



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ**

**ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΕΥΡΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΤΩΝ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ
ΤΑΞΕΩΝ A ΚΑΙ C**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΤΟΥ
ΣΤΑΘΗ-ΑΡΙΣΤΟΜΕΝΗ Δ. ΚΩΤΣΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ Αv. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ**

ΛΑΡΙΣΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. Ευθυμία Πετεινάκη, Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ) -επιβλέπουσα
2. Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ΠΘ
3. Λεωνίδας Τζουβελέκης, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Επταμελής Επιτροπή

1. Ευθυμία Πετεινάκη, Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)
2. Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Λεωνίδας Τζουβελέκης, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ
4. Δημήτριος Καρπούζας, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ΠΘ
5. Δημήτριος Μόσιαλος, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ΠΘ
6. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ
7. Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ

Πρόλογος

Η βακτηριακή ανοχή έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες επικινδυνότητας για την δημόσια υγεία. Τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των πολυανθεκτικών βακτηρίων που απομονώνονται σε νοσοκομεία έχει αυξηθεί ανησυχητικά. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος προϋποθέτει συνολική μελέτη των μηχανισμών που χαρακτηρίζουν τη *βιολογία της ανοχής* ώστε να βρεθούν πιθανές λύσεις. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοχημική παράμετρος της ανοχής στις β-λακτάμες. Συγκεκριμένα διερευνήθηκαν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αντιπρόσωποι κλινικά σημαντικών β-λακταμασών που ανήκουν στις μοριακές τάξεις A και C διευρύνουν το φάσμα υποστρωμάτων τους υδρολύοντας αντιβιοτικά *τελευταίας γραμμής* όπως είναι οι νεότερες κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες συσχετίζοντας δομή και λειτουργία. Η γνώση των μηχανισμών αυτών σε επίπεδο ατόμου ενδέχεται να οδηγήσει στο σχεδιασμό μορίων με βελτιωμένες ιδιότητες που θα παρακάμπτουν ή θα αναστέλλουν τα συγκεκριμένα ένζυμα. Η μελέτη σε πραγματικό χρόνο της εξέλιξης των β-λακταμασών προς νέες ιδιότητες υπό συνθήκες έντονης επιλογής δημιουργεί επίσης τη δυνατότητα να αποσαφηνιστούν οι βασικοί μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται η τελειοποίηση της καταλυτικής λειτουργίας των ενζύμων.

Στην Ελλάδα η ομάδα ερευνητών που αντιμετωπίζει το πρόβλημα της ανοχής συνολικά μελετώντας ποικίλες πτυχές της βιολογίας της συνίσταται από τα μέλη του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ Δρ. Εύα Τζελέπη και Δρ. Βιβή Μυριαγκού, από τον Αν. Καθηγητή Λεωνίδα Τζουβελέκη και τον Καθηγητή Γιώργο Δαίκο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και από την Αν. Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ευθυμία Πετεινάκη. Στους παραπάνω οφείλω αμέριστη ευγνωμοσύνη όχι μόνο για τη δυνατότητα που μου προσέφεραν στο να ασχοληθώ με το ενδιαφέρον αυτό θέμα αλλά και για τα όσα με δίδαξαν τόσο σε επιστημονικό όσο και σε επίπεδο ήθους. Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας ήμουν αποδέκτης σημαντικής βοήθειας από τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΕΠΠ, στο οποίο έλαβε χώρα το πειραματικό μέρος, τα οποία και ευχαριστώ· ιδιαίτερος δε την Ειρήνη Σιατραβάνη και τον Δρ. Κωνσταντίνο Παπαγιαννίτη. Αρωγοί στην προσπάθειά μου αυτή ήταν τα μέλη της τριμελούς

συμβουλευτικής επιτροπής Ε. Πετεινάκη, Λ. Τζουβελέκης και ο Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Παύλο και Άγγελο Αρναούτη καθώς και τους υπόλοιπους συνεργάτες της εταιρείας Παύλος Αρναούτης Α.Ε. για την σημαντική στήριξη που μου παρείχαν σε όλα τα έτη των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. ΒΑΚΤΗΡΙΑ, ΑΝΘΡΩΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	9
2. β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ: ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ	27
Α. Ο β-λακταμικός δακτύλιος.....	27
Β. Δομές β-λακταμικών αντιβιοτικών	31
i. Πενικιλίνες.....	31
ii. Κεφαλοσπορίνες	35
iii. Κεφαμυκίνες.....	42
iv. Καρβαπενέμες.....	44
v. Κλαβουλανικό οξύ και άλλοι αναστολείς "αυτοκτονίας" β-λακταμασών	49
vi. Μονοκυκλικές β-λακτάμες	54
Γ. Βακτηριακό τοίχωμα και μηχανισμός δράσης των β-λακταμών.....	57
3. β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ.....	70
Α. Εξελικτικές και μηχανιστικές θεωρήσεις.....	70
Β. β-λακταμάσες μοριακής τάξης Α	92
i. Τύποι, γενετική εντόπιση και κινητοποίηση.....	92
ii. Φαινότυποι και βιοχημικές ιδιότητες.....	103
iii. Ενεργό κέντρο και μηχανισμός κατάλυσης	114
iv. Τροποποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων και μελέτες δομής-λειτουργίας	119
Γ. β-λακταμάσες μοριακής τάξης C.....	135
i. Τύποι, γενετική εντόπιση και κινητοποίηση.....	135
ii. Βιοχημικές ιδιότητες και φαινότυποι.....	141
iii. Ενεργό κέντρο και μηχανισμός κατάλυσης	145
iv. Διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων και μελέτες δομής λειτουργίας.....	151
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	157
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	159
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	162
Α. Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδιακά οχήματα	162
Β. Χημικές ουσίες, θρεπτικά υλικά και αντιβιοτικά.....	163
Δ. Μέθοδοι προσδιορισμού επιπέδων ευαισθησίας σε β-λακταμικά	168
i. Μέθοδος Kirby-Bauer.....	168
ii. Προσδιορισμός MIC με τη μέθοδο E-test.....	169
iii. Προσδιορισμός MIC με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων.....	169
Ε. Τεχνικές απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	170
i. Απομόνωση μεγάλης κλίμακας με αλκαλική λύση και κατακρήμνιση σε φωσφοενολογλυκόλη (Large prep).	170
ii. Απομόνωση μικρής κλίμακας με βρασμό (Mini prep)	174
iii. Απομόνωση μικρής κλίμακας με εμπορικά διαθέσιμες στήλες δέσμευσης DNA	176
ΣΤ. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli με πλασμιδιακό DNA	176
i. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων E. coli με CaCl ₂	176
ii. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli με θερμικό σοκ.	177
Ζ. Κλωνοποίηση των γονιδίων <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{CMY-30} και <i>bla</i> _{CMY-42} σε πλασμιδιακά οχήματα υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων.....	178
i. Κλωνοποίηση του γονιδίου της CMY-2 στο πλασμιδιακό όχημα TOPO PCRII.....	178
ii. Εισαγωγή της Val211Gly υποκατάστασης στην CMY-2 με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση θέσης.....	182
iii. Υποκλωνοποίηση των <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{CMY-30} στα πλασμιδιακά οχήματα pBC-SK (+/-) και pACYC184	183
iv. Εισαγωγή της Val211Ser υποκατάστασης στην CMY-2 που παράγονταν από τους pAC και pBC κλώνους	187

H. Κλωνοποίηση των γονιδίων των ποικιλιών GES σε πλασμιδιακά οχήματα υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων.....	188
i. Εισαγωγή των υποκαταστάσεων Glu104Lys, Gly170Asn και Gly170Ser στην GES-1.....	188
ii. Υποκλωνοποίηση των γονιδίων bla _{GES} στο πλασμιδιακό όχημα χαμηλού αριθμού αντιγράφων pACYC184	189
iii. Παρασκευή εργαστηριακών μεταλλακτών της θέσης 104 των ενζύμων τύπου GES.....	191
Θ. Αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση β-λακταμασών.....	192
i. Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	194
ii. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης ΙΗΕ	195
iii. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και χρώσης νιτροσεφίνης	196
I. Καθαρισμός β-λακταμασών	196
i. Εκχύλιση των πρωτεϊνών από τον περιπλασμικό χώρο των βακτηρίων.....	197
ii. Χρωματογραφική κλασμάτωση των β-λακταμασών τύπου CMY-2	198
iii. Χρωματογραφική κλασμάτωση των β-λακταμασών τύπου GES	201
iv. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	203
iv. Μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων	206
K. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης και παραμέτρων αναστολής β-λακταμασών	207
i. Φασματοφωμετρικός προσδιορισμός υδρόλυσης β-λακταμικών αντιβιοτικών.....	207
ii. Μέτρηση αρχικής ταχύτητας ενζυμικής υδρόλυσης β-λακταμικών αντιβιοτικών και μονάδων ενεργότητας β-λακταμασών.....	210
iii. Μέτρηση κινητικών σταθερών υδρόλυσης.....	214
iv. Μέτρηση παραμέτρων αναστολής β-λακταμασών κατά την αλληλεπίδρασή τους με β-λακταμικά αντιβιοτικά	219
v. Μέτρηση παραμέτρων αναστολής β-λακταμασών κατά την αλληλεπίδρασή τους με βορονικά οξέα ανάλογα των κεφαλοσπορινών	225
KA. Εκτίμηση θερμικής σταθερότητας β-λακταμασών CMY-2 τύπου	229
KB. Υπολογιστική δομική ανάλυση β-λακταμασών	231
i. Γενικές θεωρήσεις επί των προσομοιώσεων βιολογικών μακρομορίων.....	231
ii. Παραμετροποίηση πεδίου δυνάμεων	242
iii. Αρχικές δομές που χρησιμοποιήθηκαν στις προσομοιώσεις MD.....	248
iv. Δημιουργία των αρχικών συστημάτων και προσομοιώσεις.....	249
v. Ανάλυση των τροχιών μοριακής δυναμικής	251
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	253
A. Φάσμα υποστρωμάτων των β-λακταμασών CMY-2, CMY-30 και CMY-42	253
i. Κλωνοποίηση των bla _{CMY-2} , bla _{CMY-30} και bla _{CMY-42} στα πλασμιδιακά οχήματα pACYC-184 και pBC-SK(+/-)	253
ii. Φαινοτυπικές επιδράσεις των υποκαταστάσεων Val211Gly και Val211Ser στις β-λακταμάσες τύπου CMY-2 ως προς την ευαισθησία σε β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	263
iii. Καθαρισμός των ενζύμων CMY-2, CMY-30 και CMY-42.....	265
iv. Χαρακτηρισμός βιοχημικών ιδιοτήτων των ενζύμων τύπου CMY-2	267
α. Φάσμα υποστρωμάτων.....	267
β. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης.....	268
γ. Αναστολή από β-λακτάμες.....	279
δ. Αναστολή από βορονικά οξέα.....	279
ε. Πειράματα θερμικής αποδιάταξης.....	282
v. Δομική βάση της διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων από τις Val211Gly και Val211Ser υποκαταστάσεις	290
B. Επίδραση των φυσικών μεταλλάξεων που απαντούν στις θέσεις 104 και 170 στο φάσμα υποστρωμάτων των ενζύμων τύπου GES.	306
i. Κλωνοποίηση των γονιδίων bla _{GES-1} bla _{GES-2} bla _{GES-5} bla _{GES-7} bla _{GES-13} και bla _{GES-6} στα πλασμιδιακά οχήματα pACYC-184 και pBC-SK(+/-)	306

ii. Επίδραση των θέσεων 104 και 170 στους φαινότυπους ευαισθησίας των φυσικών GES β-λακταμασών.....	315
iii. Καθαρισμός των ενζύμων GES.....	318
iv. Βιοχημικές ιδιότητες των ενζύμων τύπου GES.....	320
α. Υδρολυτικό προφίλ.....	320
β. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης.....	320
γ. Αναστολή από β-λακταμικά.....	336
v. Δομική ανάλυση των ενζύμων τύπου GES.....	337
Γ. Ανάλυση του ρόλου της θέσης 104 στις GES ΕΦΒΛ μέσω κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης.....	352
i. Πειράματα μεταλλαξογένεσης.....	352
ii. Επίδραση της φύσης του αμινοξέος στη θέση 104 στους φαινότυπους ευαισθησίας των ενζύμων τύπου GES.....	355
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	367
Α. Μηχανισμοί διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων στις τάξης C β-λακταμάσες του τύπου CMY-2.....	367
Β. Μηχανισμοί διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων στις τάξης A β-λακταμάσες τύπου GES.....	374
Γ. Επίλογος.....	385
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	387
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	427
SUMMARY.....	431

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΒΑΚΤΗΡΙΑ, ΑΝΘΡΩΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Τα βακτήρια, μαζί με τους αρχαίους προκαρυωτικούς οργανισμούς, αποτελούν ίσως τους πιο κατάλληλα προσαρμοσμένους κατοίκους αυτού του πλανήτη έχοντας ουσιαστικά κατακτήσει κάθε είδους ενδιαίτημα όσο ακραιές και να είναι οι συνθήκες που απαντούν σε αυτό. Για περισσότερα από 3 δισ. χρόνια οι προκαρυωτικοί οργανισμοί εξελίσσονται και προσαρμόζονται στις μεταβαλλόμενες συνθήκες που επικρατούν στη Γή ενώ παράλληλα τροποποιούν τη χημική της σύσταση μέσω των διεργασιών που επιτελούν (σημαντικότερη από όλες θεωρείται η παραγωγή μοριακού οξυγόνου από τα πρώτα φωτοσυνθετικά βακτήρια η οποία οδήγησε στις μορφές ζωής που συναντάμε γύρω μας). Τα βακτήρια εκτός από την παραπάνω έμμεση επίδραση στη βιολογία των ανώτερων οργανισμών έχουν αναπτύξει και άμεσες σχέσεις οι οποίες ενδέχεται να είναι είτε ωφέλιμες είτε επιβλαβείς για αυτούς. Η λοιμογόνος δράση των βακτηρίων στον άνθρωπο όσο και στους ζωντανούς οργανισμούς (φυτικούς και ζωϊκούς) που αυτός εκμεταλλεύεται για οικονομικούς λόγους ήταν ουσιαστικά το έναυσμα για τη μελέτη τους και τη θεμελίωση της επιστήμης της μικροβιολογίας.

Από τις αρχές της ιστορίας της ανθρωπότητας τα βακτήρια αν και "αόρατα" έκαναν αισθητή την παρουσία τους είτε μέσω των χρήσεων σε διάφορες πρώιμες βιοτεχνολογικές διαδικασίες (π.χ. παραγωγή κρασιού) είτε προκαλώντας μολυσματικές ασθένειες στον άνθρωπο οι οποίες σε αρκετές περιπτώσεις εξελίσσονταν σε επιδημίες. Παρ' όλα αυτά δεν ήταν πριν το 1684 έγινε αντιληπτή η ύπαρξή τους με τις παρατηρήσεις του Antonie van Leeuwenhoek στα απλά μικροσκόπια που κατασκεύαζε και με τα οποία μπόρεσε να παρατηρήσει μικροοργανισμούς σε επίπεδο βακτηρίου ονομάζοντάς τους "*animalcules*" (απειροελάχιστα ζωομόρια). Η πραγματική όμως εμβάνθυση στη μελέτη της βιολογίας των βακτηρίων συντελέστηκε στα μέσα του 19ου αιώνα με την βελτίωση των μικροσκοπίων (Εικόνα 1Α) και την ανάπτυξη βασικών εργαστηριακών τεχνικών. Τα παραπάνω εξελίχθηκαν στα πλαίσια της "διαμάχης" που ταλάνιζε τους επιστήμονες της εποχής και αφορούσε τα ερωτήματα της "αυθόρμητης γένεσης" (δηλ. αν υπάρχει δυνατότητα να προκύψουν ζωντανοί οργανισμοί από μη ζωντανή ύλη) και της "φύσης των μολυσματικών νόσων". Οριστικές απαντήσεις στα δύο παραπάνω ερωτήματα δόθηκαν από τους Louis Pasteur και Robert Koch αντίστοιχα,

μετά από μία σειρά πρωτοποριακών πειραμάτων που εισήγαγαν νέες τεχνικές που χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα στη μικροβιολογία (Madigan και συν., 2005). Εντούτοις, μια πλειάδα άλλων ερευνητών που προηγήθηκαν ή εργάστηκαν παράλληλα με αυτούς συνέβαλαν σημαντικά στην εξέλιξη της μικροβιολογίας ανακαλύπτοντας μικροοργανισμούς και μελετώντας την βιολογία τους δημιουργώντας έτσι την κρίσιμη συσσώρευση γνώσης που απαιτείται πριν από κάθε επιστημονικό επίτευγμα. Εξέχουσα συμβολή σε αυτή την διαδικασία είχε ο βοτανολόγος Ferdinand Cohn, ο οποίος, μεταξύ άλλων, εστιαζόμενος στη μελέτη θερμοανθεκτικών μορφών βακτηρίων με την χρήση μικροσκοπίου χαρακτήρισε το 1872 το γένος *Bacillus* - ουσιαστικά ήταν ο πρώτος που εισηγήθηκε την ταξινομική κατάταξη των βακτηρίων - ενώ παράλληλα περιέγραψε τον κύκλο ζωής του (εναλλαγή μεταξύ βλαστικού κυττάρου και ενδοσπορίου) (Drews J., 1999; Madigan και συν., 2005).

Ο F. Cohn, ο κατά πολλούς πατέρας της Βακτηριολογίας, συνέβαλε και στην εδραίωση της θεωρίας περί της μικροβιακής φύσης των μολυσματικών νόσων καθώς ήταν αυτός ο οποίος διέκρινε την σημασία των πειραμάτων του εκπαιδευόμενου ιατρού Robert Koch αναφορικά με την ασθένεια του άνθρακα και την πρόκλησή της από ένα είδος βάκιλλου (*Bacillus anthracis*) ενθαρρύνοντάς τον να τα δημοσιεύσει το 1876 (Drews J., 1999). Την ιδέα ότι οι μολυσματικές ασθένειες προκαλούνται από μικροοργανισμούς την υιοθετούσαν σε θεωρητικό επίπεδο αρκετοί από τους πρωτοπόρους της μικροβιολογίας (π.χ. Pasteur, Cohn κ.α., Tan S.Y. και συν., 2007) ενώ υπήρχαν και έμμεσες ενδείξεις έπειτα από τις ανακαλύψεις στον τομέα της υγιεινής των Ignaz Semmelweis και Joseph Lister (Madigan και συν., 2005). Η προσέγγιση του Koch όμως ήταν αυτή που έδωσε την άμεση επιβεβαίωση.

