardan farklı bir mekanizmayla gerçekleşmesi olabilir.

Acinetobacter baumannii'de karbapenem direncine neden olan en önemli mekanizma karbapenem hidroliz eden β -laktamazlardır. Bunlar arasında baskın olan sınıf D β -laktamazlardır. Sınıf D β -laktamazlardan bazıları karbapenem hidrolizleyemez. Karbapenem hidrolizleyemeyen β -laktamazlar *A. baumannii*'de ifade edildiklerinde klinik olarak önemli derecede karbapenem direncine neden olmaktadır. Karbapenem hidrolizleyen OXA tipi β -laktamazlar, OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58, OXA-143 ve OXA-235'tir. Bunlardan sadece OXA-51 kromozomal kökenlidir (Smith vd., 2015). OXA-23 ve OXA-24'ün katalitik etkinlikleri önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Kaitany vd., 2013). OXA-51 aktif bölgesinde Ser80, Lys83, Ser127, Trp166, Lys217, Arg260 amino asitleri bulunmaktadır. Substrat özgülüğü ve reaksiyon mekanizmasında görevli diğer residüeller; Phe111, Trp114, Ile129, Leu167, Ser218 ve Trp220'dir. Phe111 β 8 C-terminalinde hidrofobik köprü oluşturur ve bu köprü karbapenemin oryantasyonunu etkileyerek deaçilasyon için daha duyarlı olmasını sağlar. OXA-23 ve OXA-24'te bu hidrofobik köprü bulunurken OXA-58 kristal yapısında Phe114 ile Met225 arasında köprünün bulunmadığı gözlenmiştir. OXA-51 ve neredeyse bilinen bütün OXA-51 benzeri varyantlarında 222. pozisyonda metiyoninin yerine triptofan bulunmaktadır. OXA-51'de Trp222 aktif bölgenin açıklığına doğru uzanır ve bu konformasyon Leu110, Phe111, Trp114 ile hidrofobik etkileşim yapar. Aynı zamanda Trp222'nin indol halkası her zaman meropenem ve doripenemin C1 metil grubuyla üst üste gelir. Ayrıca Ile129 ve Leu167 karbapenemin hidroksietil grubuyla çakışır. Fakat bu çakışmalar lösün ve izolösünün küçük rotasyonlar yapmasıyla ortadan kalkabilir.

Bu doktora tez çalışmasında, zayıf karbapenemaz olan OXA-51 benzeri OXA-66'da klinik mutasyonların katalitik aktivite üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Böylece çalışma kapsamında hem sınıf A hem de sınıf D β -laktamazlarda meydana gelen klinik mutasyonların sefalosporinaz ve karbapenemaz aktiviteleri üzerine etkileri belirlendi. OXA-66/W222L üzerinde P130Q ve I129V mutasyonları yapıldı, OXA-66 varyantları klonlandı, ifade edildi, saflaştırıldı ve kinetik olarak karakterize edildi. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve aztreonamı hidroliz edemediği belirlendi. OXA-66/W222L/I129V düşük bağlanma afinitesi ($>686 \mu\text{M}$) ile sefepimi parçalayabildiği belirlendi. Aynı zamanda üç enziminde sefalotin için farklı katalitik etkinlik oranlarına sahip olduğu tespit edildi. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin OXA-66 karşılaştırıldığında ampisiline karşı bağlanma afinitelerinin yüksek olduğu belirlendi. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'de düşük K_m ile imipenem ve doripenem karşı katalitik etkinlik oranlarında artış gözlemlendi. Üç enziminde doripenem bağlanma afinitelerinin imipenem göre daha yüksek olduğu belirlendi. Trp222, Ile129 ve Pro130 residülerinde meydana gelebilecek mutasyonlarla OXA-66'nın önemli seviyelerde karbapenem direncine katkı sağlayabileceği gösterildi. Sınıf A β -laktamazda meydana gelen klinik mutasyonun (M169L) sefalosporinaz aktivitesini arttırırken sınıf D β -laktamazda meydana gelen klinik mutasyonların (W222L, I129V, P130Q) karbapenemaz aktivitesini arttırdığı belirlendi.

Tedavide kullanılan sefalosporinler ve aztreonama karşı hidrolitik aktivitede kazanca *A. baumannii*'de varolan $bla_{\text{GES-22}}$ geninin neden olduğunu tespit edildi. Benzer kazançlara *A. baumannii*'de sınıf C ve D β -laktamazların neden olduğu da tespit edilmiştir (Kaitany vd., 2013; Poirel vd., 2011). Bunun muhtemel bir açıklaması, bu ilaçların, *A. baumannii* enfekte olmuş hastaların tedavisi için kullanılmasıdır. Diğer bir olasılık, *A. baumannii* infeksiyonlarının, profilaktik tedavinin seyri sırasında, bu antibiyotiklere maruz kalma sonucu ortaya çıkmasıdır. Her iki durumda da, *A. baumannii* suşları, başlangıçta bu ilaçların bazılarını duyarlıdır ve antibiyotik stresine maruz kaldıklarında ilaçlara karşı aktif olan enzimler geliştirirler.

Bu doktora tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre, *A. baumannii* suşlarının tümünün kolistine duyarlı, birçoğunun ise çoklu ilaç dirençli olduğu gözlemlendi.
2. 101 *Acinetobacter baumannii* suşunda PZR yöntemiyle *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{GES}*, *aac-3-Ia*, *aac-6'-Ib* ve *ISAbal* genleri tespit edildi. *bla_{OXA-58}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{VEB}*, *bla_{PER-2}* ve *bla_{NDM-1}* genleri için yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarıyla tüm suşların bu genleri taşımadığı gösterildi.
3. *A. baumannii* suşlarında *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-40}*, *bla_{GES}*, *aac-3-Ia*, *aac-6'-Ib* farklı kombinasyonları tespit edildi. *bla_{GES}_pGEMT* vektörlerinin baz dizin analizi sonucuna göre GES-22 ve GES-11-tipi β -laktamaz tespit edildi. Türkiye kökenli *A. baumannii* klinik suşunda OXA-40 ilk kez bu çalışmada rapor edildi.
4. Aynı gen kombinasyonlarının farklı REP genotiplerinde bulunması genlerin suşlar arasında yatay gen transferiyle geçtiğini gösterdi.
5. Konjugasyon deneyleri ile GES-22 ve GES-11'i kodlayan genleri *Escherichia coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) alıcı hücrelerine aktarılamadı.
6. 179., 251., 290. ve 216. pozisyonlardaki alanin mutasyonlarının β -laktam/ β -laktamaz inhibitörleri ve sefaklor için MİK değerlerinde değişimlere yol açtığı belirlendi.
7. GES-22 ve GES-11 ifade edildi, saflaştırıldı ve kinetik olarak karakterize edildi. Bu çalışma ile GES-22 ilk kez kinetik olarak karakterize edilmiş oldu. GES-11 ile karşılaştırıldığında GES-22'nin penisilinleri, sefotaksimi, seftriaksonu ve aztreonamı daha yüksek katalitik etkinlikle hidroliz ettiği, seftazidime karşı katalitik etkinliğinin azaldığı gösterildi. Bunun yanı sıra, GES-22'nin GES-11'e göre klavulanik asit katalitik etkinlik oranının yüksek olduğu belirlendi.
8. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V kinetik karakterizasyonu, üç enziminde sefalotin dışındaki test edilen sefalosporinleri (sefepim hariç) ve aztreonamı hidroliz edemediği belirlendi. OXA-66/W222L/I129V'nin sefepimi az oranda hidroliz ettiği gözlemlendi. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/I129V ve OXA-66/W222L/P130Q'nun OXA-66'ya göre imipenem, doripenem ve ampisilin katalitik etkinlik oranlarının daha yüksek olduğu belirlendi.