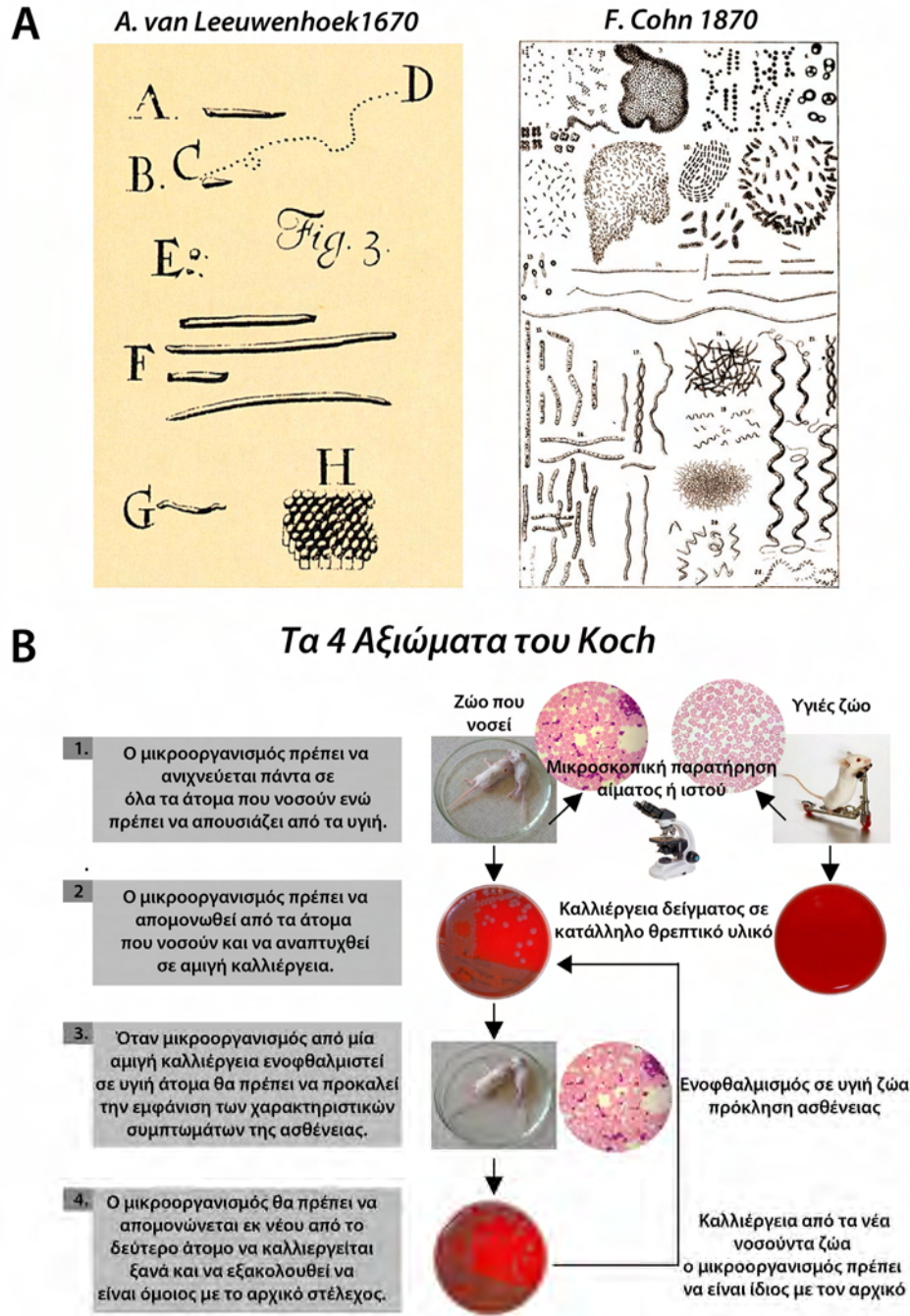
Κατά τη μελέτη λοιπόν του άνθρακα, μίας ασθένειας που προσβάλλει κυρίως τα βοοειδή ενώ μπορεί να εμφανιστεί και σε ανθρώπους, ο Koch παρατήρησε ότι σε κατάλληλα χρωσμένα μικροσκοπικά παρασκευάσματα αίματος ζώων που πέθαιναν από το συγκεκριμένο νόσημα απαντούσαν πάντα υψηλοί αριθμοί σποριογονικών βακτηρίων μεγάλου μεγέθους. Δημιουργώντας ένα πειραματικό μοντέλο της ασθένειας σε ποντίκια διαπίστωσε ότι με αίμα άρρωστων ζώων μπορούσε να μολύνει διαδοχικά υγιή ζώα ενώ μπορούσε να ανιχνεύσει στο μικροσκόπιο τις συγκεκριμένες βακτηριακές μορφές. Παράλληλα κατάφερε να αναπτύξει το βακτήριο σε υγρά θρεπτικά υλικά παρατηρώντας

ότι μπορούσε να προκαλέσει την ασθένεια χορηγώντας απλώς τον καλλιεργημένο μικροοργανισμό ο οποίος μπορούσε να απομονωθεί πάλι και να καλλιεργηθεί από το αίμα των ζώων που πέθαιναν και ότι το ίδιο συνέβαινε έπειτα από επανειλημμένες ανακαλλιέργειες. Τα παραπάνω αποτελέσματα ανέδειξαν ότι το συγκεκριμένο βακτήριο (βάκιλλος του άνθρακα, *Bacillus anthracis*) αποτελεί το αίτιο της ασθένειας του άνθρακα (Koch R., 1876). Ο Koch γενικεύοντας διατύπωσε τα αξιώματα που αποτελούν αναγκαίες συνθήκες για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως αιτιολογικός παράγοντας μίας ασθένειας και τα οποία συνοψίζονται στην Εικόνα 1B.

Ακολουθώντας την παραπάνω πειραματική διαδικασία και βελτιώνοντας τις μεθόδους καλλιέργειας για την απομόνωση βακτηριακών στελεχών, υιοθετώντας τελικά την χρήση στερεών θρεπτικών μέσων που έχουν ως βάση τους το άγαρ, κατάφερε να ταυτοποιήσει ως αιτιολογικούς παράγοντες της φυματίωσης και της χολέρας τα *Mycobacterium tuberculosis* και *Vibrio cholerae* αντίστοιχα (Koch R., 1882; Howard-Jones N., 1984; Wilmoth-Lerner B. και Lerner L., 2006). Το γεγονός ότι για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως παράγοντας πρόκλησης μίας ασθένειας έπρεπε να καλλιεργηθεί *in vitro* απέκλειε τα βακτήρια τα οποία δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν σε τεχνητά θρεπτικά υλικά ενώ η ανάγκη ύπαρξης ζωϊκού μοντέλου της ασθένειας απέκλειε τους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν αποκλειστικά ανθρώπους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των περιπτώσεων αποτελούν το μυκοβακτήριο της λέπρας (*Mycobacterium leprae*) και το ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) αντίστοιχα με το μόνον πρώτο να καλλιεργείται τελικά σε επιδερμικούς ιστούς αρμαντίλο (Shinnick T., 2006) και το δεύτερο να καταναλώνεται από τον Barry Marshall έναν ερευνητή που ήταν πεπεισμένος ότι το *H. pylori* προκαλεί γαστρικό έλκος (Salyers A. A. και Whitt D. D., 1994). Εντούτοις, τα αξιώματα του Koch και οι νέες τεχνικές αμοιγών καλλιέργειών στα χρόνια που ακολούθησαν αποκάλυψαν ότι μία σειρά από ασθένειες που αποδεκάτιζαν τους ανθρώπινους πληθυσμούς για χιλιετίες προκαλούνταν από βακτήρια.

Η αποκάλυψη της φύσης των μολυσματικών νόσων κατέστησε σαφές ότι οι πιθανές θεραπείες θα έπρεπε να περιλαμβάνουν παράγοντες που θα προκαλούσαν την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που τις προκαλούν. Για το που θα έπρεπε να αναζητηθούν αυτοί οι παράγοντες οι πρώτοι μικροβιολόγοι είχαν κάποιες

ενδείξεις. Οι Pasteur και Jules Francois Joubert το 1877 παρατήρησαν ότι ο *Bacillus anthracis* αναστέλλεται από κάποιους αερομεταφερόμενους βάκιλλους και μάλιστα



Εικόνα 1: Σημαντικοί σταθμοί στην εξέλιξη της μικροβιολογίας. Α) Η εξέλιξη των μικροσκοπίων επέτρεψε τη μελέτη της βιολογίας των βακτηρίων. Β) Τα τέσσερα αξιώματα του Koch και εφαρμογή αυτών.

προσπάθησαν να θεραπεύσουν ζώα που νοσούσαν από άνθρακα εμβολιάζοντας τα με τους μικροοργανισμούς αυτούς (Foster, W. και Raoult, A., 1974). Την ίδια περίπου περίοδο οι William Roberts και John Tyndall (γνωστός για τις ανακαλύψεις του στην Φυσική) κατέγραφαν τις παρατηρήσεις τους σχετικά με την ιδιότητα μυκήτων του γένους *Penicillium* να ανταγωνίζονται την ανάπτυξη βακτηρίων (Tyndall, J., 1881; Foster, W. και Raoult, A., 1974). Παρόμοιες αναφορές ακολούθησαν και από άλλους ερευνητές αφορώντας τόσο το *Penicillium* όσο και άλλους μικροοργανισμούς που ανήκαν κυρίως στα *Ακτινοβακτήρια*. Το φαινόμενο αυτό, η ιδιότητα δηλαδή ορισμένων μικροοργανισμών να αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων, ονομάστηκε αντιβίωση και ουσιαστικά οι άνθρωποι το χρησιμοποιούσαν εν αγνοία τους από την αρχαιότητα (Foster, W. και Raoult, A., 1974). Μολαταύτα, οι πρώιμες αυτές παρατηρήσεις δεν οδήγησαν σε κάποια αποτελεσματική αντιβακτηριακή θεραπεία καθώς οι σχετικές μελέτες δεν συστηματοποιήθηκαν.

Η ιδέα για την συστηματική μελέτη ανεύρεσης θεραπευτικών ουσιών που θα αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων και άλλων λοιμογόνων παραγόντων με ειδικό τρόπο ανήκει στον Paul Ehrlich (Foster, W. και Raoult, A., 1974). Ο συγκεκριμένος ερευνητής έχοντας εμπειρία στις διαφορικές χρώσεις κυττάρων ζωντανών οργανισμών (μεταξύ άλλων βοήθησε τον Koch να βελτιώσει την τεχνική χρώσης του *M. tuberculosis*) διατύπωσε την άποψη ότι οι χρωστικές ουσίες που βάφουν ειδικά τα κύτταρα διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμησή τους. Η πρώτη χρωστική που χρησιμοποίησε ήταν το μπλε του μεθυλενίου με το οποίο έβαφε κύτταρα του πρωτόζωου *Plasmodium* (αίτιο της ελονοσίας) χορηγώντας το σε δύο ασθενείς το 1898 επιτυγχάνοντας πτώση του πυρετού και την εξάλειψη του παθογόνου από το αίμα τους (Guttman, P. και Ehrlich. P., 1891).

Το μπλε του μεθυλενίου αν και εγκαταλείφθηκε εξαιτίας των παρενεργειών του κατέδειξε στον Ehrlich ότι υπάρχει δυνατότητα ανεύρεσης χημικών ουσιών που θα έχουν ειδική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών διατυπώνοντας την έννοια της "εξειδικευμένης χημειοθεραπείας των ασθενειών". Σε συνεργασία με την χημική βιομηχανία Meister Lucius & Brüning AG (τη μετέπειτα Hoechst AG και πλέον θυγατρική της Sanofi) απ' όπου προμηθεύονταν το μπλε του μεθυλενίου αναζήτησε ουσίες με αυτές τις ιδιότητες ελέγχοντας μεγάλους αριθμούς από διάφορες χρωστικές.

Τελικά το 1910 μαζί με τον συνεργάτη του Sahachiro Hata ανακάλυψαν μία οργανική ουσία που περιείχε αρσενικό και μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηρίου *Treponema pallidum* το οποίο το 1905 είχε ταυτοποιηθεί ως ο αιτιολογικός παράγοντας της σύφιλης (Bosch, F. και Rosich, L., 2008). Η ουσία αυτή κυκλοφόρησε με το εμπορικό όνομα Salvarsan (το αρχικό όνομα ήταν ουσία 606 ενώ μετέπειτα ονομάστηκε αρσφεναμίνη, Εικόνα 2Α) έχοντας ικανοποιητικές θεραπευτικές ιδιότητες ενώ ήταν λιγότερο τοξική από τις καθιερωμένες θεραπείες της σύφιλης που περιελάμβαναν ανόργανες υδραργυρικές ενώσεις (Dayan, L. και Ooi, C., 2005). Παρ' όλα αυτά ήταν ασταθής, δυσδιάλυτη και εμφάνιζε αυξημένη τοξικότητα με αποτέλεσμα έπειτα από δύο χρόνια να αντικατασταθεί από ένα τροποποιημένο μόριο (Neosalvarsan) το οποίο ήταν πιο διαλυτό και λιγότερο τοξικό (Strebhardt, K. και Ullrich, A., 2008).

Η επιτυχία της ομάδας του Ehrlich οδήγησε την βιομηχανία χρωμάτων Bayer AG στη σύσταση ερευνητικού τμήματος που θα είχε ως στόχο την ανεύρεση χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Οι μελέτες αρχικά επικεντρώθηκαν σε παρασιτικές ασθένειες (ασθένεια του ύπνου και ελονοσία) επιφέροντας κάποια αποτελέσματα. Το 1929 συστήνεται και τμήμα αντιβακτηριακών παραγόντων με επικεφαλής τον Gerhard Domagk το οποίο πέρα από την *in vitro* δράση διαφόρων χρωστικών, τις ήλεγχε παράλληλα και *in vivo* σε μοντέλα βακτηριακών λοιμώξεων σε ποντίκια (Otten, H., 1986). Το 1932 έπειτα από αρκετές δοκιμές διαπιστώθηκε ότι μία χρωστική, η 4-[(2,4-διάμινοφενύλ)αζω]βενζυλενσουλφοναμίδη, είχε *in vivo* αντιβακτηριακή δράση σε συστηματική λοίμωξη από *Streptococcus pyogenes* σε ποντίκια (Domagk G., 1935; Lesch, J. E., 2007). Τα επόμενα δύο χρόνια ακολούθησαν κλινικές μελέτες και το 1935 η ουσία κυκλοφόρησε ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας με το όνομα Prontosil κυρίως για λοιμώξεις από Gram θετικά βακτήρια (Εικόνα 2Α).

Το Prontosil αν και *in vivo* είχε αντιβακτηριακή δράση δεν εμφάνιζε *in vitro* ενεργότητα σε καλλιέργειες στρεπτοκόκκων. Η ομάδα του Daniel Bonet που εργάζονταν στο εργαστήριο του Ernest Fourneau στο Ινστιτούτο Παστέρ έδειξε ότι το Prontosil είναι πρόδρομο φάρμακο και στον οργανισμό αποικοδομείται σε δύο ενώσεις, με μία από αυτή τη σουλφαναμίδη (Εικόνα 2Α), να είναι ο παράγοντας με την αντιβακτηριακή δράση αναστέλλοντας το βακτηριακό ένζυμο σύνθεσης του διυδροπτεροϊκού οξέος (πρόδρομο μόριο κατά τη σύνθεση του φολικού οξέος) (J. et T. Tréfouël και συν., 1935; Otten, H.,

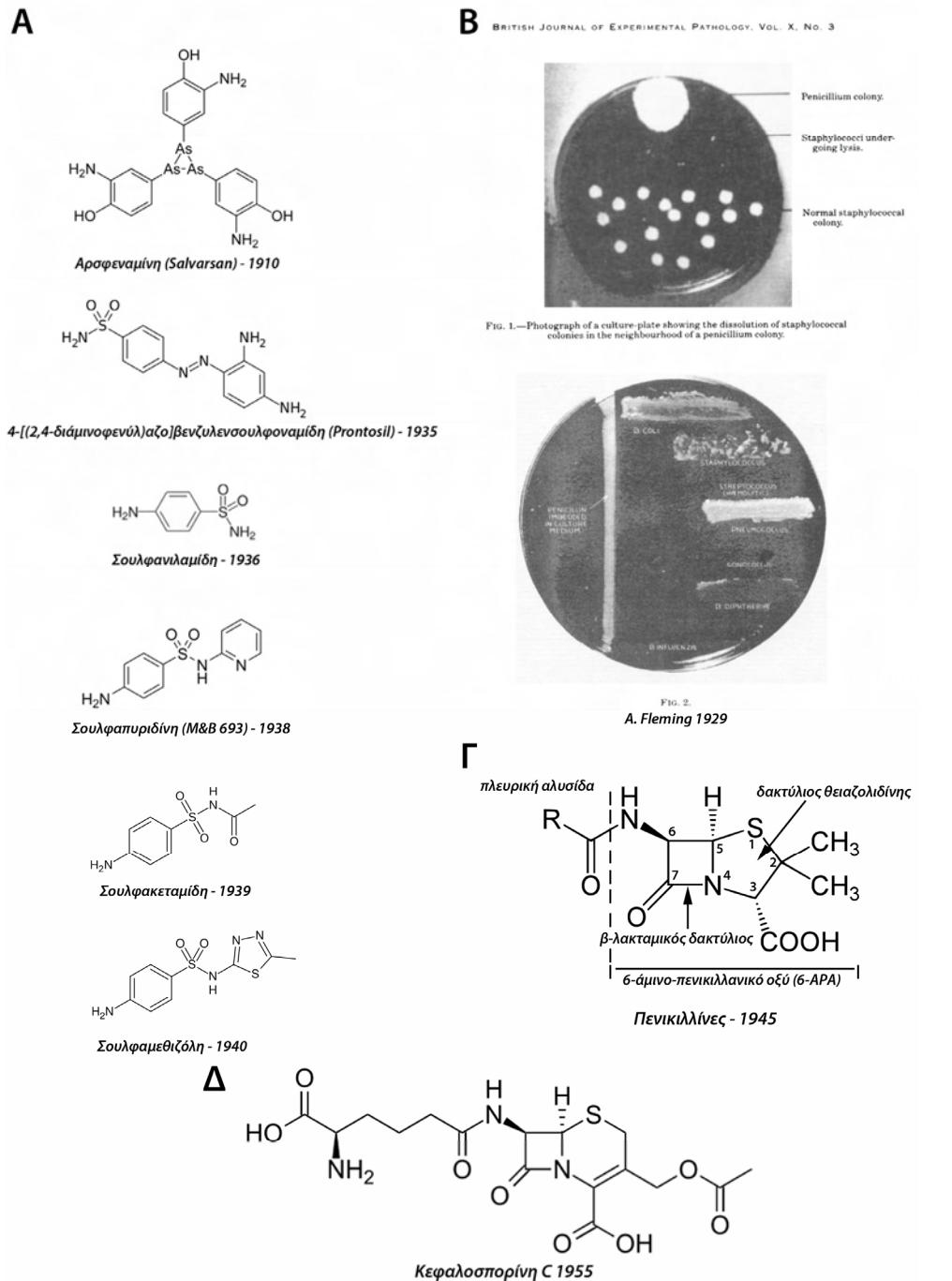
1986). Η ανακάλυψη αυτή έδειξε ότι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες θα μπορούσαν να αναζητηθούν και σε άλλους τύπους οργανικών ενώσεων πέρα από χρωστικές (Otten, H., 1986) ενώ το γεγονός ότι η σουλφανιλαμίδα ήταν ήδη σε ευρεία χρήση στην χημική βιομηχανία από το 1906 με την πατέντα της να έχει λήξει εκτός από το ότι στερήσε από την Bayer αρκετά έσοδα οδήγησε σε εκτεταμένες μελέτες από άλλες ομάδες για ανεύρεση παρόμοιων μορίων. Έτσι λοιπόν στην εποχή που ακολούθησε συντέθηκε ένας μεγάλος αριθμός μορίων που όλες περιείχαν την ομάδα της σουλφοναμίδης (Εικόνα 2Α) και βρέθηκε ότι έχουν αντιβακτηριακή δράση με αρκετές από αυτές να αναστέλλουν εκτός από Gram θετικά και κάποια Gram αρνητικά βακτήρια. Οι σουλφοναμίδες θεωρείται ότι εγκαινίασαν την *εποχή των αντιβιοτικών* και παρά τις πολλές παρενέργειες ήταν για αρκετό καιρό οι πιο πετυχημένοι αντιμικροβιακοί παράγοντες σώζοντας χιλιάδες ζωές ειδικά στον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο.