5. ÖNERİLER

Çevresel seçici baskıya uyum sağlayarak antibiyotiklere dirençli *A. baumannii* suşları dünya çapında hızlı bir şekilde yayılmaktadır. *A. baumannii*'de β -laktam direncinin oluşmasında en yaygın mekanizma β -laktamazlarla enzimatik yıkımdır. AmpC, GSBL'ler (VEB-1, PER-1, PER-2, GES, TEM-92, TEM-116, SHV-12, CTX-M-2 ve CTX-M-43), sınıf D β -laktamazlar (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51) *A. baumannii*'de tanımlanmıştır. *A. baumannii*'de sınıf D β -laktamazlar kadar sık tanımlanmalarına rağmen katalitik etkinlikleriyle metallo β -laktamazlar karbapenem direncine katkı sağlarlar. GES tipi β -laktamazlar sefalosporinaz özelliklerinin yanı sıra bazı amino asitlerde meydana gelen değişimler sonucu karbapenemaz özelliği kazanırlar. Bu çalışmada, GES-11 ve GES-22 karakterize edildi ve ikisinde karbapenemaz özelliği göstermediği belirlendi. Omega halkasının parçası olan L169'un GES-22'de GES-11'e göre aztreonam, sefotaksim ve seftriakson hidrolizlerinin katalitik etkinlik oranını arttırdığı gözlemlendi. Bu duruma M169'un terminal metil grubunun kaybı ile omega halkasının yeniden düzenlenmesinin neden olabileceği PyMOL ile gösterildi. Kristal yapı çalışılarak kinetik veriler ve PyMOL sonucu desteklenebilir. OXA-51 grubu OXA-66'da klinik mutasyonların (W222L, I129V, P130Q) karbapenemaz aktivitesini arttırdığı tespit edildi. OXA-66/W222L, OXA-66/W222L/P130Q ve OXA-66/W222L/I129V'nin imipenem ve doripenemle kristal yapılarının çalışılması, substrat geliştirilmesinde önemli amino asitlerin belirlenmesine katkı sağlayabilir. 179. 251. ve 290. pozisyonlardaki residülerin değişiminin piperasilin/tazobaktam ve tikarsilin/klavulanik asit MİK üzerine etkisi olduğu belirlendi. Bu pozisyonlarda farklı mutasyonlar yapılarak MİK üzerine etkileri çalışılıp elde edilen verilerle karşılaştırılabilir. Ayrıca sınıf A ve D beta laktamazlarda çalışılan klinik mutasyonların proteinlerin sekonder yapısı ve erime sıcaklıkları üzerine etkisi CD spektrometresi kullanılarak belirlenebilir.

KAYNAKLAR

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Antunes, N.T. and Fisher, J.F., 2014.** Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics*, 3, 398-434.
- Atasoy, A.R., Karakeçe, E., Terzi, H.A., Çiftci, İ.H., 2014.** Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç. *Cerrahi Sanatlar Dergisi*, 7, 7-10.
- Bae, I.K., Lee, Y., Jeong, S.H., Hong, S.G., Lee, J.H., Lee, S.H., Kim, H.J., Youn, H., 2007.** Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58, 465-468.
- Bebrone, C., Bogaerts, P., Delbrück, H., Bennink, S., Kupper, M.B., Castro, R.R., Glupczynski, Y., Hoffmann, K.M., 2013.** GES-18, a New Carbapenem-Hydrolyzing GES-type β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* That Contains Ile80 and Ser170 Residues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 396-401.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002.** *Biochemistry*. W H Freeman, 5th Edition. ISBN-10: 0-7167-3051-0, Section 8.4, 1100 s.
- Betts, M.J. and Russell, R.B., 2003.** Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions *Bioinformatics for Geneticists*. John Wiley & Sons, Ltd., 291-316.
- Bingöl, G., 1977.** Vitaminler ve Enzimler. Ankara üniversitesi, Eczacılık Fakültesi yayınları, Ders Kitabı No:46, 56-60.
- Bogaerts, P., Naas, T., Garch, F.E., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., Huang, T., Lissoir, B., Nordmann, P. and Glupczynski, Y., 2010.** GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 4872-4878.
- Bonnin, R.A., Rotimi, V.O., Al Hubail, M., Gasiorowski, E., Al Sweih, N., Nordmann, P., Poirel, L., 2013.** Wide dissemination of GES-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Kuwait. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 183-188.

- Bradford, P.A., 2001.** Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 933-951.
- Bycroft, B.W., Shute, R.E., 1985.** The molecular basis for the mode of action of Beta-lactam antibiotics and mechanisms of resistance. *Pharmaceutical Research*, 2, 3-14.
- Castanheira, M., Costello, S.E., Woosley, L.N., Deshpande, L.M., Davies, T.A., Jones, R.N., 2014.** Evaluation of clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and *Enterobacteriaceae* isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -lactamases, GES-22 and VIM-35. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 7358-7366.
- Celenza, G., Pellegrini, C., Caccamo, M., Segatore, B., Amicosante, G., Perilli, M., 2006.** Spread of *bla*_{CTX-M-type} and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 975-978.
- Chang, K., Kuo, H., Tang, C.Y., Chang, C., Lu, C., Liu, C., Lin, H., Chen, K. and Liou, M., 2014.** Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BioMed Central Genomics*, 15, 1-13.
- Cheng, Y., and Prusoff, W.H., 1973.** Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22, 3099-3108.
- Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y., Sandalli, C., 2014.** OXA and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clinical Microbiology Infection*, 20, 410-415.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S23 CLSI, Wayne, PA, 184 s.
- Clouthier, C.M., Morin, S., Gobeil, S.M.C., Doucet, N., Blanchet J., Nguyen, E., Gagné, S.M., Pelletie, J.N., 2012.** Chimeric β -lactamases global conservation of parental function and fasttime-scale dynamics with increased slow motions. *PLoS ONE*, 7, 1-15.
- Dağı, H.T., Arslan, U., Tuncer, İ., 2011.** Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 25, 22-26.