Την ίδια περίπου περίοδο με τις εξελίξεις στον τομέα της χημειοθεραπείας, ο Alexander Fleming, ειδικός στο ένζυμο λυσοζύμη που παράγεται από ανθρώπινους αδένες και προκαλεί βακτηριακή λύση, παρατήρησε και αυτός τυχαία το φαινόμενο της φυσικής αντιβίωσης που εμφανίζει το *Penicillium* αναστέλλοντας την ανάπτυξη βακτηρίων. Συγκεκριμένα παρατήρησε ότι κάποιο είδος μούχλας που αναπτύχθηκε σε ένα τρυβλίο με άγαρ στο οποίο είχε καλλιεργήσει σταφυλόκοκκο ανέστειλε την ανάπτυξη του βακτηρίου δημιουργώντας μία άλω και υπέθεσε ότι αυτό οφείλονταν σε κάποιο παράγοντα που παράγεται από τον μύκητα και διαχέεται στο θρεπτικό υλικό προκαλώντας την λύση των βακτηρίων (Fleming A., 1929; Εικόνα 2B). Επιβεβαιώνοντας την αρχική του υπόθεση, παρατήρησε ότι όντως ο αντιβακτηριακός παράγοντας εκκρίνεται από τον μύκητα εφόσον διήθημα υγρής καλλιέργειας είχε βακτηριολυτικές ιδιότητες. Το μύκητα αυτό τον ταυτοποίησε ως κάποιο είδος *Penicillium* (σήμερα γνωρίζουμε ότι πρόκειται για το *P. notatum*) και τον βακτηριολυτικό παράγοντα τον ονόμασε *πενικιλίνη* (ακριβέστερα *πενικιλίνη* ονόμασε το διήθημα υγρής καλλιέργειας του μύκητα). Ο Fleming παρατήρησε ότι η *πενικιλίνη* είχε ισχυρές ανασταλτικές ιδιότητες έναντι αρκετών άλλων Gram θετικών βακτηρίων με τα *Streptococcus pyogenes* και *S. pneumoniae* να αναστέλλονται στον ίδιο βαθμό με τους σταφυλοκόκκους, το *Corynebacterium diphtheriae* σε μικρότερο βαθμό (αναστολή με αραιώση του διηθήματος 1%) ενώ κάποια ανασταλτική ικανότητα ανιχνεύθηκε και έναντι του *B.*

anthracis. Οι εντερόκοκκοι ήταν ανθεκτικοί στην πενικιλίνη όπως και τα περισσότερα Gram αρνητικά βακτήρια εκτός από τους Gram - κόκκους (*Neisseria gonorrhoeae* και *N. meningitidis*) οι οποίοι αναστέλλονταν σε ικανοποιητικό βαθμό (Fleming 1929, Εικόνα 2B). Παράλληλα έδειξε ότι το διήθημα της καλλιέργειας του μύκητα εμφάνιζε χαμηλή τοξικότητα σε ζώα και σε επιφανειακούς ανθρώπινους ιστούς (δέρμα, επιπεφυκότας). Ο Fleming αν και διέκρινε αμέσως τις πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές της πενικιλίνης αυτό που πρότεινε στην εργασία του ήταν η χρήση της για την επιλεκτική απομόνωση *Haemophilus influenzae* από κλινικά δείγματα! (Fleming A., 1929)

Τη δεκαετία που ακολούθησε η πενικιλίνη του Fleming αποτελούσε αίνιγμα κυρίως για την αγγλική επιστημονική κοινότητα. Αν και υπήρχαν κάποιες μεμονωμένες προσπάθειες για θεραπευτική χρήση (η πρώτη καταγεγραμμένη είναι από τον Cecil George Paine όπου θεράπευσε νεογνική οφθαλμίτιδα από γονόκοκκο το 1930; Wainwright M. και Swan H. T., 1986) η *in vivo* δράση της επιβεβαιώθηκε το 1939 από την ομάδα του Howard Florey. Η ομάδα της Οξφόρδης (όπως είναι σήμερα γνωστή) κατέδειξε την ισχυρή χημειοθεραπευτική ικανότητα της πενικιλίνης σε πειραματικές λοιμώξεις σε ποντίκια ενώ επιβεβαίωσε την έλλειψη τοξικότητας (Chain και συν., 1940; Florey H. W., 1949; Florey H. W., και συν., 1949). Παράλληλα έδειξε ότι η λυτική δράση της πενικιλίνης οφείλεται στην αναστολή της βιοσύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος (Abraham E. P. και συν., 1941; Hammond S. M. και συν., 1984). Οι δοκιμές σε ανθρώπους καθυστέρησαν έναν χρόνο εξαιτίας της χαμηλής παραγωγής του αντιβακτηριακού παράγοντα από το στέλεχος *P. notatum* που χρησιμοποιούσαν, τελικά όμως εξαιτίας της μεθόδου καθαρισμού της πενικιλίνης που ανέπτυξε ο Norman Heatley συλλέχθηκε αρκετή ποσότητα για κλινικές μελέτες (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η επιτυχία των κλινικών δοκιμών οδήγησε τους Florey και Heatley στις ΗΠΑ το 1941 όπου έπεισαν τρεις φαρμακευτικές εταιρίες και το αμερικάνικο υπουργείο γεωργίας να ξεκινήσουν τη μαζική παραγωγή πενικιλίνης από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας του μύκητα (επιλέχθηκε στέλεχος *P. chrysogenum* το οποίο αρχικά έδινε συγκέντρωση πενικιλίνης 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας ενώ σήμερα, μέσω 'βελτίωσης' των στελεχών με τυχαία μεταλλαξογένεση έχουν επιτευχθεί συγκεντρώσεις 70.000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Demain A. L. και Elander, R. P., 1999).

Παράλληλα η ομάδα της Οξφόρδης εργάστηκε επί της εύρεσης της δομής της πενικιλίνης με σκοπό την παραγωγή μέσω ολικής σύνθεσης. Το 1945 οι Ernst Boris Chain και Edward Abraham πρότειναν ότι η πενικιλίνη ήταν ένα μείγμα μορίων που έφεραν ένα διπλό σύστημα δακτυλίων που αποτελούνταν από ένα τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο και από ένα πενταμελή δακτύλιο θειαζολιδίνης ο οποίος στον άνθρακα 2 ήταν υποκατεστημένος από δύο μεθυλομάδες και στον C3 από μία καρβοξυλομάδα (Εικόνα 2Γ). Στον C6 του β-λακταμικού δακτυλίου υπήρχε πάντα μία αμινομάδα η οποία ήταν ακυλιωμένη από πλευρικές αλυσίδες που διέφεραν μεταξύ των συστατικών του μείγματος (Abraham E. P., 1979; Abraham E. P., 1980; Abraham E. P., 1987). Η δομή αυτή επιβεβαιώθηκε από μελέτες κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X από τη Dorothy Hodgkin-Crowfoot) (Crowfoot D. και συν., 1949). Η ύπαρξη διαφορετικών υποκαταστάσεων στις πενικιλίνες που εκκρίνονταν από το *P. chrysogenum* αποδόθηκε στη μη ειδική ακυλίωση από διάφορους παράγοντες που περιέχονταν στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Όταν στην διαδικασία ζύμωσης καθιερώθηκε η προσθήκη σιροπιού που προκύπτει κατά την παραγωγή αραβοσιτάλευρου με τη μέθοδο της εμβάπτισης (corn steep liquor) στο θρεπτικό μέσο με σκοπό την αύξηση της παραγωγής βρέθηκε ότι αυξάνεται το ποσοστό βενζύλ-πενικιλίνης (πενικιλίνη G) σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους πενικιλινών (Mead T. H. και Stack M. V., 1948). Ενώ το ίδιο συνέβαινε όταν προστίθονταν φαινυλαλανίνη, φαινυλοξικό οξύ ή β-φαινυλαμίνη (Mead T. H. και Stack M. V., 1948). Προσθήκη φαινοξυ-οξικού οξέος ως ακυλιωτικού παράγοντα οδηγούσε κυρίως στην έκκριση φαινόξυ-μεθυλ-πενικιλίνης (πενικιλίνη V). Οι δύο παραπάνω πενικιλίνες είναι οι πρώτες που κυκλοφόρησαν ως φαρμακευτικά σκευάσματα (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η βιομηχανική παραγωγή τους εξακολούθησε να γίνεται με ζύμωση αν και αναπτύχθηκε διαδικασία ολικής σύνθεσης εφόσον ήδη από το 1907 ο β-λακταμικός δακτύλιος είχε παρασκευαστεί εργαστηριακά από τον Hermann Staudinger (Tidwell T. T., 2008).



Εικόνα 2: Εξέλιξη των χημειοθεραπευτικών αντιβακτηριακών παραγόντων. Α) Οι πρώτοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Η δομή της αρσφεναμίνης που δίνεται είναι η αναθεωρημένη (Lloyd, N. C. και συν., 2005). Δίνονται ενδεικτικά οι πρώτες σουλφοναμίδες με κλινική χρήση. Β) Πρωτότυπες εικόνες από την εργασία του A. Fleming για την πενικιλίνη. Διακρίνεται η λυτική ικανότητα του μύκητα *Penicillium* επί αποικιών *S. aureus* καθώς και ο βαθμός αναστολής που προκαλεί διήθημα καλλιέργειων του μύκητα επί της ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών. Γ) Η ομάδα της Οξφόρδης διαπίστωσε ότι η πενικιλίνη του Fleming αποτελούνταν από μείγμα μορίων που έφεραν συμπυκνωμένο σύστημα β-λακταμικού και δακτυλίου θειαζολιδίνης. Η ακυλίωση του συστήματος πενάμης εξαρτώνταν από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Δ) Δομή της φυσικής β-λακτάμης κεφαλοσπορίνης C που ανιχνεύθηκε ως προϊόν έκκρισης του μύκητα *Cephalosporium* από την ομάδα της Οξφόρδης.

Πίνακας 1: Κατηγορίες φυσικών αντιβιοτικών και μικροοργανισμοί στους οποίους ανιχνεύθηκαν αρχικά.

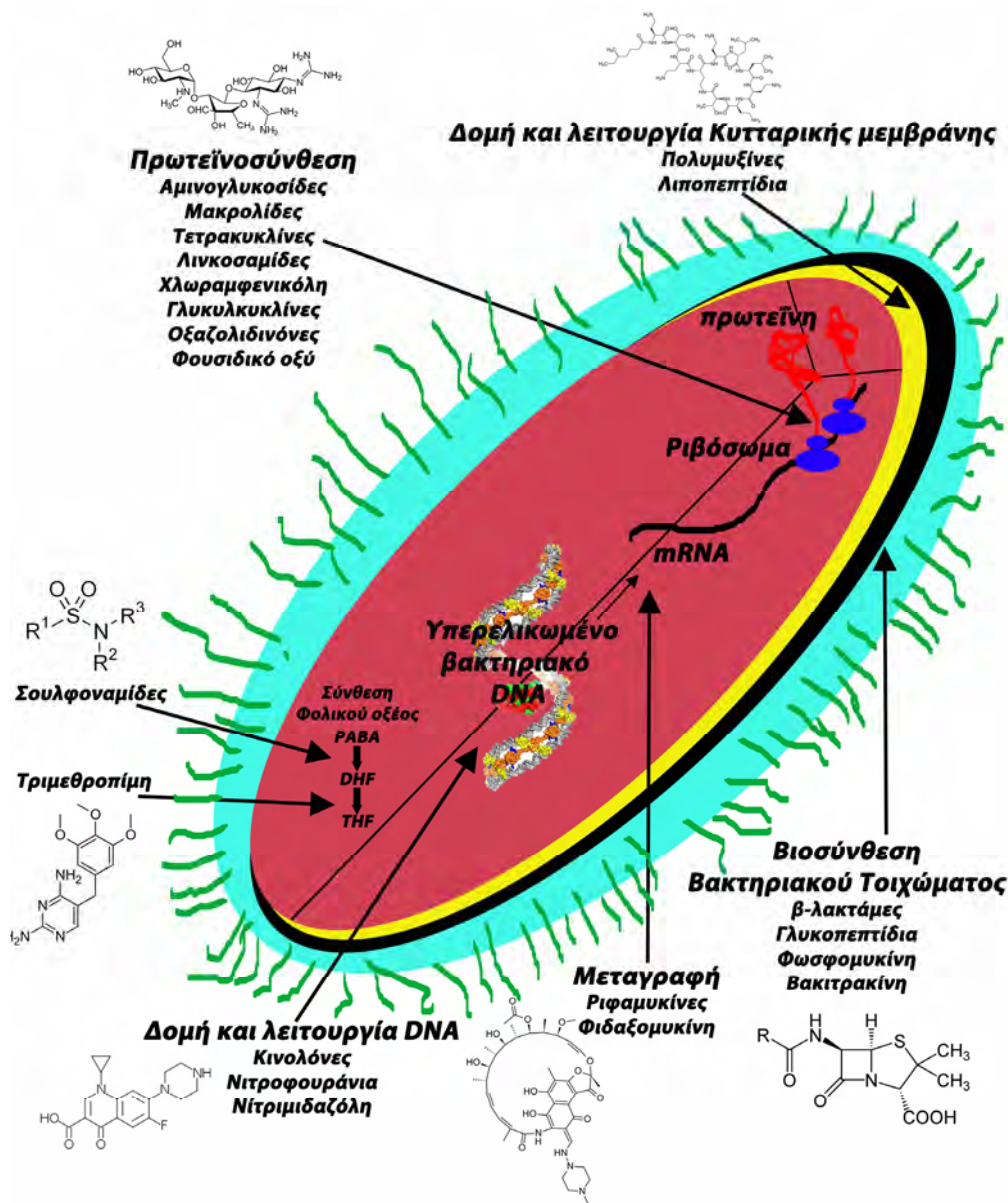
Αντιβιοτικό	Παραγωγός οργανισμός	Κατηγορία αντιβιοτικών	Έτος απομόνωσης	Αναφ.
Βενζυλπενικιλίνη	<i>Penicillium notatum</i>	β-λακτάμες/υδρόφοβες πενικιλίνες	1929/1942	Florey, 1949
Γκραμισιδίνη S	<i>Bacillus brevis</i>	πεπτιδία	1942	Gall και Konashev, 2001
Στρεπτομυκίνη	<i>Streptomyces griseus</i>	αμινογλυκοσίδες	1944	Comroe, 1978
Χλωρατετρακυκλίνη	<i>S. aureofaciens</i>	τετρακυκλίνες	1945	Jukes, 1985
Πενικιλίνη N	<i>Cephalosporium salmosynnematum</i>	β-λακτάμες/υδρόφιλες πενικιλίνες	1948/1952	Florey, 1955
Κεφαλοσπορίνη C	<i>C. salmosynnematum</i>	β-λακτάμες/κεφαλοσπορίνες	1948/1955	Newton και Abraham, 1955
Χλωραμφενικόλη	<i>S. venezuelae</i>	φαινύλ-προπανοειδή	1949	Bradley και Ritzi, 1968
Ερυθρομυκίνη	<i>S. erythreus</i> (σήμερα <i>Saccharopolyspora erythraea</i>)	μακρολίδες	1952	Oliyntyk και συν., 2007
Βανκομυκίνη	<i>Nocardia orientalis</i> (σήμερα <i>Amycolatopsis orientalis</i>)	γλυκοπεπτιδία	1955	Levine, 2006
Κολιστίνη (πολυμυξίνη E)	<i>Bacillus polymyxa</i> var. <i>Colistinus</i>	πολυμυξίνες (πεπτιδία)	1958	Shaheen και συν., 2011
Ρυφαμυκίνες (A, B, C, D, E, S, και SV)	<i>S. mediterranei</i> (σήμερα <i>A. mediterranei</i>)	ρυφαμυκίνες/ανσαμυκίνες	1958/1964	Margalith και Beretta, 1960
Λινκομυκίνη	<i>S. lincolnensis</i>	λινκοσαμίδες	1968	Spizek και Rezanka, 2004
Φωσφομυκίνη	<i>S. fradiae</i>	φωσφομυκίνη	1969	Silver, 2012
Κεφαμυκίνη C	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Nocardia</i> sp.	β-λακτάμες/κεφαμυκίνες	1971	Nagarajan και συν., 1971 και Stapley και συν., 1972
Κλαβουλανικό οξύ	<i>S. clavuligerus</i>	β-λακτάμες/κλαβάμες	1976	Brown και συν., 1976
Θειαναμυκίνη	<i>S. cattleya</i>	β-λακτάμες/καρβαπενέμες	1976	Kahan και συν., 1979
Νοκαρντισίνες	<i>N. uniformis</i> subsp <i>tsuyamanensis</i>	β-λακτάμες/μονοκυκλικές	1976	Aoki και συν., 1976
Μονοβακτάμες	<i>Gluconobacter</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Flexibacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	β-λακτάμες/μονοκυκλικές	1976	Sykes R. B. και συν., 1981

Οι μελέτες που αφορούσαν την πενικιλίνη εγκαινίασαν μία νέα περίοδο στη χημειοθεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων. Από την δεκαετία του 1940 και έπειτα έλαβε χώρα ένα "σαφάρι" για την απομόνωση περιβαλλοντικών μυκήτων και βακτηρίων που παρήγαγαν φυσικά προϊόντα με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Η αναζήτηση αυτή έδωσε γρήγορα αποτελέσματα και μία σειρά από νέες ομάδες αντιβιοτικών βρέθηκε ότι παράγονται από περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς (Πίνακας 1). Το φύλο των Ακτινοβακτηρίων (Gram θετικά βακτήρια με υψηλό ποσοστό G+C στο γονιδίωμά τους που αφθονούν στην φύση και ειδικά σε εδαφικά οικοσυστήματα), ήταν ο πρωταθλητής στην παραγωγή αντιβιοτικών με τις κυριότερες ομάδες χημειοθεραπευτικών παραγόντων

που χρησιμοποιούνται σήμερα να παράγονται από γένη του φύλου αυτού (π.χ. *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Ammycolatopsis* κ.α) ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού. Αρκετά από τα φυσικά αντιβιοτικά βελτιώνονταν περαιτέρω μέσω χημικής τροποποίησης της αρχικής δομής εφόσον εμφάνιζαν χαμηλή αντιβακτηριακή ισχύ ή περιορισμένο φάσμα δράσης (χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των κεφαλοσπορινών).

Σήμερα ο άνθρωπος έχει στην διάθεσή του μία πληθώρα αντιβιοτικών για την θεραπεία σχεδόν του συνόλου των βακτηριακών λοιμώξεων ενώ νέα αντιβιοτικά εισάγονται συνεχώς στην κλινική πράξη (τα τελευταία χρόνια με μειούμενο ρυθμό). Οι στρατηγικές ανεύρεσης νέων αντιβιοτικών βασίζονται σε αυτές που χρησιμοποίησαν οι πρωτοπόροι της χημειοθεραπείας ήτοι αναζήτηση φυσικών αντιβιοτικών, τροποποίησή τους μέσω μερικής σύνθεσης χρησιμοποιώντας ως μήτρα τη δομή του φυσικού μορίου ή ολική σύνθεση χημικών ουσιών και δοκιμές για την εύρεση αυτών που θα παρουσιάζουν βέλτιστες θεραπευτικές ιδιότητες (η μέθοδος αυτή έπειτα από τις σουλφοναμίδες έδωσε και άλλες επιτυχίες όπως είναι οι κινολόνες και οι οξαζολιδινόνες). Αρκετές από τις ομάδες αντιβιοτικών εμφανίζουν περιορισμένη ή αμελητέα τοξικότητα αλληλεπιδρώντας και αναστέλλοντας ειδικά τα βακτηριακά κύτταρα μη επιδρώντας στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού στις συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την δράση τους (έχουν δηλαδή τα χαρακτηριστικά της "μαγικής σφαίρας" του ειδικού χημειοθεραπευτικού παράγοντα όπως τον οραματίστηκε ο Ehrlich). Η ειδική δράση των αντιβιοτικών οφείλεται στο ότι στοχεύουν φυσιολογικές διεργασίες του βακτηριακού κυττάρου οι οποίες είτε δεν απαντούν στα ανθρώπινα κύτταρα (π.χ. βακτηριακό τοίχωμα) είτε απαντούν αλλά τα μόρια που τις επιτελούν και ο μηχανισμός που τις χαρακτηρίζει διαφέρουν σημαντικά από τα αντίστοιχα βακτηριακά (πχ υπερέλιξη DNA, μεταγραφή, μετάφραση κτλ). Στην Εικόνα 3 αναφέρονται οι κύριες κατηγορίες αντιβιοτικών και οι διεργασίες που στοχεύουν.