- Dai, N., Li, D.Z., Chen, J.C., Chen, Y.S., Geng, R., Hu, Y.H., Yang, J.P., DU, J., Hu, C.P., Zhang, W., Li, J.S., Yu, Q., Wan, H.Y., Mu, L., Zhong, X.N., Wei, L.P., Ma, J.J., Wang, Q.Y., Hu, K., Tian, G.Z., Cai, S.X., Wang, R.Q., He, B., Wang, S.Q., Wang, Z.W., Zhao, S.R., Gao, Z.C., 2010.** Drug-resistant genes carried by *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with lower respiratory tract infection. Chinese Medical Journal, 123, 2571-2575.
- Dal, T., Dal, M.S., Ağır, İ., 2012.** *Acinetobacter baumannii*'de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi. Van Tıp Dergisi, 19, 137-148.
- Delbrück, H., Bogaerts, P., Kupper, M.B., Castro, R.R., Bennink, S., Glupczynski, Y., Galleni, M., Hoffmann, K.M., Bebrone, C., 2012.** Kinetic and Crystallographic Studies of Extended-Spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56, 5618-5625.
- Dede, B., Kadanalı, A., Karagöz, G., Çomoğlu, Ş., Bektaşoğlu, M.F., Yücel, F.M., 2013.** Yoğun Bakım Ünitesinde İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarının Antibiyotik Dirençlerinin Araştırılması. Bakırköy Tıp Dergisi, 9, 20-23.
- Dilay, L., Karlowsky, J.A., Walkty, A., Rubinstein, E., Zhanel, G.G., 2007.** Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. Expert Review Anti-Infective Therapy, 5, 365-83.
- Djamdjian, L., Naas, T., Tandé, D., Cuzon, G., Hanrotel-Saliou, C., Nordmann, P., 2011.** CTX-M-93, a CTX-M variant lacking penicillin hydrolytic activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 1861-1866.
- Docquier, J.D., Calderone, V., De Luca, F., Benvenuto, M., Giuliani, F., Bellucci, L., 2009.** Crystal structure of the OXA-48 β -lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. Chemistry & Biology, 16, 540-547.
- Drawz, S.M. and Bonomo, R.A., 2010.** Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. Clinical Microbiology Reviews, 23, 60-201.
- Drawz, S.M., Bethel, C.R., Hujer, K.M., Hurless, K.N., Distler, A.M., Caselli, E., Prati, F., 2009.** The role of a second-shell residue in modifying substrate and inhibitor interactions in the SHV beta-lactamase: a study of ambler position Asn276. Biochemistry, 48, 4557-4566.
- Evans, B.A. and Amyes, S.G.B., 2014.** OXA β -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 27, 241-263.

- Gür, D., Gülay, Z., Akan, Ö.A., Aktaş, Z., Kayacan, Ç.B., Çakıcı, Ö., Eraç, B., Gültekin, M., Ögünç, D., Söyletir, G., Ünal, N., Uysal, S., 2008.** Türkiye’de Hastane İzolatı Gram-Negatif Bakterilerde Yeni Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Ve GSBL Tipleri: Çok Merkezli HİTİT Sürveyansının Sonuçları. Mikrobiyoloji Bülteni, 42, 537-544.
- Gonzalez, F., Culebras, E., Head, J., Gomez, M., Morales, G., Picazo, J., 2010.** Outbreak of (OXA-66 carbapenemase) multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Spanish tertiary-care hospital: Epidemiology and study of patient movements. 14th International Congress on Infectious Diseases (ICID) Abstracts, USA, March 9-12 2010USA. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.1582>.
- Higgins, P.G., Janßen, K., Fresen, M.M., Wisplinghoff, H., Seifert, H., 2012.** Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using REP-PCR and multilocus sequence typing. Journal of Clinical Microbiology, 50, 3493-3500.
- Hu, W.S., Yao, S., Fung, C., Hsieh, Y., Liu, C., Lin, J., 2007.** An OXA-66/OXA-51-Like Carbapenemase and Possibly an Efflux Pump Are Associated with Resistance to Imipenem in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 3844-3852.
- Hujer, A.M., Hujer, K.M., Bonomo, R.A., 2001.** Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 beta-lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance. Biochimica et Biophysica Acta, 5, 37-50.
- Jeon, B.C., Jeong, S.H., Bae, I.K., Kwon, S.B., Lee, K., Young, D., Lee, J.H., Song, J.S., Lee, S.H., 2005.** Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -Lactamase in Korea. Journal of Clinical Microbiology, 43, 2241-2245.
- Jones, R.N., Ferraro, M.J., Reler, L.B., Schreckenberger, P.C., Swenson, J.M., Sader, H.S., 2007.** Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. Journal of Clinical Microbiology, 45, 227-230.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu Ö., 2011.** Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27, 62-74.
- Kaitany, K.C., Klinger, N.V., June, C.M., Ramey, M.E., Bonomo, R.A., Powers, R.A., Leonard, D.A., 2013.** Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57, 4848-4855.

- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010.** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 423-435.
- Korkmaz, P., Çağlan, F.Ç., Aykın, N., Alpay, Y., Güldüren, H.M., Bilgili, H., Koygun, A., 2015.** *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 1-4.
- Kotsakis, S.D., Papagiannitsis, C.C., Tzelepi, E., Legakis, N.J., Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., 2010.** GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 1331-1333.
- Lolans, K., Rice, T.W., Munoz-Price, L.S., Quinn, J.P., 2006.** Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2941-2945.
- Ma, L., Alba, J., Chang, F.Y., Ishiguro, M., Yamaguchi, K., Leung, K.S., 2005.** Novel SHV-derived extended-spectrum β -lactamase, SHV-57, that confers resistance to ceftazidime but not cefazolin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 600-605.
- Macleán, R.C., Hall, A.R., Perron, G.G., Buckling, A., 2010.** The evolution of antibiotic resistance: insight into the roles of molecular mechanisms of resistance and treatment context. *Discovery Medicine*, 10, 112-118.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 268-281.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1626 s.
- Marciano, D.C., Brown, N.G. and Palzkill, T., 2009.** Analysis of the plasticity of location of the Arg244 positive charge within the active site of the TEM-1 β -lactamase. *Protein Science*, 18, 2080-2089.

- Mitchell, J.M., Clasman, J.R., June, C.M., Kaitany, K.C., LaFleur, J.R., Taracila, M.A., Klinger, N.V., Bonomo, R.A., Wymore, T., Szarecka, A., Powers, R.A., Leonard, D.A., 2015.** Structural basis of activity against aztreonam and extended spectrum cephalosporins for two carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Biochemistry*, 54, 1976-1987.
- Mitchell, J.M., Leonard, D.A., 2014.** Common clinical substitutions enhance the carbapenemase activity of OXA-51-like class D β -lactamases from *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 7015-7016.
- Moubareck, C., Brémont, S., Conroy, M.C., Courvalin, P., Lambert, T., 2009.** GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 3579-3581.
- Naas, T., Iorga, B., Djamdjian, L., Maros, M., Nordmann, P., 2013.** Insights in penicillin-hydrolysis activity of class A extended-spectrum β -lactamases (ESBL) TLA-2. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany, April 28, 2013.
- Nijhuis, R.H., Oueslati, S., Zhou, K., Bosboom, R.W., Rossen, J.W., Naas, T., 2015.** OXY-2-15, a novel variant showing increased ceftazidime hydrolytic activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 1429-1433.
- Nowak, P., Paluchowska, P., Budak, A., 2012.** Distribution of *bla*_{OXA} genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial strains in Poland. *New Microbiologica*, 35, 317-325.
- Ofer-Friedman, H., Shefler, C., Sharma, S., Tirosh, A., Tal-Jasper, R., Kandipalli, D., Sharma, S., Bathina, P., Kaplansky, T., Maskit, M., Azouri, T., Lazarovitch, T., Zaidenstein, R., Kaye, K.S., Marchaim, D., 2015.** Carbapenems Versus Piperacillin-Tazobactam for Bloodstream Infections of Nonurinary Source Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 36, 981-985.
- Ozgumus, O.B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E., Sivri, Nuket., 2009.** Class 1 and Class 2 Integrons and Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in Coliforms Isolated from Ten Rivers in Northern Turkey. *The Journal of Microbiology*, 47, 19-27.
- Ozgumus, O.B., Tosun, I., Aydin, F., Kilic, A.O., 2008.** Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonal isolates of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 636-643.