Η αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία αποτελεί ίσως τον σημαντικότερο λόγο (μαζί με τα εμβόλια) για την βελτίωση της υγείας των ανθρώπινων πληθυσμών τον 20^ο αιώνα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ενώ το 1900 οι θάνατοι από λοιμώδη νοσήματα ανέρχονταν στους 797 ανά 100.000 κατοίκους το 1980 είχαν μειωθεί στους 36 ανά 100.000 κατοίκους (Walsh C. και Wright G., 2005). Τα οφέλη όμως που αποκομίσαμε βρίσκονται



Εικόνα 3: Οι κύριες ομάδες αντιβιοτικών και οι διεργασίες του βακτηριακού κυττάρου που στοχεύονται από αυτές. Δίνονται ενδεικτικά κάποιες δομές για τα αντιβιοτικά που παρεμβάλλονται σε κάθε διαδικασία. Βιοσύνθεση βακτηριακού τοιχώματος: πενικιλίνες (β-λακτάμες). Μεταγραφή: ρυφαμυκίνη (ρυφαμυκίνη). Δομή και λειτουργία DNA: Σιπροφλοξακίνη (φθοριοκινολόνη). Πρωτεϊνοσύνθεση: στρεπτομυκίνη (αμινογλυκοσίδη). Δομή και λειτουργία κυτταρικής μεμβράνης: Κολιστίνη (πολυμυξίνη). Κατά τη βιοσύνθεση του φολικού οξέος οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν τη μετατροπή του πάρα-άμινο-βενζοϊκού οξέος (PABA) σε δι-υδροφολικό (DHF) και η τριμεθροπίμη τη μετατροπή αυτού σε τέτρα-υδροφολικό (THF).

εν κινδύνω καθώς τα βακτήρια εξαιτίας των αυξημένων ρυθμών εξέλιξης που εμφανίζουν έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής καθιστώντας τη θεραπεία ορισμένων λοιμώξεων αδύνατη με την χρήση των κλινικά διαθέσιμων αντιβιοτικών. Ανθεκτικά

στελέχη αναπτύχθηκαν αρχικά στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα όπου η έκθεση των βακτηρίων σε αυτούς τους παράγοντες είναι αυξημένη με αποτέλεσμα να επιταχύνονται οι διαδικασίες επιλογής. Τα ανθεκτικά νοσοκομειακά στελέχη αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους κινδύνους για την δημόσια υγεία καθώς δεν αναστέλλονται ακόμα και από τα νεότερα αντιβιοτικά. Άλλα ενδιαιτήματα που ευνοούν την επιλογή ανθεκτικών στελεχών είναι οι μεγάλες κτηνοτροφικές μονάδες όπου και εκεί τα τελευταία χρόνια η χρήση αντιβιοτικών είναι εκτεταμένη. Σε αρκετές περιπτώσεις η ανοχή αυτή έχει διασπαρεί και σε περιβάλλοντα όπου δεν απαντούν αντιβιοτικά με αποτέλεσμα να απομονώνονται από ασθενείς τις κοινότητας ανθεκτικά βακτήρια με αυξανόμενους ρυθμούς (Gootz, T. D., 2010).

Αρκετά βακτήρια εμφανίζουν φυσική ανοχή έναντι συγκεκριμένων ομάδων αντιβιοτικών (αναφέρθηκε ήδη το παράδειγμα της ανοχής των Gram αρνητικών στις υδρόφοβες πεινικιλίνες) ενώ μέσω επίκτητων μηχανισμών μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα έναντι επιπλέον παραγόντων. Οι επίκτητοι μηχανισμοί ανοχής ενδέχεται να αφορούν μεταλλάξεις στο βακτηριακό χρωμόσωμα οι οποίες οδηγούν: α) σε τροποποίηση του μορίου στόχου του αντιβιοτικού ώστε να παρακάμπτεται η ανασταλτική δράση, β) σε μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης με αποτέλεσμα την αδυναμία εισόδου του αντιβιοτικού στο κύτταρο, γ) την αύξηση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που απενεργοποιούν το αντιβιοτικό και δ) την αύξηση της παραγωγής αντλιών ενεργού μεταφοράς που διαμεσολαβούν την έκκριση του αντιβιοτικού από το βακτήριο ενάντια στην κλίση συγκέντρωσης. Επίσης επίκτητη ανοχή επιτυγχάνεται και μέσω πρόσληψης γονιδίων στο γενετικό υλικό του βακτηρίου που δεν απαντούν στον ευαίσθητο πληθυσμό και συνήθως κωδικοποιούν για α) απενεργοποιητικά ένζυμα, β) πρωτεΐνες που αντικαθιστούν την λειτουργία του μορίου στόχου και δεν αναστέλλονται από το αντιβιοτικό και γ) αντλίες ενεργού μεταφοράς (Nikaido H., 2009). Τα γονίδια ανοχής προέρχονται συνήθως από περιβαλλοντικά βακτήρια (Martinez J. L., 2009; Wellington E. M. και συν., 2013) και η ύπαρξη τους οφείλεται στο γεγονός ότι ήδη τα στελέχη αυτά έχουν έρθει σε επαφή με φυσικά αντιβιοτικά που παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς πολύ πριν τα χρησιμοποιήσει ο άνθρωπος (π.χ. "εξελικτικά ρολόγια" τοποθετούν την εμφάνιση των β-λακταμικών αντιβιοτικών τουλάχιστον πριν από 370 εκατ. χρόνια; Weigel B. J. και συν., 1988). Η

μετακίνηση των γονιδίων αντοχής από ανθεκτικά σε ευαίσθητα στελέχη διαμεσολαμβάνεται συνήθως μέσω κινητών γενετικών στοιχείων (τρανσποζόνια, ιντεργκρόνια). (Rowe-Magnus D. A. και Mazel D., 2002).

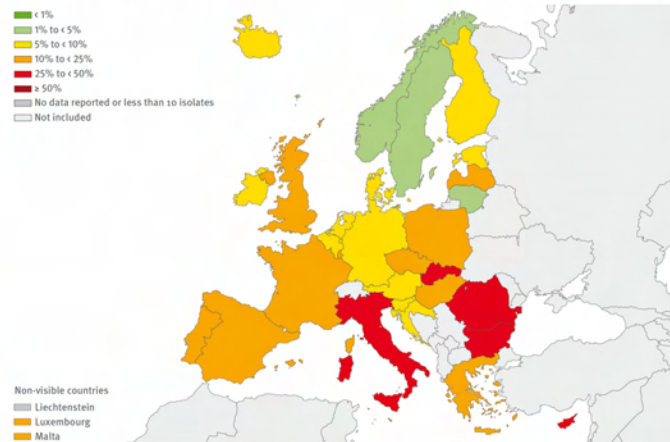
Η αντοχή έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών αποτελεί ίσως την πιο σημαντική παράμετρο του προβλήματος. Αρκετοί αντιπρόσωποι της ομάδας αυτής αναστέλλουν ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων ενώ παράλληλα εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα και βέλτιστες φαρμακοκινητικές/φαρμακοδυναμικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να αποτελούν νούμερο ένα επιλογή για τη θεραπεία αρκετών λοιμώξεων. Η σημασία των β-λακταμών αποτυπώνεται στο ότι επτά από τα δέκα περισσότερο συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά ανήκουν σε αυτή την κατηγορία (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η καθιέρωση των πενικιλινών στην κλινική πράξη συνοδεύτηκε πολύ γρήγορα από την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών σταφυλοκόκκων. Ήδη από την δεκαετία του 1950 στον σταφυλοκοκκικό πληθυσμό είχαν επιλεγεί στελέχη που παρήγαγαν ένα απενεργοποιητικό ένζυμο των πενικιλινών (Hunwicke R. F., 1946; Martin R. και συν., 1951). Το απενεργοποιητικό αυτό ένζυμο κατέλυε την υδρόλυση του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού δακτυλίου και ονομάστηκε β-λακταμάση (αρχικά πενικιλινάση). Η σταφυλοκοκκική αντοχή εξαιτίας της παραγωγής πενικιλινάσης έδειχνε ότι υπήρχε η ανάγκη για ένα β-λακταμικό που δε θα υδρολύονταν από το ένζυμο αυτό. Ένα τέτοιο μόριο ήταν η κεφαλοσπορίνη C η οποία είχε βρεθεί ότι παράγεται από τον μύκητα *Cephalosporium salmosynnematum* (Newton G. G. F. και Abraham E. P., 1955). Η κεφαλοσπορίνη C (Εικόνα 2Δ) έφερε πολλά από τα δομικά χαρακτηριστικά των πενικιλινών, όπως ένα συμπυκνωμένο β-λακταμικό δακτύλιο (σε αυτή την περίπτωση με έναν δακτύλιο διυδροθειαζίνης) και μία ακυλωμένη αμινομάδα στη θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου (αντίστοιχη με τη θέση 6 των πενικιλινών) είχε όμως πολύ περιορισμένη αντιβακτηριακή ισχύ. Μέσω μερικής σύνθεσης όμως παρήχθησαν μόρια με βελτιωμένες ιδιότητες οι οποίες σήμερα συλλογικά ονομάζονται κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς. Στο μετέπειτα διάστημα οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες τροποποιούνταν περαιτέρω με σκοπό την αύξηση του φάσματος δράσης, την αντιμετώπιση της αντοχής που εξακολουθούσε να αναπτύσσεται και τη βελτίωση φαρμακολογικών παραμέτρων (πενικιλίνες εκτεταμένου φάσματος, κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενεάς κ.α.). Το ενδιαφέρον για τις β-λακτάμες πήρε νέα

ώθηση στις αρχές της δεκαετίας του 1970 όταν τα εργαστήρια της Merck ανακοίνωσαν την αρχικά αιρετική άποψη ότι β-λακταμικά παράγονται και από βακτήρια (Nagarajan R. και συν., 1971). Η νέα προσέγγιση οδήγησε στην ανακάλυψη νέων κατηγοριών β-λακταμών όπως οι κεφαμυκίνες, οι μονοβακτάμες, οι νοκαρντισίνες, οι καρβαπενέμες και το κλαβουλανικό οξύ. Με την εξαίρεση των νοκαρντισινών οι παραπάνω ομάδες βρήκαν το δρόμο τους προς την κλινική πράξη και μέσω της διαδικασίας χημικής τροποποίησης έδωσαν νέα ισχυρά αντιβιοτικά.

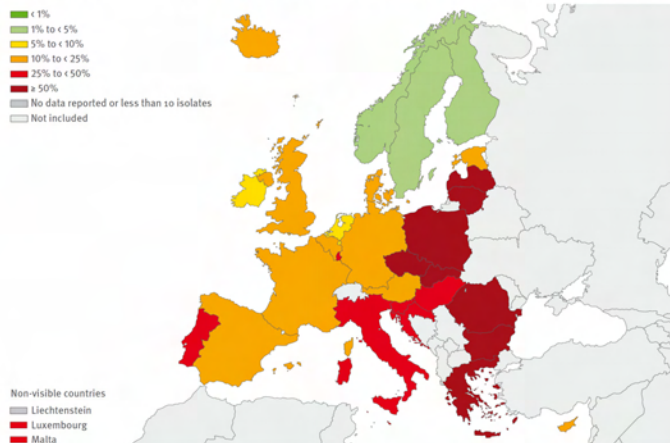
Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων έχουν ουσιαστικά αλλάξει την οικολογία του ανθρώπου εφόσον πλέον θάνατοι από λοιμώξεις καταγράφονται κυρίως σε πληθυσμιακές ομάδες με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (είτε λόγω ηλικίας είτε λόγω υποκείμενου νοσήματος) που έχουν προσβληθεί από ανθεκτικά βακτήρια. Το ενδιαίτημα που αυτοί οι δύο παράγοντες συνυπάρχουν συνήθως είναι το νοσοκομειακό περιβάλλον. Οι ενδοσκομειακές λοιμώξεις σήμερα προκαλούνται κυρίως από Gram αρνητικά βακτήρια με τις περισσότερες να προκαλούνται από Εντεροβακτήρια και τα μη-ζυμωτικά γ-πρωτεοβακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*. Η αντοχή στα β-λακταμικά των στελεχών αυτών και κυρίως των εντεροβακτηριακών διαμεσολαβείται από την παραγωγή β-λακταμασών. Έχουν περιγραφεί τέσσερις διακριτές τάξεις τέτοιων ενζύμων διαφέροντας στο μηχανισμό κατάλυσης (β-λακταμάσες μοριακών τάξεων A, B, C και D) (Hall B. G. και Barlow M., 2005; Tzouveleki L. S. και Bonomo R. A., 1999; Cricco J. A. και Vila A. J., 1999; Jacoby G. A., 2009; Naas T. και Nordmann P. 1999). Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν διάφορες ειδικότητες ως προς την υδρόλυση β-λακταμικών αλλά μέσω διαδικασιών επιλογής μεταλλαγμένες μορφές αποκτούν νέες ενεργότητες απενεργοποιώντας νέα αντιβιοτικά. Επίσης η εκτεταμένη χρήση νέων αντιβιοτικών ενδέχεται να επιλέξει βακτήρια στα οποία έχουν μεταφερθεί γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για β-λακταμάσες που ήδη έχουν αυξημένη ενεργότητα έναντι αυτών. Η διασπορά τόσο των μεταλλαγμένων γονιδίων όσο και των γονιδίων νέου τύπου β-λακταμασών επιτυγχάνεται μέσω των μηχανισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω και έχει οδηγήσει σε αρκετές περιπτώσεις στην επιλογή νοσοκομειακών στελεχών στα οποία παράγονται ένζυμα τα οποία υδρολύουν το σύνολο των β-λακταμικών. Σε συνδυασμό με την συσσώρευση μηχανισμών αντοχής σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών αρκετά από τα

ενδονοσοκομειακά στελέχη δεν αναστέλλονται πλέον από κανένα κλινικά διαθέσιμο φάρμακο (πολυανθεκτικά στελέχη). Οι β-λακταμάσες που υδρολύουν νέας γενιάς κεφαλοσπορίνες ή/και καρβαπενέμες έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία καθώς τα αντιβιοτικά αυτά και ειδικά οι καρβαπενέμες αποτελούν φάρμακα τελευταίας γραμμής (Knox J. R., 1995; Queenan A. M. και Bush K., 2007). Η αντοχή σε αυτά έχει αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό αποτελώντας κίνδυνο για την δημόσια υγεία (Εικόνα 4). Η κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας αυτών των ενζύμων είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό νέων β-λακταμών που δε θα υδρολύονται από αυτά και αναστολέων που θα παρεμποδίζουν την δράση τους.

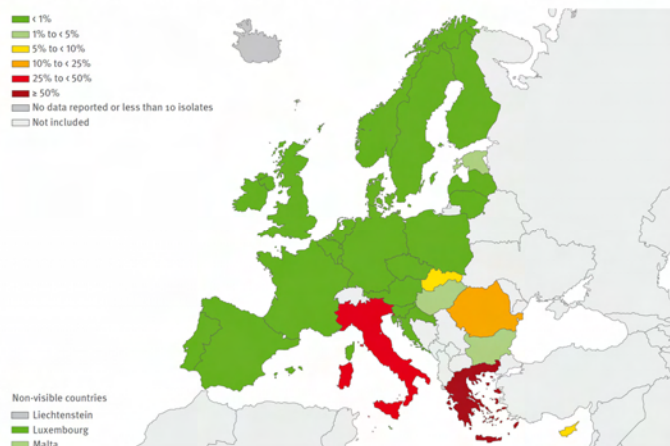
Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3ης γενεάς κλινικών στελεχών *E. coli*



Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3ης γενεάς κλινικών στελεχών *K. pneumoniae*



Αντοχή στις καρβαπενέμες κλινικών στελεχών *K. pneumoniae*



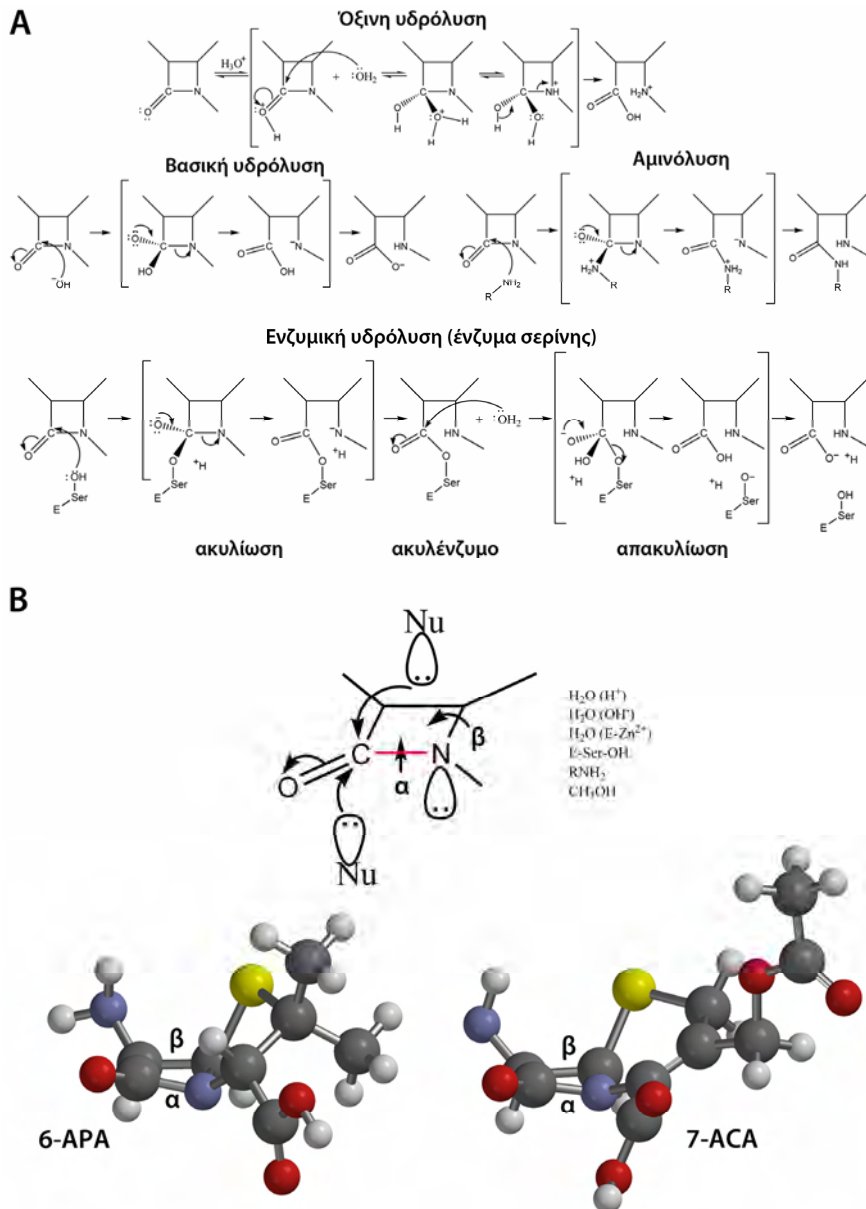
Εικόνα 4: Ποσοστά αντοχής Εντεροβακτηριακών στελεχών *E. coli* και *K. pneumoniae* έναντι κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς και καρβαπενεμών σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως προκύπτουν από την έκθεση του δικτύου EARS-NET για το 2012.

2. β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ: ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

A. Ο β-λακταμικός δακτύλιος

Λακτάμες ονομάζονται οι κυκλικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν αμιδικό δεσμό και στην περίπτωση που ο δακτύλιος αποτελείται από τέσσερα άτομα (2-αζετιδινόνη) ονομάζεται β-λακταμικός. Ο δακτύλιος αυτός είναι απαραίτητος για τη βιολογική των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Ο αμιδικός δεσμός του β-λακταμικού δακτυλίου μπορεί να συμμετάσχει σε τυπικές αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης όπως είναι η από οξύ ή από βάση καταλυόμενη υδρόλυση, η αμινόλυση από πρωτοταγείς αμίνες, η μεθανόλυση κ.α. (Εικόνα 5A) (Page M. I., 1984; Massova I. και Kollman P. A., 1999). Η ενζυμική υδρόλυσή του καταλύεται από τις β-λακταμάσες (Εικόνα 5A). Ένζυμα με αυτή την ενεργότητα χρησιμοποιούν είτε σερίνη (β-λακταμάσες των τάξεων A, C και D) είτε κατιόντα Zn^{2+} (β-λακταμάσες τάξης B ή μέταλλο-β-λακταμάσες) για να διασπάσουν τον β-λακταμικό δακτύλιο. Όσον αφορά τις β-λακταμάσες σερίνης η αντίδραση συμβαίνει σε δύο στάδια (μηχανισμός διπλής μετατόπισης). Αρχικά το ενεργοποιημένο καταλυτικό αμινοξύ ακυλιώνεται από το καρβονύλιο του β-λακταμικού δακτυλίου και στο τετραεδρικό ανιόν της κατάστασης μετάπτωσης ο αμιδικός δεσμός διασπάται μέσω μετατόπισης ηλεκτρονίων από το οξυγόνο του ανιόντος στον άνθρακα και έλξης των ηλεκτρονίων του δεσμού από το αζώτο (αποχωρούσα ομάδα) που πρωτονιώνεται από κάποιο κατάλοιπο το ενεργού κέντρου (αντίδραση ακυλίωσης, Εικόνα 5A). Το ομοιοπολικό σύμπλοκο β-λακταμικού ενζύμου στην συνέχεια υδρολύεται από ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού με τον σχηματισμό νέου τετραεδρικού ενδιάμεσου υψηλής ενέργειας (αντίδραση απακυλίωσης, Εικόνα 5A) (Galleni M. και συν., 1995; Curley K. και Pratt R. F., 2000). Ο μηχανισμός υδρόλυσης από μέταλλο-B-λακταμάσες γενικά θεωρείται ότι συμβαίνει σε ένα στάδιο με τον καταλυτικό ψευδράγγυρο να λειτουργεί ως οξύ κατά Lewis ενεργοποιώντας ένα μόριο νερού το οποίο συμπεριφέρεται σαν υδροξυανιόν σε μία αντίδραση που μοιάζει με την βασική υδρόλυση (Crizzo J. A. και Vila A. J., 1999; Rasia, R. M. και Vila A. J., 1999). Στην ακυλίωση καταλυτικών σερινών οφείλεται και η βιολογική δράση των β-λακταμικών επί των πρωτεϊνών στόχων τους με την διαφορά ότι τα ακύλ-ένζυμα που δημιουργούνται είναι σταθερά με

αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των πρωτεϊνών αυτών (Massova I. και Kollman P. A., 2002; Zang W. και συν, 2007).



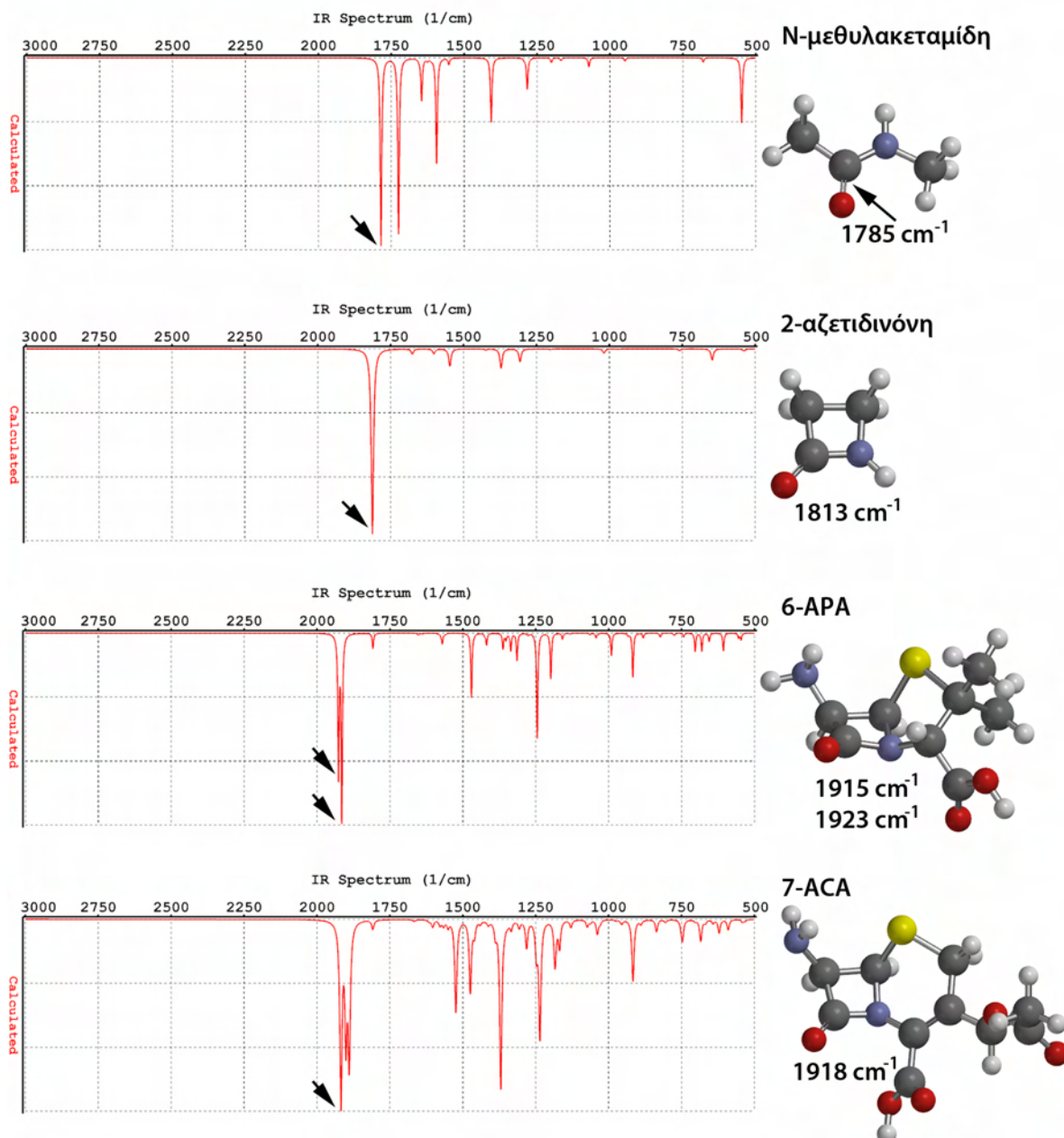
Εικόνα 5: Α) Μηχανισμοί αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει ο αμιδικός δεσμός του β-λακταμικού δακτυλίου. Οι μέταλλο-β-λακταμάσες παρουσιάζουν μηχανισμό παρόμοιο με τη βασική υδρόλυση. Η πρωτονίωση του αζώτου της αποχωρούσας ομάδας στις ρίζες μετάπτωσης γίνεται με διαφορετικό τρόπο σε κάθε μηχανισμό με το στάδιο αυτό να θεωρείται περιοριστικό. Β) Η πυρηνόφιλη επίθεση στον άνθρακα του αμιδικού δεσμού στα β-λακταμικά δεν γίνεται από την β-επιφάνεια όπως προϋποθέτει ο στεreoχημικός έλεγχος αλλά από την α καθώς η πρώτη παρεμποδίζεται από τον συμπυκνωμένο δακτύλιο. Στις κεφαλοσπορίνες λόγω της περισσότερης επίπεδης συμμετρίας του αζώτου (7-ACA) υπάρχει δυνατότητα προσέγγισης των πυρηνόφιλων και από τη β-επιφάνεια. Οι δομές του 6-άμινο-πενικιλινικού οξέος (6-ACA) και του 7-άμινο-κεφαλοσπορινικού οξέος (7-ACA) προέκυψαν με ελαχιστοποίηση ενέργειας στο HF/6-31G* επίπεδο της θεωρίας μοριακών τροχιακών με το λογισμικό Spartan.

Η προσέγγιση της πυρηνόφιλης ομάδας στον αμιδικό δεσμό κατά τις παραπάνω προσθήκες φαίνεται να γίνεται από την α επιφάνεια του δακτυλίου αζετιδινόνης και όχι από την β όπως προϋποθέτει ο στερεοηλεκτρονικός έλεγχος των χημικών αντιδράσεων ώστε το τροχιακό του μη-δεσμικού ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου να μην παρεμποδίζει την προσέγγιση του τροχιακού του πυρηνόφιλου ατόμου (Εικόνα 5B) (Page M. I., 1992). Αυτό έχει υποθεθεί ότι συμβαίνει λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης της πρόσβασης στην β επιφάνεια από το συμπυκνωμένο σύστημα δακτυλίων των β-λακταμικών (Εικόνα 5B). Οι κεφαλοσπορίνες εξαιτίας του πιο επίπεδου δικυκλικού συστήματος επιτρέπουν την προσέγγιση των πυρηνόφιλων και από την β-επιφάνεια και αυτό αντανακλάται από την αμινόλυση που υφίστανται όταν στο μόριο υπάρχει πρωτοταγής αμίνη (Εικόνα 5B) (Tsuji A. και συν., 1981). Παρ' όλα αυτά είναι κοινά αποδεκτό ότι κατά την ακυλίωση των ενζύμων σερίνης από β-λακταμικά η πυρηνόφιλη προσθήκη γίνεται από την α επιφάνεια του β-λακταμικού δακτυλίου (Massova I. και Kollman P. A., 1999).

Έχει προταθεί ότι η υψηλή αντιδραστικότητα των β-λακταμικών σε υδρολυτικά περιβάλλοντα οφείλεται στη γεωμετρία του β-λακταμικού δακτυλίου που καθιστά τον αμιδικό δεσμό σχετικά ασταθή. Η ενεργειακά πιο σταθερή τοποθέτηση των ατόμων που ενώνονται με τον άνθρακα του καρβονυλίου (N και C4) προϋποθέτει η μεταξύ τους γωνία να είναι περίπου 120° ώστε να επιτυγχάνεται βέλτιστη επικάλυψη τροχιακών. Στον β-λακταμικό δακτύλιο όμως η γωνία αυτή είναι 90° εξαιτίας των περιορισμών που τίθενται από τα μήκη των δεσμών των τεσσάρων ατόμων. Οι άλλοι δύο άνθρακες του δακτυλίου όπως και το άζωτο απέχουν επίσης από την διαμόρφωση ισορροπίας (109° και 117° αντίστοιχα). Αυτή η απόκλιση από την ιδανική γεωμετρία ονομάζεται γωνιακή τάση ή τάση Baeyer (Εικόνα 6) (Page M. I., 1984; McMurry J., 1999).

Η ύπαρξη συμπυκνωμένου συστήματος δακτυλίων όπως παρατηρείται στα δικυκλικά β-λακταμικά (π.χ. πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες) έχει προταθεί ότι αποσταθεροποιεί περαιτέρω τον β-λακταμικό δακτύλιο (Massova I. και Kollman P. A., 1999). Αυτό φαίνεται να συμβαίνει εξαιτίας της πυραμιδικής γεωμετρίας που αναγκάζεται να αποκτήσει το άτομο του αζώτου του αμιδικού δεσμού υπό την επίδραση της γωνιακής τάσης του β-λακταμικού δακτυλίου και την επίπεδη διαμόρφωση του κάθε δακτυλίου στον οποίο ανήκει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μη-δεσμικό ζεύγος

ηλεκτρονίων του αζώτου να μην συμμετέχει σε π τροχιακά στον ίδιο βαθμό με αυτόν που θα παρατηρούνταν σε έναν κανονικό αμιδικό δεσμό (απαιτείται τριγωνική συμμετρία).



Εικόνα 6: Θεωρητικά φάσματα IR μορίων με αμιδικό δεσμό που προέκυψαν από προσομοιώσεις QM στο HF/6-31G* επίπεδο της θεωρίας μοριακών τροχιακών. Τα β-λακταμικά προσομοιώθηκαν με το C3/C4 καρβοξύλιο πρωτονιωμένο. Παρατηρούμε ότι κυκλοποίηση της N-ακετυλαμίδης ώστε να δώσει το πιο απλό β-λακταμικό 2-αζετιδινόνη προκαλεί αύξηση στην συχνότητα δόνησης του καρβonyλίου το οποίο οφείλεται στην γωνιακή τάση. Συμπύκνωση του β-λακταμικού με άλλο δακτύλιο στα β-λακταμικά αντιβιοτικά επάγει αύξηση της ενέργειας του καρβonyλίου. Οι δονήσεις όμως αυτές δεν εξαρτώνται από την πυραμιδικότητα της συμμετρίας του αζώτου του αμιδικού δεσμού καθώς πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες (περισσότερο τριγωνική συμμετρία) εμφανίζουν τον ίδιο βαθμό ενεργοποίησης του καρβonyλίου τους.

Το αποτέλεσμα είναι ο δεσμός C-N να χάνει το χαρακτήρα διπλού δεσμού και το καρβονύλιο να είναι πιο δεκτικό σε πυρηνόφιλη προσθήκη καθώς μειώνεται η σταθεροποιητική επίδραση του συντονισμού του αμιδικού δεσμού (Johnson, J. R. και συν., 1949; Nangia A. και συν., 1996). Η πυραμιδική γεωμετρία είναι έντονη στις πενικιλίνες αλλά όχι στις κεφαλοσπορίνες στις οποίες το άζωτο έχει πιο επίπεδη διαμόρφωση και άρα η παραπάνω αιτιολόγηση δεν μπορεί να εξηγήσει το γεγονός ότι ο αμιδικός δεσμός στα δύο β-λακταμικά εμφανίζει τον ίδιο βαθμό αστάθειας (εκτιμώμενος βάσει της συχνότητας δόνησης του καρβονυλίου, Εικόνα 6; Nishikawa J. και Tori K., 1984; Van Krimpen P. C. και συν., 1987). Έτσι έχει προταθεί ότι η απόκλιση από την γεωμετρία ισορροπίας οδηγεί σε αλλαγές στον όξινο χαρακτήρα του καρβονυλίου και στον βασικό χαρακτήρα της αμίνης που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή αντιδραστικότητα του β-λακταμικού δακτυλίου (Proctor P. και συν., 1982; Massova I. και Kollman P. A., 1999).

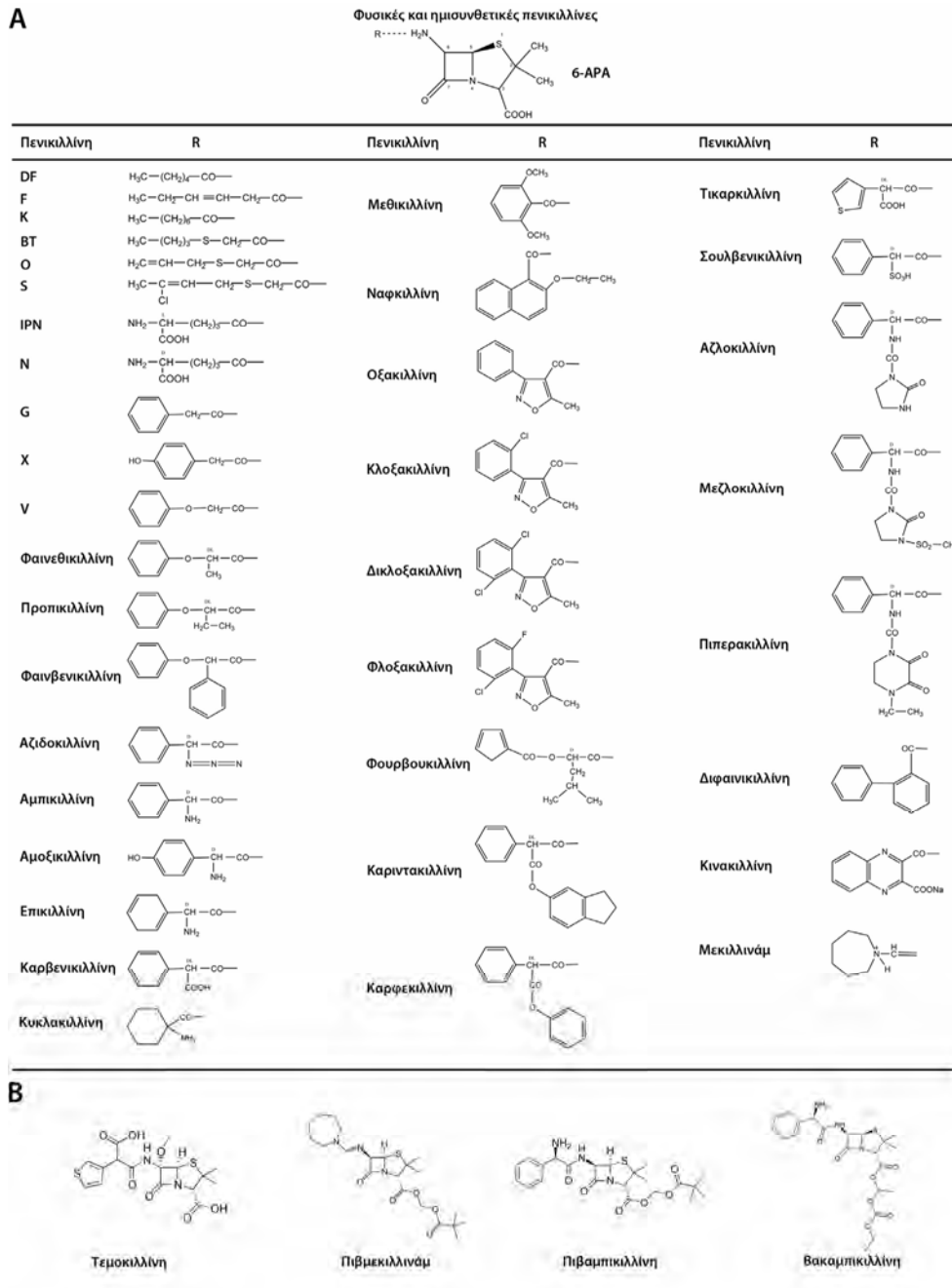
Τα παραπάνω χαρακτηριστικά τα έχουν εκμεταλλευτεί τόσο η φύση όσο και ο άνθρωπος για να δημιουργήσουν μία σειρά από βιοδραστικά μόρια τα σημαντικότερα από τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

B. Δομές β-λακταμικών αντιβιοτικών

i. Πενικιλίνες

Οι πενικιλίνες αποτελούν μία από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες β-λακταμικών. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η δομή τους χαρακτηρίζεται από τους συμπυκνωμένους δακτυλίους β-λακτάμης και θειαζολιδίνης οι οποίες απαρτίζουν το σύστημα της πενάμης. Στη θέση 6 του συστήματος πενάμης υπάρχει μία αμινομάδα η οποία ακυλιώνεται από διάφορα παράγωγα οργανικών οξέων. Κατά την παραγωγή πενικιλινών με ζύμωση μυκήτων η υποκατάσταση στην αμινομάδα εξαρτάται από τους ακυλιωτικούς παράγοντες που βρίσκονται διαθέσιμοι στο θρεπτικό υλικό. Έτσι όταν το θρεπτικό υλικό δεν είναι εμπλουτισμένο με κάποιο συγκεκριμένο ακυλιωτικό παράγοντα προκύπτει μείγμα πενικιλινών που έφεραν διάφορες υποκαταστάσεις (Εικόνα 7A, πενικιλίνες DF, F, K, BT, O, S) ενώ όταν αυξάνονταν η σχετική συγκέντρωση συγκεκριμένων πρόδρομων ενώσεων παράγεται ένας τύπος πενικιλίνης (Εικόνα 7A, πενικιλίνες G, X, V) (Luengo J. M., 1995). Παράλληλα όταν η σύσταση του θρεπτικού

υλικού είχε ρυθμιστεί έτσι ώστε να είναι περιορισμένη η ποσότητα ακυλιωτικών παραγόντων στο υλικό καλλιέργειας συσσωρεύονταν μία πενικιλίνη που δεν έφερε άκυλο υποκατάσταση και αντιστοιχούσε στο 6-άμινο-πενικιλανικό οξύ (6-APA, Εικόνα 7; Demain A. L. και Elander, R. P., 1999).