- Özseven, A.G., Çetin, E.S., Arıdoğan, B.C., 2012.** Çeşitli Klinik Örneklerden İzole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının Antibiyotik direnç Profilleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 42, 55-60.
- Paterson, D.L. and Bonomo, R.A., 2005.** Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology Reviews, 18, 657-686.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008.** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 21, 538-582.
- Poirel, L., Brinas, L., Fortineau, N., Nordmann, P., 2005.** Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 3593-3597.
- Poirel, L., Castanheira, M., Carrër, A., Rodriguez, C.P., Jones, R.N., Smayevsky, J., 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.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P., 2000.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 622-632.
- Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M.G., Nordmann, P., 2001.** GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 2598-2603.
- Rasmussen, J.W. and Høiby, N., 2006.** OXA-type carbapenemases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57, 373-383.
- Sabbagh, Y., Thériault, E., Sanschagrın, F., Voyer, N., Palzkill, T., Levesque, R.C., 1998.** Characterization of a PSE-4 Mutant with Different Properties in Relation to Penicillanic Acid Sulfones: Importance of Residues 216 to 218 in Class A β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42, 2319-2325.
- Saga, T. and Yamaguchi, K., 2009.** History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. Japan Medical Association Journal, 52, 103-108.
- Salverda, M.L., De Visser, J.A. and Barlow, M., 2010.** Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. FEMS Microbiology Reviews, 34, 1015-1036.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1987.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 545 s.
- Segal, H., Garny, S., Elisha, B.G., 2005.** Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? FEMS Microbiology Letters, 243, 425-429.
- Shimamura, T., Ibuka, A., Fushinobu, S., Wakagi, T., Ishiguro, M., Ishii, Y., Matsuzawa, H., 2002.** Acyl-intermediate structures of the extended-spectrum class A β -lactamase, Toho-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin. The Journal of Biological Chemistry, 277, 46601-46608.
- Somily, A.M., Absar, M.M., Arshad, M.Z., Al Aska, A.I., Shakoor, Z.A., Fatani, A.J., Siddiqui, Y.M., Murray, T.S., 2012.** Antimicrobial susceptibility patterns of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* against carbapenems, colistin, and tigecycline. Saudi Medical Journal, 33, 750-755.
- Schrödinger, 2014.** The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.
- Smith, C.A., Frase, H., Toth, M., Kumarasiri, M., Wiafe, K., Munoz, J., Mobashery, S., Vakulenko, S.B., 2012.** Structural basis for progression toward the carbapenemase activity in the GES family of β -lactamases. Journal of the American Chemical Society, 134, 19512-19515.
- Smith, C.A., Antunes, N.T., Stewart, N.K., Frase, H., Toth, M., Kantardjieff, K.A. and Vakulenko, S., 2015.** Structural Basis for Enhancement of Carbapenemase Activity in the OXA-51 Family of Class D β -Lactamases. ACS Chemical Biology, 10, 1791-1796.
- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, T.A., Arda N., 2008.** Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 204-208.
- Törenci, K., 1989.** Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi, 3, 445-456.
- Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M. and Pitt, T.L., 2006a.** The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiology Letters, 258, 72-77.
- Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L., 2006b.** Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44, 2974-2976.