Εικόνα 7: Α) Δομές φυσικών και ημισυνθετικών πενικιλινών. Β) Ημισυνθετικές πενικιλίνες με βελτιωμένες ιδιότητες. Η τεμοκιλίνη παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υδρόλυση από β-λακταμάσες λόγω της 7α-μέθοξυ υποκατάστασης ενώ εστεροποίηση του καρβοξυλίου του συστήματος πενάμης αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα σε χορήγηση από το στόμα.

Το 6-APA αποτέλεσε την πρόδρομη ένωση για την ελεγχόμενη παραγωγή πενικιλινών με *in vitro* ακυλίωση. Μία σειρά από ημισυνθετικές πενικιλίνες παρήχθησαν με αυτό τον τρόπο (Εικόνα 7Α, φαινεθικιλίνη, προπικιλίνη, φαινβενικιλίνη, αζιδοκιλίνη). Τα παραπάνω μόρια, τα οποία συγκαταλέγονται στις υδρόφοβες πενικιλίνες, εξακολουθούσαν να είναι ενεργά έναντι σταφυλοκόκκων και άλλων Gram θετικών δεν είχαν όμως δράση έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων (εκτός από τα *Neisseria* sp.) (Manten A. και Schot P. K., 1965; Lynn B., 1965; Bengtsson E., 1972).

Υδρόφιλες πενικιλίνες βρέθηκε ότι παράγονταν από έναν άλλο μύκητα που ανήκε στο γένος *Cephalosporium*. Ο μύκητας αυτός είχε απομονωθεί από τον Brotzu στην Σαρδηνία το 1948 και εμφάνιζε φυσική αντιβίωση αλλά χωρίς να καταφέρει να απομονώσει τον αντιβακτηριακό παράγοντα έστειλε το στέλεχος στον Florey (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999) . Η ομάδα της Οξφόρδης διαπίστωσε ότι ο μύκητας (*C. salmosynnematum*) παράγει μείγμα αντιβιοτικών που αποτελείται από τρία συστατικά τα οποία ονόμασαν κεφαλοσπορίνες P, N και C. Η κεφαλοσπορίνη P βρέθηκε ότι ήταν στεροειδούς φύσης και η κεφαλοσπορίνη C όπως αναφέρθηκε είναι β-λακταμικό που διαφέρει από τις πενικιλίνες ως προς τον συζευγμένο δακτύλιο. Η κεφαλοσπορίνη N όμως είχε τη δομή πενικιλίνης (πενικιλίνη N) και διέφερε από τις μέχρι τότε χαρακτηρισμένες ως προς το ότι έφερε υδρόφιλη άκυλο-υποκατάσταση (D-4-άμινο-4-κάρβοξυ-ε-βουτύλ) (Abraham E. P. και συν., 1955, Florey H. W., 1955). Η πενικιλίνη N είχε περίπου το 1% της ενεργότητας της βενζυλπενικιλίνης έναντι των Gram θετικών αλλά εμφάνιζε υψηλότερη ενεργότητα κατά των Gram αρνητικών (Florey H. W., 1955). Η πενικιλίνη N είναι το οπτικό ισομερές της ισοπενικιλίνης N (Εικόνα 7Α, πενικιλίνη IPN) η οποία αποτελεί κεντρικό μόριο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι πενικιλινών και κεφαλοσπορινών (Εικόνα 8; Martin J. F. και Gutierrez S., 1996; Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η πενικιλίνη N δεν χρησιμοποιήθηκε ποτέ για θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, η ανακάλυψή της οδήγησε στην ανάπτυξη ημισυνθετικών πενικιλινών με διευρυμένο φάσμα δράσης αναστέλλοντας ισχυρά και Gram αρνητικά βακτήρια .

Σε αυτές συγκαταλέγονται οι άμινο-πενικιλίνες αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη και επικιλίνη (Εικόνα 7Α) η οποίες φέρουν μία αμινομάδα στη θέση α η οποία μπορεί να

πρωτονιωθεί αυξάνοντας την είσοδο μέσω των πορινών της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών (Wright A. J. και Wilkowske C. J., 1987). Επίσης αυτή η πρωτονίωση τις καθιστάε πιο σταθερές στις όξινες συνθήκες του στομάχου που είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό για χορήγηση από το στόμα (Nathwani D. και Wood M. J., 1993). Υποκατάσταση καρβοξυλομάδας ή άλλης όξινης ομάδας στη θέση α ως προς το καρβονύλιο της R αλυσίδας έδωσε αντιβιοτικά εκτεταμένου φάσματος με ισχυρή αντι-ψευδομοναδική δράση όπως η καρβενικιλίνη (και τα πρόδρομα φάρμακα αυτής καριντακιλλίνη και καρφεκιλλίνη), η τικαρκιλίνη και η σουλβενικιλίνη (Εικόνα 7Α) τα οποία όμως δεν έχουν ισχυρή δράση έναντι Gram θετικών (Nathwani D. και Wood M. J., 1993). Περαιτέρω τροποποίηση των αμινο-πενικιλινών έδωσε τις ουρεϊδοπενικιλίνες αζλοκιλλίνη, μεζλοκιλλίνη και πιπερακιλλίνη (Εικόνα 7Α) οι οποίες αναστέλλουν τόσο τα Εντεροβακτήρια όσο και τις ψευδομονάδες και αρκετά Gram θετικά αποτελώντας αντιβιοτικά εκτεταμένου φάσματος (Eliopoulos G. M. και Moellering R. C., 1982). Εκτεταμένου φάσματος πενικιλίνες είναι επίσης και παράγωγα του 6-β-αμιδινοπενικιλανικού οξέος όπως η μεκιλλινάμη (Εικόνα 7Α; Tybring L. και Melchior N. H., 1975) .

Η εξέλιξη της σύνθεσης πενικιλινών θα μπορούσε να υποστηριχτεί ότι ακολούθησε αυτή των βακτηρίων που στόχευαν. Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών *Staphylococcus aureus* που παρήγαγαν β-λακταμάση έθεσε την ανάγκη για πενικιλίνες που δε θα απενεργοποιούνταν από το ένζυμο αυτό και θα διατηρούσαν την αντιβακτηριακή τους δράση. Η μεθικιλίνη ήταν ένα τέτοιο μόριο ενώ ακολούθησαν η ναφθικιλίνη, η οξακιλλίνη και τα αλογονομένα παράγωγα αυτής, η φουρβουκιλλίνη, η διφαινικιλίνη και η κιννακιλλίνη (Εικόνα 7Α; Barber M. και Waterworth P. M., 1964; Sutherland R. και συν., 1970). Οι ανθεκτικές στην πενικιλινάση πενικιλίνες έδωσαν προσωρινή λύση στο πρόβλημα της αντοχής των σταφυλοκόκκων καθώς επιλέχθηκαν στελέχη που δεν αναστέλλονταν από αυτές εξαιτίας κυρίως της πρόσληψης ενός γονιδίου το προϊόν του οποίου αντικαθιστούσε την δράση του στόχου των πενικιλινών χωρίς να αλληλεπιδρά με τα αντιβιοτικά αυτά (τα στελέχη αυτά ονομάζονται ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη *S. aureus*, MRSA).

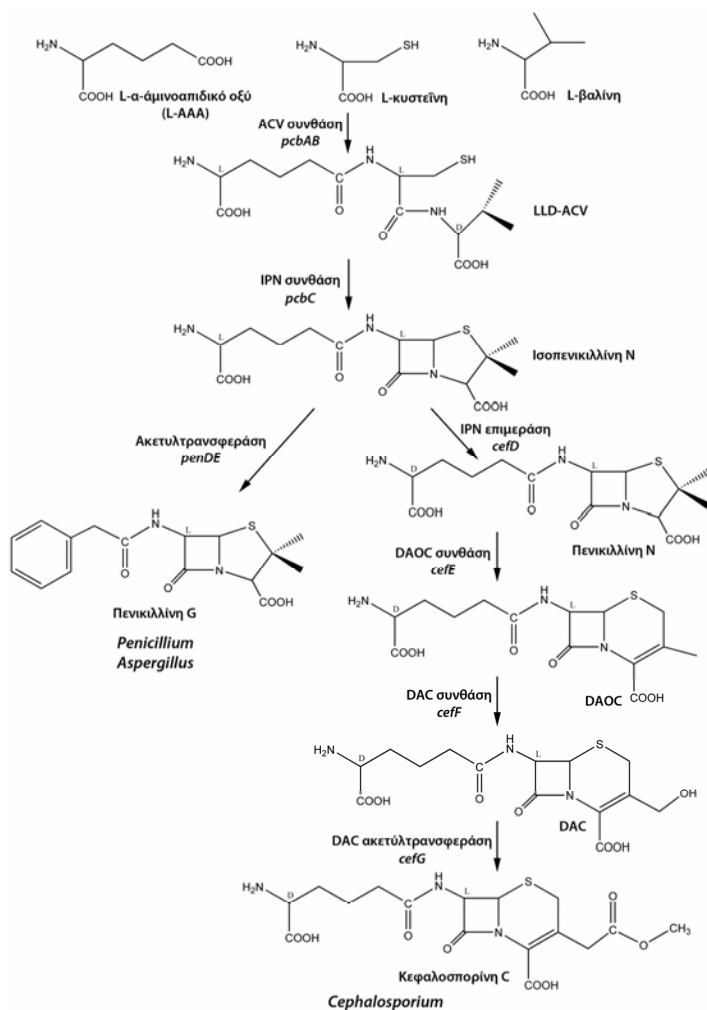
Εκτός από την τροποποίηση στην αμινομάδα του 6-APA οι ιδιότητες των πενικιλινών μπορούν να καθοριστούν και από άλλες προσθήκες στον πυρήνα τους. Οι

τροποποιήσεις αυτές βελτιώνουν κυρίως τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φαρμάκων. Έτσι από την προσθήκη μέθοξυ-ομάδας στη θέση 6 του συστήματος πενάμης της τικαρκιλίνης προκύπτει η τεμοκιλλίνη (6α-μέθοξυ-τικαρκιλίνη, Εικόνα 7B) η οποία χαρακτηρίζεται από καλύτερες φαρμακοκινητικές ιδιότητες από το πρόδρομο μόριο και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην υδρόλυση από β-λακταμάση (Spencer R. C., 1990). Τροποποιήσεις στο καρβοξύλιο που συνδέεται με την θέση 3 του συστήματος πενάμης δίνουν πρόδρομα φάρμακα που έχουν αυξημένη βιοδραστικότητα σε χορήγηση από το στόμα. Τέτοιες τροποποιήσεις έχουν λάβει χώρα με προσθήκη της πιβαλοϋλοξυμεθύλ-ομάδας (2,2-διμέθυλ-προποϋλ-οξυμεθύλ) στην αμπικιλίνη και στη μεκιλινάμη (πιβαμπικιλίνη και πιβμεκιλινάμη αντίστοιχα, Εικόνα 6B; Bentzen A. J. και συν., 1975) ή με προσθήκη 1-αίθοξυ-καρβονύλ-όξυ-αιθύλ-ομάδας στην αμπικιλίνη (Βακαμπικιλίνη, Εικόνα 7B; Bodin N. O. και συν., 1975). Η εστεροποίηση του καρβοξυλίου του διπλού συστήματος δακτυλίων έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλα β-λακταμικά που χορηγούνται από το στόμα (π.χ. στοματικές κεφαλοσπορίνες).

ii. Κεφαλοσπορίνες

Η επόμενη ομάδα β-λακταμικών με ευρεία χρήση και ίσως πιο σημαντική από τις πενικιλίνες είναι οι κεφαλοσπορίνες. Η πρώτη κεφαλοσπορίνη όπως αναφέρθηκε ανιχνεύθηκε στο μείγμα αντιβιοτικών που παρήγαγε ο μύκητας *C. salmosynnematum*. Η κεφαλοσπορίνη C είχε όπως και η πενικιλίνη N δράση τόσο έναντι των Gram θετικών όσο και των Gram αρνητικών η οποία όμως ήταν χαμηλής ισχύος. Παράλληλα είχε τα απαραίτητα χαρακτηριστικά που την καθιστούσαν χρήσιμη στην κλινική πράξη όπως ότι υδρολύονταν σε χαμηλό βαθμό από την β-λακταμάση του σταφυλόκοκκου ενώ εμφάνιζε χαμηλή τοξικότητα (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η εμπειρία που είχε αποκτηθεί από τις πενικιλίνες είχε δείξει ότι η αύξηση της αντιβακτηριακής δράσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω τροποποιήσεων της κεντρικής δομής των φυσικών αντιβιοτικών. Ως πυρήνας των κεφαλοσπορινών ορίζεται το διπλό σύστημα β-λακταμικού και δακτυλίου διυδροθειαζίνης ο οποίος στη θέση 3 φέρει κάποια υποκατάσταση (στην κεφαλοσπορίνη C μία ακέτοξυ-μεθύλ-ομάδα) και στη θέση 4 μία καρβοξυλομάδα ενώ οι C3 και C4 συνδέονται με διπλό δεσμό (Δ^3 -κεφέμη). Όταν ο

διπλός δεσμός στον δακτύλιο διυδροθειαζίνης βρίσκεται μεταξύ των C2 και C3 (σύστημα Δ^2 -κεφέμης) τα αντίστοιχα μόρια έχουν μειωμένη βιολογική δράση (Lemke T., 2008). Την κεντρική αυτή δομή συμπληρώνει μία αμινομάδα στην θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου (Εικόνα 9) η οποία μπορεί να ακυλωθεί με διάφορες πλευρικές αλυσίδες όπως συμβαίνει με το 6-APA (Sader H. και Jones R. N., 1992).

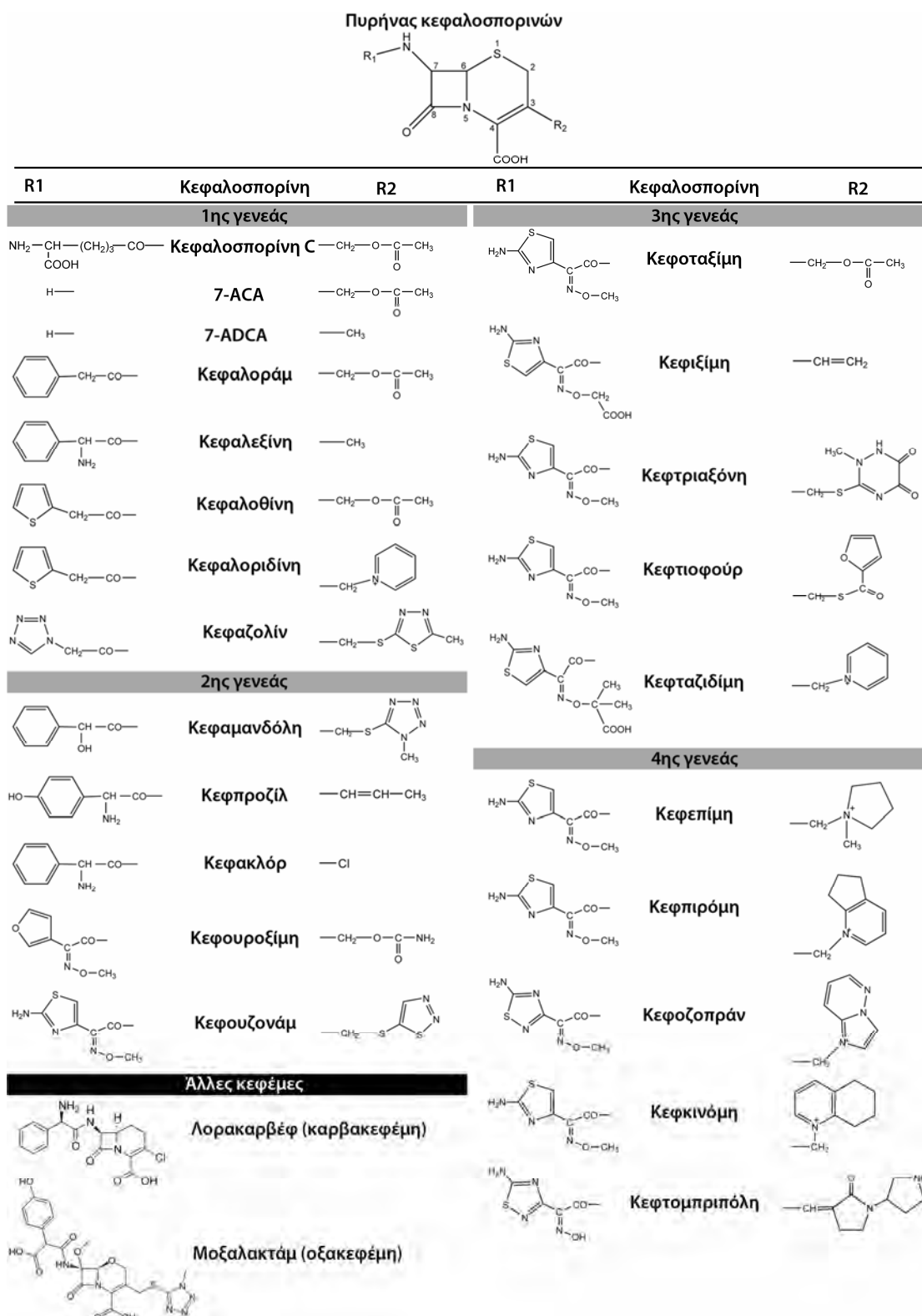


Εικόνα 8: Βιοσυνθετικό μονοπάτι πενικιλινών και κεφαλοσπορινών σε νηματοειδείς μύκητες. Το πρώτο στάδιο αφορά μη-ριβωσωμική σύνθεση του τριπεπτιδίου αμινο-απιδικό-κυστεΐνη-βαλίνη και στην συνέχεια κυκλοποίηση ώστε να προκύψει η ισοπενικιλίνη N (IPN) η οποία ισομερίζεται προς πενικιλίνη N. Στο *Penicillium* και στον *Aspergillus* δράση ακυλ-τρανσερών τροποποιεί την άκυλο-άμινο πλευρική αλυσίδα ενώ στο *Cephalosporium* το μονοπάτι προχωρά προς την σύνθεση κεφαλοσπορίνης C. DAOC: απακέτοζυ κεφαλοσπορίνη C, DAC: απακέτυλο κεφαλοσπορίνη C. Δίνονται επίσης τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για τα ένζυμα που καταλύουν τα διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης.

Οι αρχικές προσπάθειες βελτίωσης των κεφαλοσπορινών αφορούσαν ακυλίωση αυτής της αμινομάδας. Σε αντίθεση όμως με τις πενικιλίνες η ελάχιστη δομή των

κεφαλοσπορινών δεν εκκρίνονταν ως παραπροϊόν της διαδικασίας ζύμωσης του μύκητα και κατά συνέπεια έπρεπε να παραχθεί *in vitro*. Αναπτύχθηκαν δύο διαδικασίες παραγωγής του κεφαλοσπορινικού πυρήνα με την πρώτη να βασίζεται στην υδρόλυση του αμιδικού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας της κεφαλοσπορίνης C που παράγεται από τη ζύμωση του *Cephalosporium* δίνοντας το 7-άμινο-κεφαλοσπορινικό οξύ (Εικόνα 9, 7-ACA) και την δεύτερη στη σύνθεση ενός παραγώγου του 7-ACA, του οποίου η υποκατάσταση στη θέση 3 του συστήματος κεφέμης δεν έφερε την ακέτοξυ ομάδα (7-άμινο-απακέτοξυ-κεφαλοσπορινικό οξύ, 7-ADCA. Εικόνα 9), μέσω τροποίησης του 6-APA. Στη βιομηχανία σήμερα χρησιμοποιείται η δεύτερη μέθοδος καθώς έχει καλύτερη απόδοση και η ζυμωτική παραγωγή του 6-APA είναι πιο εύκολη από αυτή της κεφαλοσπορίνης C (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Ένας μεγάλος αριθμός ημισυνθετικών κεφαλοσπορινών με βελτιωμένες ιδιότητες συντέθηκε χρησιμοποιώντας τα παραπάνω μόρια οι οποίες συνηθίζεται να κατηγοριοποιούνται σε γενεές με βάση την χρονολογική σειρά που εισήλθαν στην κλινική πράξη και των ιδιοτήτων τους. Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται οι δομές κάποιων εξ'αυτών.

Η πρώτη ημισυνθετική κεφαλοσπορίνη συντέθηκε από την ομάδα της Οξφόρδης μετά από ακυλίωση της αμινομάδας του 7-ACA με τη βενζύλ-μεθύλ-ακύλ-ομάδα (δηλαδή την πλευρική αλυσίδα της πενικιλίνης G). Το τελικό προϊόν (κεφαλοράμη) ήταν πολύ πιο ενεργό έναντι του *S. aureus* σε σύγκριση με την κεφαλοσπορίνη C (Hale C. και συν., 1961; Jago M., 1964). Σύνθεση διαφόρων ακυλιωμένων παραγώγων του 7-ACA στα εργαστήρια της Elli-Lilly στις ΗΠΑ και έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης οδήγησε στην κεφαλοθίνη της οποίας η πλευρική αλυσίδα στη θέση του βενζολικού δακτυλίου της κεφαλοράμης έφερε δακτύλιο θειοφαινίου (το μόριο προέκυψε από αντίδραση 7-ACA με θειαινύλ-ακέτυλο χλωρίδιο) (Chang T. W. και Weinstein L., 1964). Η κεφαλοθίνη ήταν η πρώτη κεφαλοσπορίνη που κυκλοφόρησε στις ΗΠΑ για παρεντερική χρήση ενώ ακολούθησε η κεφαλεξίνη η οποία είναι το α-άμινο-βενζύλ-μεθυλ-άκυλο παράγωγο του 7-ADCA (είναι δηλαδή το κεφαλοσπορινικό ανάλογο της αμπικιλίνης) για χορήγηση από το στόμα.



Εικόνα 9: Αντιπροσωπευτικές κεφαλοσπορίνες από τις διάφορες γενιές μορίων που συντέθηκαν τα τελευταία 60 χρόνια. Τα κεφτιοφούρ και κεφκινόμη χρησιμοποιούνται στη ζωϊκή παραγωγή. Η κεφομπριπόλη θεωρείται φάρμακο πέμπτης γενεάς. Δίνονται επίσης και μόρια που έχουν προκύψει με τροποποίηση του συστήματος κεφέμης.

Η ύπαρξη ενεργοποιημένης ομάδας στη θέση 3 του συστήματος κεφέμης έδωσε τη δυνατότητα για προσθήκη επιπλέον υποκαταστάσεων. Ακολούθησε η σύνθεση νέων μορίων τα οποία έφεραν διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες και σε αυτή τη θέση (έχει καθιερωθεί η πλευρική αλυσίδα στην 7-αμινομάδα να ονομάζεται R1 και αυτή στον άνθρακα 3 R2). Έτσι επίδραση πυριδίνης στην κεφαλοθίνη είχε ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση της ακέτοξυ ομάδας στην R2 αλυσίδα με πυριδίνιο δίνοντας την κεφαλοριδίνη η οποία σε σύγκριση με το πατρικό φάρμακο είχε καλύτερες φαρμακολογικές ιδιότητες (Turck M. και συν., 1967). Με βάση τις παραπάνω στρατηγικές συντέθηκαν αρκετές κεφαλοσπορίνες που διέφεραν στον δακτύλιο της R1 αλυσίδας και στην R2 υποκατάσταση και κάποιες από αυτές είχαν βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τα πρώτα αντιβιοτικά της ομάδας. Για παράδειγμα η κεφαζολίνη έφερε δακτύλιο τετραζόλης στην R1 και θειολο-μέθυλ-θειοτετραζόλη στην R2 που την καθιστούσαν λιγότερο ευαίσθητη σε υδρόλυση από την πενικιλιλινάση και βελτίωναν τις φαρμακοκινητικές της ιδιότητες (Kariyone K. και συν., 1970; Nishida M. και συν., 1970).

Το αντιβακτηριακό φάσμα των κεφαλοσπορινών πρώτης γενεάς περιλαμβάνει κυρίως Gram θετικά συμπεριλαμβανομένων των ευαίσθητων στην οξακιλλίνη σταφυλοκόκκων και στρεπτοκόκκων. Τα Gram αρνητικά που αναστέλλονται από αυτές (όχι όμως πολύ ισχυρά) είναι τα εντεροβακτηριακά *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Proteus mirabilis* ενώ δεν έχουν ενεργότητα έναντι των *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus* (θετική αντίδραση ινδόλης) και των αναεροβίων *Bacteroides* (Sader H. και Jones R. N., 1992). Εξαιτίας του περιορισμένου φάσματος δράσης και της εμφάνισής ανθεκτικών στελεχών οι κεφαλοσπορίνες αυτές έχουν αποσυρθεί από την κλινική πράξη και χρησιμοποιούνται μόνο στην κτηνιατρική.

Οι κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενεάς αρχικά δεν έφεραν σημαντικές δομικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με αυτές της πρώτης. Μικρές τροποποιήσεις στην R1 πλευρική αλυσίδα και διαφορετικές R2 υποκαταστάσεις ισχυροποιούσαν την δράση τους έναντι των Gram αρνητικών ή/και βελτίωναν τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Σημαντικό βήμα στην "εξέλιξη" των κεφαλοσπορινών δεύτερης γενεάς αποτέλεσε η προσθήκη στη θέση 7-α της R1 αλυσίδας οξύ-ίμινο ομάδας η οποία προσέδιδε αυξημένη

αντοχή στην υδρόλυση από β-λακταμάσες. Η πρώτη κεφαλοσπορίνη με τέτοιου είδους υποκατάσταση ήταν η κεφουροξίμη η οποία έφερε 7-α-ίμινο-μέθοξυ R1 πλευρική αλυσίδα (Eykn S. και συν., 1976; Foord R. D., 1976; Greenwood D. και συν., 1976; O'Callaghan C. H. και συν., 1976) ενώ ακολούθησαν και άλλες στις οποίες ο δακτύλιος φουρανίου είχε αντικατασταθεί από δακτύλιο αμινοθειαζόλης (π.χ. κεφουζονάμη) τροποποίηση επίσης σημαντική ενισχύοντας περαιτέρω την αντοχή στην ενζυμική υδρόλυση και αυξάνοντας τη συγγένεια με τον στόχο τους (Hara K. και Matsumoto F., 1987). Η προσθήκη της 7-α-ίμινο-μέθοξυ υποκατάστασης βρέθηκε ότι μειώνει την υδρόλυση από πενικιλινάσες κατά 30 περίπου φορές υπό την προϋπόθεση η οξίμινο ομάδα να ήταν διαμόρφωσης Z (*syn*) ενώ στην περίπτωση E-οξίμης (*anti*) οι αντίστοιχες κεφαλοσπορίνες υδρολύονταν πολύ γρήγορα (αποδοτικότερα και από τις κεφαλοσπορίνες χωρίς οξίμινο υποκατάσταση) (Laurent G. και συν., 1983; Lemke T., 2008). Συνολικά τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας είναι πιο ενεργά έναντι των *E. coli*, *K. pneumoniae* και *P. mirabilis* από ότι οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς ενώ έχουν σχετικά διευρυμένο φάσμα δράσης το οποίο συμπεριλαμβάνει τα *H. influenzae*, ορισμένα είδη *Enterobacter* spp. και *Serratia* spp., αναερόβια και τις παθογόνες Ναϊσσέριες (Shadomy S. και συν., 1978). Οι δεύτερης γενιάς κεφαλοσπορίνες δεν έχουν δράση έναντι των ψευδομονάδων ενώ η ενεργότητά τους έναντι των Gram θετικών είναι γενικά μειωμένη σε σχέση με τις πρώτες κεφαλοσπορίνες με εξαίρεση την κεφαμανδόλη και την κεφουροξίμη (Sader H. και Jones R. N., 1992).

Τα πλεονεκτήματα της αμινοθειαζωλυλ-μεθοξίμινο (ATMO) R1 πλευρικής αλυσίδας οδήγησαν στην καθιέρωσή της ως βασικό δομικό στοιχείο των νεώτερων κεφαλοσπορινών. Έτσι η πλειοψηφία των κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς έφερε την συγκεκριμένη υποκατάσταση ή παράγωγα αυτής (εξαίρεση αποτελούν το κεφτιμπουτέν το οποίο στη θέση 7α είναι υποκατεστημένο από $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ και η κεφοπεραζόνη της οποίας η πλευρική αλυσίδα είναι το φαινολικό ανάλογο της αντίστοιχης της πιπερακιλλίνης). Τα αντιβιοτικά αυτά στο σύνολό τους έχουν παρόμοια αντιμικροβιακή δράση αναστέλλοντας μεγάλο αριθμό Gram αρνητικών βακτηρίων και συχνά χαρακτηρίζονται ως εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες (ΕΦΚ) (Jones R. N. και Thornsberry C., 1982). Στελέχη του γένους *Pseudomonas* αναστέλλονται ισχυρά μόνο από την κεφταζιδίμη και την κεφοπεραζόνη (τρίτης γενιάς αντί-ψευδομοναδικές

κεφαλοσπορίνες) (Jones R. N. και συν., 1981; Brogden R. N. και συν., 1981). Η ενεργότητά τους είναι σχετικά χαμηλή έναντι των Gram θετικών (με την κεφταζιδίμη να προκαλεί τη χαμηλότερη αναστολή) εκτός από την κεφοπεραζόνη (Sader H. και Jones R. N., 1992). Όπως και στις υπόλοιπες κεφαλοσπορίνες διαφορετικές R2 πλευρικές αλυσίδες συνήθως τροποποιούν τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες (μεταβολισμός του αντιβιοτικού, χρόνος ημίσειας ζωής στον ορό, πρόσβαση σε συγκεκριμένους ιστούς, δέσμευση σε πρωτεΐνες του ορού κ.α.) με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της κεφοταξίμης και της κεφτριαξόνης (Jones R. N. και Barry A. L., 1987). Η ευρεία χρήση των κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς οδήγησε σε εμφάνιση αντοχής κυρίως μέσω της ενζυμικής απενεργοποίησής τους είτε από μεταλλάκτες πενικιλлинаσών με αυξημένη υδρολυτική ικανότητα έναντι αυτών (Εκτεταμένου Φάσματος β-Λακταμάσες, ΕΦΒΛ) είτε από υπερπαραγωγή β-λακταμασών που εμφάνιζαν υψηλή ενεργότητα έναντι των κεφαλοσπορινών πρώτης γενεάς (κεφαλοσπορινάσες) τα γονίδια των οποίων απαντούσαν στο χρωμόσωμα ορισμένων Gram αρνητικών.

Με σκοπό να αντιμετωπιστεί η αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς αλλά και να βελτιωθεί το αντιβακτηριακό φάσμα τους ακολούθησαν προσπάθειες τροποποίησής (Sader H. και Jones R. N., 1992). Οι προσπάθειες αυτές έδωσαν μία νέα γενιά μορίων τα οποία έφεραν ATMO R1 πλευρική αλυσίδα ενώ η R2 υποκατάσταση περιείχε τεταρτοταγές αμμώνιο (όπως στην κεφταζιδίμη) ενσωματωμένο σε δακτύλιο ή σύστημα δακτυλίων (Kessler R. E. και συν., 1985; Jones R. N. και συν., 1991). Οι νέες κεφαλοσπορίνες (τέταρτης γενιάς) ήταν πιο ανθεκτικές σε υδρόλυση από κεφαλοσπορινάσες ενώ ως επαμφοτερίζουσες ενώσεις διαπερνούσαν ταχύτερα το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (Hancock R. E. και Bellido F., 1992). Τα αντιβιοτικά αυτά είναι οι πιο ενεργές κεφαλοσπορίνες έναντι των *Enterobacteriaceae* ενώ η δράση τους έναντι των *Pseudomonas* είναι συγκρίσιμη με αυτή της κεφταζιδίμης και της κεφοπεραζόνης. Αναστέλλουν σε σημαντικό βαθμό τα Gram θετικά (συμπεριλαμβανομένων και των εντεροκόκκων) ενώ έχουν περιορισμένη δράση έναντι των αναερόβιων *Bacteroides* (Sader H. και Jones R. N., 1992). Οι τέταρτης γενιάς κεφαλοσπορίνες όπως και οι υπόλοιπες κεφαλοσπορίνες με δράση έναντι των Gram θετικών δεν αναστέλλουν τους MRSA και άλλους ανθεκτικούς στην οξακιλλίνη κόκκους. Μία νέα κεφαλοσπορίνη, η κεφτομπιπρόλη, η οποία φέρει αμινοθειαδιαζωλυλ-

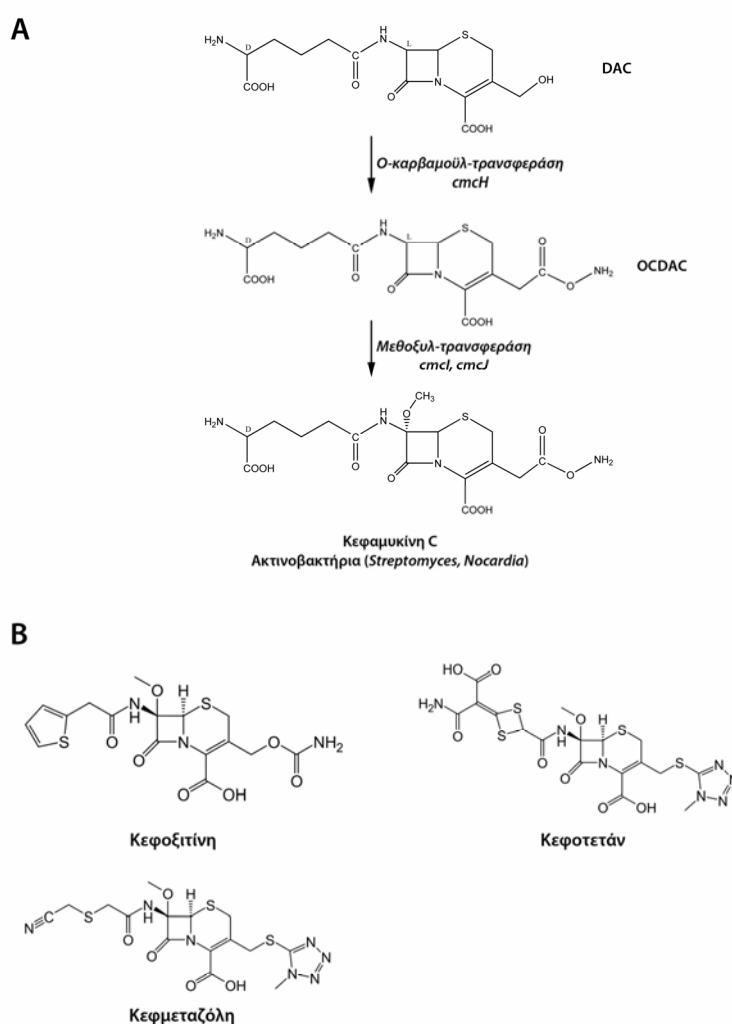
υδροξυίμινο R1 πλευρική αλυσίδα και σύστημα πυροδινυλικών δακτυλίων στην R2 φαίνεται να διατηρεί το φάσμα δράσης των κεφαλοσπορινών τέταρτης γενεάς ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει και τα παραπάνω Gram θετικά (Hebeisen P. και συν., 2001; Noel G. J. και συν., 2008). Το αντιβιοτικό αυτό κατηγοριοποιείται ως πέμπτης γενιάς κεφαλοσπορίνη και έχει εγκριθεί για κλινική χρήση από την Ευρωπαϊκή Ένωση και τον Καναδά.

Στην ομάδα των κεφαλοσπορινών ταξινομούνται και μόρια τα οποία φέρουν τροποποιήσεις στο σύστημα κεφέμης. Έτσι αντικατάσταση του ατόμου θείου του δακτυλίου διυδροθειαζίνης με άνθρακα στην κεφακλόρη έδωσε τη λορακαρβέφη (καρβακεφέμη) η οποία εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα στον ορό (Hill S. L. και συν., 1994). Η ύπαρξη οξυγόνου στη θέση ένα του συστήματος κεφέμης (οξακεφέμες) μειώνει την ταχύτητα υδρόλυσης από β-λακταμάσες. Η μοξαλακτάμη είναι μία οξακεφέμη που έχει τα χαρακτηριστικά των κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς ενώ εκτός από την τροποποίηση στο σύστημα κεφέμης φέρει μέθοξυ υποκατάσταση στον άνθρακα 7 του λακταμικού δακτυλίου που επίσης προσδίδει αντοχή σε ενζυμική απενεργοποίηση (Yoshida T. και συν., 1980; Murakami K. και Yoshida T., 1981; Richmond M. H., 1982).

iii. Κεφαμυκίνες

Οι κεφαμυκίνες είναι η πρώτη κατηγορία β-λακταμικών αντιβιοτικών που βρέθηκε να παράγονται από βακτήρια (γένη *Streptomyces* και *Nocardia*) (Stapley E. O., 1972). Από δομική άποψη μοιάζουν στις κεφαλοσπορίνες διαφέροντας ως προς την ύπαρξη μέθοξυ υποκατάστασης στην θέση 7 του συστήματος κεφέμης. Οι φυσικές κεφαμυκίνες παράγονται από το ίδιο μονοπάτι με αυτό της βιοσύνθεσης των κεφαλοσπορινών με τη διαφοροποίηση να υφίσταται στο στάδιο της απακετύλ-κεφαλοσπορίνης C (DAC) η οποία καρβαμοϋλιώνεται στην R2 πλευρική αλυσίδα και στη συνέχεια υποκαθίσταται στη θέση 7 με μέθοξυ ομάδα δίνοντας την κεφαμυκίνη C (Εικόνα 10A; Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η κεφαμυκίνη C αποτελεί πρόδρομο μόριο για διάφορα φυσικά αντιβιοτικά τα οποία φέρουν πολύπλοκες υποκαταστάσεις στον C3 του δακτυλίου διυδροθειαζίνης (π.χ. οι ογανομυκίνες που

παράγονται από το *S. oganopensis* οι οποίες φέρουν ετεροκυκλικές θειόλες; Osono T. και συν., 1980).