- URL-1, 2013.** www.microrao.com/micronotes/pg/ESBLs.pdf (25 Mart 2013).
- URL-2, 2015.** https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f9/Beta-lactam_core_structures.svg/ (06 Ekim 2015).
- URL-3, 2015.** <http://www.genome.jp/kegg/disease/br08453.html> (24 Ağustos 2015).
- URL-4, 2015.** <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1> (24 Ağustos 2015).
- URL-5, 2015.** <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Tazobactam.svg> (2 Ekim 2015).
- URL-6, 2015.** <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c0/Sulbactam.svg> (2 Ekim 2015).
- URL-7, 2015.** <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b4/> (2 Ekim 2015).
- URL-8, 2014.** <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (5 Ağustos, 2014)
- URL-9, 2015.** <http://web.expasy.org/protparam/> (10 Haziran 2015).
- URL-10, 2014.** <http://web.expasy.org/translate/> (21 Eylül, 2014).
- Wachino, J., Doi, Y., Yamane, K., Shibata, N., Yagi, T., Kubota, T., Arakawa, Y., 2004.** Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2905-2910.
- Weldhagen, G.F., 2006.** GES: an emerging family of extended spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Newsletter*, 28, 145-149.
- Woodford, N., Ellington, M.J., Coelho, J.M., Turton, J.F., Ward, M.E., Brown, S., Amyes, S.G., Livermore, D.M., 2006.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 351-353.
- Yolbaş, İ., Tekin, R., Güneş, A., Kelekçi, S., Şen, V., Tan, İ., Uluca, Ü., 2013.** Bir üniversite hastanesindeki *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 4, 318-321.
- Zeng, X. and Lin, J., 2013.** Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül SARAL 17/12/1986 tarihinde Samsun'da doğdu. İlköğretimini 2000 yılında İstanbul ili Güzide Yılmaz İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2004 yılında İstanbul ilinde Hayrullah Kefoğlu (YDA) Lisesi'nde tamamladı. 06/09/2004 yılında başladığı lisans eğitimini 03/07/2009 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde üniversite üçüncülük derecesi ile tamamladı. 2009 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'da Yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında Yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2011 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'da başladığı doktora öğrenimi halen devam etmektedir. Doktora eğitimi süresince TÜBİTAK-2211 Yurt İçi Doktora Burs Programından destek aldı. TÜBİTAK 2214-A-Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında 12/05/15-31/09/15 tarihleri arasında 5,5 aylık süreyle Grand Valley State Üniversitesi, Moleküler ve Hücrel Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda bulundu. 2010 yılından beri Artvin Çoruh Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Orta seviyede İngilizce bilmektedir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;

Görev Aldığı Projeler:

1. Beta-Laktamaz Geni BlaGES-22'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu ve Bazı Korunmuş Amino Asitlerin Mutasyonel Analizi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/BAP-2013.102.03.12. 2013-2015.
2. Ges Tipi Beta Laktamazlarda Varyasyonlara Neden Olan ve Serin A Beta Laktamazlarda (Tem, Shv) Korunmuş Bazı Aminoasitlerin Katalitik Aktiviteye Etkilerinin Araştırılması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/BAP-2014.102.03.02. 2014-2016.
3. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'lerde Sınıf 1, 2, 3 İntegron gen Kasetlerinin Taranması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/ BAP 2012.106.01.11. 2012.

4. *polA* Geni Açısından Mutant ve Yaban Tip *Geobacillus kaustophilus* Hücrelerinde Büyüme Hızlarının Karşılaştırılması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/BAP 2011.102.03.3. 2011- 2013.
5. *Picea orientalis* Ormanlarında Zarar Yapan *Pristiphora abietina*'nın Mikrobiyal Kontrolü. Artvin Çoruh Üniversitesi/BAP 2011.F15.02.18. 2011- 2013

SCI-SCIE-AHCI Kapsamındaki Makaleleri:

- Iraz, M., Duzgun, A.O., Cicek, A.C., Bonnin, R.A., Ceylan, A., Saral, A., Nordmann, P., Sandalli, C., 2014.** Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*,78(3),292-294.
- Cicek, A.C., Duzgun, A.O., Saral, A., Sandalli C., 2014.** Determination of a novel integron-located variant (*bla_{OXA-320}*) of Class D β -lactamase in *Proteus mirabilis*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10),1030-1035.
- Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y., Sandalli, C., 2013.** OXA and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, DOI: 10.1111/1469-0691.12338.
- Copur, Cicek, A., Saral, A., Ozad, Duzgun, A., Yasar, E., Cizmeci, Z., Ozlem, Balci, P., Sari, F., Firat, M., Altintop, Y.A., Ak, S., Caliskan, A., Yildiz, N., Sancaktar, M., Esra, Budak, E., Erturk, A., Birol, Ozgumus. O.,Sandalli, C., 2013.** Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *The Journal of Antibiotics*, 66(11), 647–650.
- Cicek, A.Ç., Saral, A., Duzgun, A.O., Cizmeci, Z., Kayman, T., Balci, P.O., Dal, T., Firat, M., Yazici, Y., Sancaktar, M., Ozgumus, O.B., Sandalli, C., 2013.** Screening of Class 1 and Class 2 Integrons in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Collected from Seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. *Open Journal of Medical Microbiology*,3,227–233.
- Çiçek, A.Ç., Düzgün, A.Ö., Saral, A., Kayman, T., Çizmeci, Z., Balcı, P.Ö., Dal, T., Firat, M., Tosun, İ., Altıntop, Y.A., Çalışkan, A., Yazıcı, Y., Sandallı, C., 2013.** Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3,743-7. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60149-5.

Sandalli, C., Saral, A., Ülker, S., Karaoğlu, H., Beldüz, A.O., Cicek, A.C., 2014. Cloning, expression and characterization of a novel ctp synthase gene from *Anoxybacillus gonensis* G2. *Turkish Journal of Biology*, 38, 111-117.

Copur-Cicek, A., Ozgumus, O.B., Saral, A., Sandalli, C., 2014. Antimicrobial resistance patterns and integron carriage of *Escherichia coli* isolates causing community-acquired infections in Turkey. *Annals of Laboratory Medicine*, 34, 139-144.

Iraz, M., Düzgün, A.Ö., Sandalli, C., Doymaz, M.Z., Akkoyunlu, Y., Saral, A., Peleg, A.Y., Ozgumus, O.B., Beriş, F.Ş., Karaoğlu, H., Copur-Cicek, A., 2015. Distribution of β -Lactamase Genes Among Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Annals of Laboratory Medicine*, 35, 595-601.

Katıldığı Kongreler;

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

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

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

Saral, A., Sandalli, C., Cicek, A.C., 2014. GES-22 Tipi Beta Laktamazın Karakterizasyonu. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 18-20 Nisan, İstanbul, Türkiye.

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

- Cicek, A.C., Saral, A., Duzgun, A.O., Yasar, E., Cizmeci, Z., Balci, P.O., Sari, F., Firat, M., Altintop, Y.A., Ak, S., Caliskan, A., Yildiz, N., Sancaktar, M., Sandalli C., 2013.** A Multicenter Study of *Escherichia Coli* Producing Extended-Spectrum β -Lactamases (TEM, SHV and CTX-M) from Turkey. The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May, Tirana, Albania.
- Iraz, M., Duzgun, A.O., Cicek, A.C., Bonnin, R.A., Ceylan, A., Saral, A., Nordmann, P., Sandalli, C., 2013.** A Novel VIM-38 Variant and the First Detection of GES-5 Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* from Bezmialem Vakif University, Turkey. The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May, Tirana, Albania.
- Cicek, A.C., Duzgun, A.O., Saral, A., Sandalli, C., 2013.** Determining of a Novel Integron-Located *bla*_{OXA-1-Like} Variant of Class D β -Lactamases in *Proteus mirabilis*. The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May, Tirana, Albania.
- Cicek, A.C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A.O., Peleg, A.Y., Sandalli, C., 2013.** GES and OXA-type β -Lactamases Predominate in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Isolates from a Turkish University Hospital. The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May, Tirana, Albania.
- Cicek, A.C., Saral, A., Özad, A., Cizmeci, Z., Kayman, T., Balci, P.O., Dal, T., Firat, M., Caliskan, A., Yazıcı, Y., Sancaktar, M., Özgümüş, O.B., Sandalli, C., 2012.** Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen 261 *Pseudomonas aeruginosa* Suşunda Sınıf I ve II İntegronların Moleküler Karakterizasyonu. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım, Kuşadası -Aydın, Turkey.
- Cicek, A.C., Özad, A., Saral, A., Kayman, T., Cizmeci, Z., Balci, P.O., Firat, M., Tosun, I., Altintop, Y.A., Caliskan, A., Yazıcı, Y., Sandalli, C., 2012.** Türkiye'nin Farklı İllerindeki Hastanelerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Sınıf I ve Sınıf II İntegronların Moleküler Karakterizasyonu. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım, Kuşadası - Aydın, Turkey.
- İskender, N.A., Örtücü, S., Aksu, Y., Saral, A., 2012.** *Picea orientalis* ormanlarında zarar yapan *Pristiphora abietina* (Christ.) Larvalarının İç Ve Dış Yüzey Mikrofungus Florasının Belirlenmesi. First International Biology Congress In Kyrgyzstan, 24-27 September, Kyrgyzstan.
- Saral, A., Ülker, S., Karaoğlu, H., Sandalli, C., Beldüz, A.O., 2012.** *Anoxybacillus gonensis* G2^T ctp sentetaz geninin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve amonyak-bağımlı ctp sentetaz aktivitesinin karakterizasyonu. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül, İzmir, Türkiye.

İskender, N.A., Algur, Ö.F., Aksu, Y., Örtücü, S., Saral, A., 2011. Ladin Küçük Yaprak Arısı, *Pristiphora abietina* (Christ) (Hymenoptera: Tenthredinidae), zararlısının potansiyel biyolojik kontrol ajanlarının izolasyonu ve tanısı. Türkiye I. Orman Entomolojisi Ve Patolojisi Sempozyumu, 23 - 25 Kasım, Antalya, Türkiye.