Εικόνα 10: Α) Βιοσυνθετικό μονοπάτι κεφαμυκινών σε βακτήρια. Μέχρι το στάδιο της απακέτυλο κεφαλοσπορίνης C τα στάδια είναι ίδια με αυτά της βιοσύνθεσης κεφαλοσπορινών σε μύκητες. Δράση επιπλέον ενζύμων στα Ακτινοβακτήρια οδηγεί στην σύνθεση κεφαμυκίνης C. Η ύπαρξη 7α-μέθοξυ υποκατάστασης διαφοροποιεί τα μόρια αυτά από τις κεφαλοσπορίνες. Β) Δομές κλινικά χρησιμοποιούμενων κεφαμυκινών.

Οι ιδιότητες της κεφαμυκίνης C δεν την καθιστούσαν ισχυρό αντιβακτηριακό παράγοντα. Εμφάνιζε όμως αρκετά μειωμένη ευαισθησία σε υδρόλυση από β-λακταμάσες η οποία αποδόθηκε στην ύπαρξη της 7α-μέθοξυ ομάδας. Ουσιαστικά η "ιδέα" για την προσθήκη αυτής της τροποποίησης στις πενικιλίνες (τεμοκυκλίνη) και στις οξακεφέμες (μοξαλακτάμη) προήλθε από την παραπάνω παρατήρηση. Όπως και με

τις κεφαλοσπορίνες, ημισυνθετικά παράγωγα της κεφαμυκίνης C με βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες εισήλθαν γρήγορα στην κλινική πράξη. Το πρώτο από αυτά ήταν η κεφοξιτίνη, η οποία είναι το "κεφαμυκινικό" ανάλογο της κεφαλοθίνης όσον αφορά την R1 πλευρική αλυσίδα. Ακολούθησαν η κεφμεταζόλη και Η κεφοτετάνη (Εικόνα 10B) (Birnbbaum J. και συν., 1978; Jones R. N., 1989; Jones R. N., 1988). Οι ημισυνθετικές κεφαμυκίνες χαρακτηρίζονται από το αντιβακτηριακό φάσμα των δεύτερης γενιάς κεφαλοσπορινών και συχνά συγκαταλέγονται σε αυτές. Έχουν υψηλή δραστηριότητα έναντι των Εντεροβακτηριακών ενώ είναι οι πιο ενεργές "κεφαλοσπορίνες" έναντι των αναεροβίων Gram αρνητικών. Εμφανίζουν όμως μειωμένη δράση έναντι των Gram θετικών. (Sader H. και Jones R. N., 1992)

iv. Καρβαπενέμες

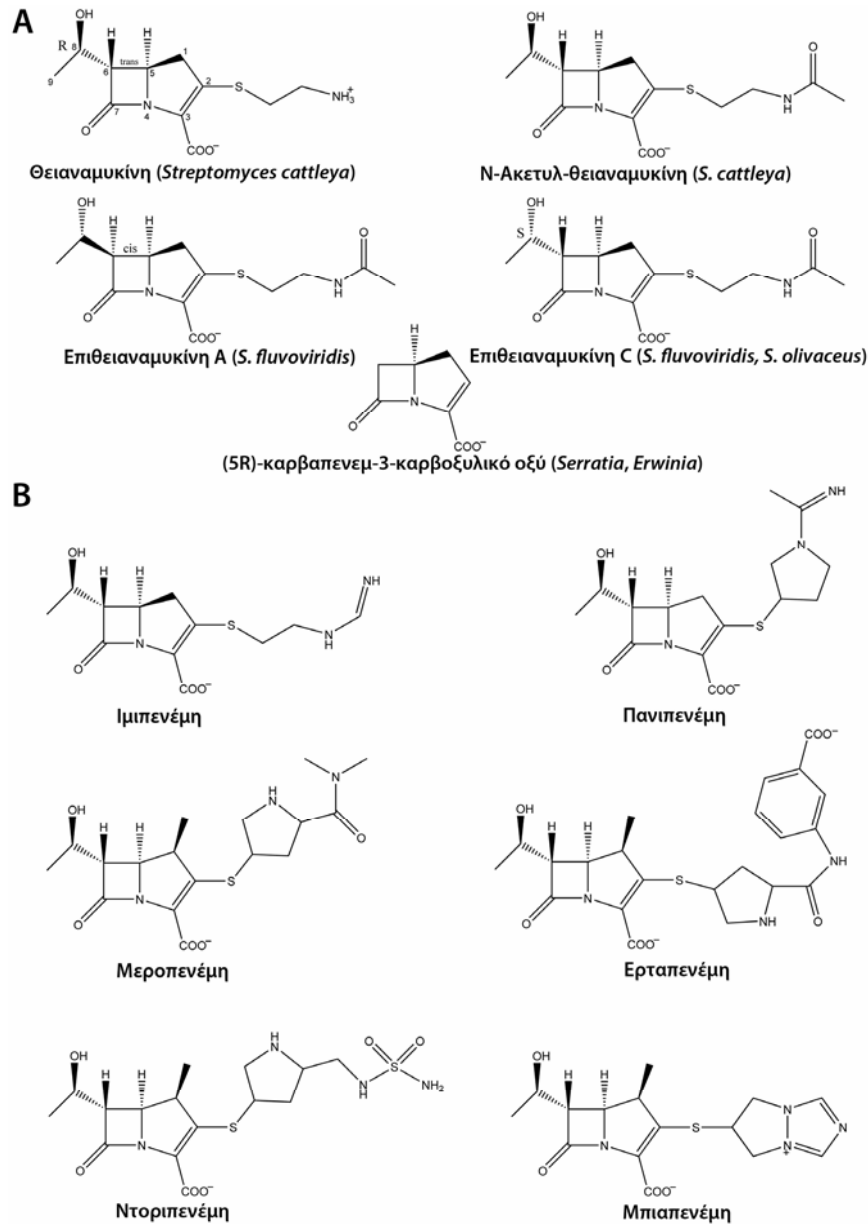
Η ανακάλυψη της κεφαμυκίνης C ως προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού ενός βακτηρίου του γένους *Streptomyces* έδωσε νέα ώθηση στην αναζήτηση φυσικών β-λακταμικών αντιβιοτικών καθώς οι μικροοργανισμοί αυτοί ήταν ήδη γνωστό ότι διέθεταν μία ισχυρή βιοσυνθετική "μηχανή" παράγοντας πλήθος μεταβολιτών μερικοί από τους οποίους είχαν αντιβακτηριακή δράση. Η παραγωγή αντιβιοτικών που θα αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος ελέγχθηκε σε μεγάλο αριθμό στελεχών *Streptomyces*.. Παράλληλα αναζητήθηκαν και μεταβολίτες του *Streptomyces* που θα μπορούσαν να αναστέλλουν τις β-λακταμάσες. Τα πρώτα αποτελέσματα αυτής της αναζήτησης έδωσαν τη θειεναμυκίνη η οποία βρέθηκε να παράγεται από το στέλεχος *S. cattleya* το 1976 (Kahan J. S. και συν., 1979).

Η θειεναμυκίνη ήταν και εξακολουθεί να είναι το πιο ισχυρό, εκτεταμένου φάσματος, μη τοξικό αντιβιοτικό που έχει βρεθεί ως φυσικό προϊόν (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Φέρει διπλό σύστημα δακτυλίων το οποίο μοιάζει με αυτό των πενικιλινών (σύστημα πενάμης) με την διαφορά ότι οι άνθρακες 2 και 3 συνδέονται με διπλό δεσμό και το άτομο θείου στη θέση 1 έχει αντικατασταθεί από άνθρακα (σύστημα καρβαπενέμης) (Εικόνα 11A). Η θέση 2 του συστήματος καρβαπενέμης συνδέεται μέσω θειοαιθερικού δεσμού με αιθυλεναμινομάδα ενώ στη θέση 6 συνδέεται υδροξύλ-αιθυλομάδα με τον άνθρακα 8 να είναι ασύμμετρος (Εικόνα 11A). Η ακυλοάμινο

υποκατάσταση που απαντά στην αντίστοιχη θέση των πενικιλινών και κεφαλοσπορινών απουσιάζει. Εκτός από τις βέλτιστες αντιβακτηριακές ιδιότητες η θειεναμυκίνη παρουσίαζε ανασταλτική δράση κατά των β-λακταμασών με σερίνη στο ενεργό κέντρο δημιουργώντας σταθερό ομοιοπολικό σύμπλοκο με το καταλυτικό αμινοξύ το οποίο δεν μπορούσε να υδρολυθεί (αναστολή βασιζόμενη στο μηχανισμό κατάλυσης) (Kropp H. και συν., 1979; Monks J. και Waley S. G., 1988). Σχεδόν παράλληλα με την ανακάλυψη της θειεναμυκίνης νέα στελέχη *Streptomyces* βρέθηκε να παράγουν και άλλες φυσικές καρβαπενέμες (περίπου 50 είναι σήμερα γνωστές) πολλές από τις οποίες ήταν επιμερή της N-ακετυλιωμένης μορφής της θειεναμυκίνης (Εικόνα 11Α) (Okamura K. και συν., 1978; Nakayama M. και συν., 1980; Cassidy P. J. και συν., 1981; Kobayashi F. και συν., 1982; Murakami K. και συν., 1982; Okabe M. και συν., 1982). Αρκετές από αυτές δεν έφεραν τα χαρακτηριστικά της θειεναμυκίνης όσον αφορά το φάσμα δράσης, την αντιβακτηριακή ισχύ και την αντοχή σε ενζυμική υδρόλυση ενώ κάποιες, όπως για παράδειγμα τα ολιβανικά οξέα που παράγονταν από το *S. olivaceus* (επιθειεναμυκίνη C, Εικόνα 11Α), διατηρούσαν την ανασταλτική τους ισχύ έναντι των β-λακταμασών (Okabe M. και συν., 1982). Αργότερα βρέθηκε ότι και τα εντεροβακτηριακά *Serratia* και *Erwinia* παράγουν τον ελάχιστο καρβαπενεμικό πυρήνα (καρβαπενέμ-3-καρβοξυλικό οξύ, Εικόνα 11Α) (Parker W. L. και συν., 1982; McGowan S. J., 1997).

Οι διαφορές των ιδιοτήτων μεταξύ των πρώτων φυσικών καρβαπενεμών οδήγησε στο να χαρτογραφηθούν κάποια από τα δομικά χαρακτηριστικά της θειεναμυκίνης που προσδίδουν τις προαναφερθείσες ιδιότητες. Διαπιστώθηκε ότι η υδροξύλ-αιθύλ-ομάδα στον C6 του β-λακταμικού δακτυλίου καθιστά το μόριο ανθεκτικό στην υδρόλυση από β-λακταμάσες (κατ' αναλογία με την 7 μέθοξυ ομάδα των κεφαμυκινών) (Moellering R. C., Jr. και συν., 1989; Papp-Wallace K. M. και συν., 2011). Την ίδια επίδραση φαίνεται να έχει και η *trans* διαμόρφωση των δύο ατόμων υδρογόνου γύρω από τον δεσμό C5-C6 του β-λακταμικού δακτυλίου (Basker M. J. και συν., 1980). Σημειώνεται ότι στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες η διαμόρφωση του αντίστοιχου δεσμού είναι πάντα *cis*. Βρέθηκε επίσης ότι η *R* διαμόρφωση του C8 στον οποίο δεσμεύεται το υδροξύλιο της 6α υποκατάστασης παρουσίαζε ανασταλτική δράση κατά των β-λακταμασών με σερίνη στο ενεργό κέντρο αυξάνει την αντιβακτηριακή ισχύ (Papp-Wallace K. M. και συν., 2011). Τέλος ο άνθρακας στην θέση 1 αντί του θείου έχει επίσης επίδραση στην

αντιβακτηριακή ισχύ και το φάσμα δράσης των καρβαπενεμών (Parr-Wallace K. M. και συν., 2011).



Εικόνα 11: Α) Φυσικές καρβαπενέμες. Η S ή R διαμόρφωση του C8 όπου συνδέεται το υδροξύλιο της βα ύδροξυ-αιθύλ υποκατάστασης καθορίζει την αντιμικροβιακή τους δράση ενώ σημαντικό ρόλο έχει και η διαμόρφωση του δεσμού C5-C6 στις ιδιότητες των μορίων. Η επιθειαναμικίνη C ανήκει στα ολιβανικά οξέα. Β) Κλινικά χρησιμοποιούμενες συνθετικές καρβαπενέμες. Προσθήκη 1β-μέθυλο υποκατάστασης αύξησε την σταθερότητα ως προς την υδρόλυση από την DHP-I.

Η θειεναμικίνη παρ' όλα τα πλεονεκτήματα της δεν χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη καθώς είναι πολύ ασταθής. Υδρολύεται εύκολα σε ελαφρώς αλκαλικό pH (8,0)

ενώ αντιδρά ισχυρά με διάφορες πυρηνόφιλες ομάδες (π.χ. την σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης) και αμινολύεται ακόμα και από την πρωτοταγή της αμίνη (Kahan J. S. και συν., 1979). Κλινικά χρήσιμα παράγωγα της θειεναμυκίνης συντέθηκαν περίπου 10 χρόνια μετά την ανακάλυψή της καθώς η ζυμωτική παραγωγή των καρβαπενεμών δεν είναι αποδοτική και το βιοσυνθετικό μονοπάτι τους μέχρι πρότινος δεν ήταν γνωστό οπότε απαιτούνταν διαδικασία ολικής σύνθεσης. Το πρώτο από αυτά τα παράγωγα είναι το N-φορμυμιδοϋλωμένο παράγωγο της θειεναμυκίνης, η μιπενέμη (Εικόνα 11B) (Miyadera T. και συν., 1983). Ακολούθησε η πανιπενέμη η οποία στην υποκατάσταση της θέσης 2 φέρει πυρρολυδινικό δακτύλιο ο οποίος αυξάνει το φάσμα δράσης (Papp-Wallace K. M. και συν., 2011). Τα δύο παραπάνω μόρια έφεραν όλες τις ιδιότητες της θειεναμυκίνης και ήταν πολύ πιο σταθερά (Hashizume T. και συν., 1984; Papp-Wallace K. M. και συν., 2011). Η *in vivo* δράση τους όμως αρχικά ήταν περιορισμένη καθώς τα επίπεδα των αντιβιοτικών στον οργανισμό διατηρούνταν σε χαμηλά επίπεδα εξαιτίας της ανθρώπινης νεφρικής αφυδροπεπτιδάσης I (DHP-I) που τα υδρόλυε (Kropp H. και συν., 1982; Hikida M. και συν., 1992). Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε συνδυάζοντας τις καρβαπενέμες αυτές με τους αναστολείς της DHP-I σιλαστατίνη και μπεταμιπρόνη (Norby S. R. και συν., 1983; Graham D. W. και συν., 1987. Τελική λύση στο πρόβλημα έδωσε η 1β-μέθυλο υποκατάσταση στον πυρήνα των καρβαπενεμών που καθιστούσε τα αντιβιοτικά ανθεκτικά σε απενεργοποίηση από την DHP-I (Fukasawa M. και συν., 1992). Έτσι οι νεώτερες καρβαπενέμες μεροπενέμη, ερταπενέμη, μπιαπενέμη και ντοριπενέμη έφεραν όλες αυτήν την προσθήκη ενώ μέσω διαφορετικών πλευρικών αλυσίδων που περιείχαν πυρρολυδινικό δακτύλιο ρυθμίζονταν κυρίως η αντιβακτηριακή τους δράση και οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες (Εικόνα 11B) (Papp-Wallace K. M. και συν., 2011).

Οι καρβαπενέμες έχουν εκτενέστερο φάσμα δράσης από όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλοντας το σύνολο σχεδόν των Gram αρνητικών συμπεριλαμβανομένων αναεροβίων και ψευδομονάδων ενώ έχουν ισχυρή δράση έναντι των Gram θετικών ενώ είναι οι λιγότερο ευαίσθητες στην υδρόλυση από β-λακταμάσες (Nouda H. και συν., 1992; Bassetti M. και συν., 2009). Γενικά η μεροπενέμη, μπιαπενέμη, ερταπενέμη και ντοριπενέμη είναι ελαφρώς πιο ενεργές έναντι των Gram αρνητικών από τις υπόλοιπες (Perry C. M. και Ibbotson T., 2002; Bassetti M. και συν., 2009). Η ερταπενέμη έχει μειωμένη δράση έναντι της *P. aeruginosa* ενώ η μεροπενέμη

δεν είναι τόσο ισχυρή έναντι του *A. baumannii* όσο είναι η μιπενέμη και η ντοριπενέμη (Oliver A. και συν., 2004). Η ντοριπενέμη είναι η πιο ισχυρή έναντι των δύο παραπάνω μη-ζυμωτικών ενώ εμφανίζει τη μικρότερη ευαισθησία στην υδρόλυση από β-λακταμάσες που υδρολύουν καρβαπενέμες (καρβαπενεμάσες). (Mandell L., 2009; Queenan A. M. και συν., 2010) Οι ιδιότητες των καρβαπενεμών τις καθιστούν αντιβιοτικά "τελευταίας γραμμής" και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά βακτήρια μόνες τους ή σε συνδυασμό με μη β-λακταμικά αντιβιοτικά (π.χ. αμινογλυκοσίδες) (Tzouveleki L. S. και συν., 2012). Αρκετές από αυτές έχουν βέλτιστες φαρμακολογικές ιδιότητες δίνοντας υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης στον ορό ενώ διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και διεισδύουν σε γενικά μη προσβάσιμους ιστούς (Tzouveleki L. S. και συν., 2012). Χορηγούνται μόνο παρεντερικά καθώς η βιοδιαθεσιμότητά τους σε χορήγηση από το στόμα είναι μειωμένη (Papp-Wallace K. M. και συν., 2011).

Η έρευνα για την σύνθεση νέων καρβαπενεμών με βελτιωμένες ιδιότητες είναι έντονη και συνεχής και νέα φάρμακα βρίσκονται σε διάφορα στάδια διαδικασίας ελέγχου. Οι προσπάθειες αφορούν τη σύνθεση καρβαπενεμών που θα παρακάμπτουν την εμφάνιση αντοχής στην *P. aeruginosa* η οποία μπορεί πολύ εύκολα να αναπτύξει ανθεκτικότητα χρησιμοποιώντας ποικίλους μηχανισμούς (ενζυμική απενεργοποίηση, μειωμένη διαπερατότητα και ενεργό έκκριση) ενώ παράλληλα εξετάζεται η δυνατότητα αναστολής ταυτόχρονα και των MRSA (Rodriguez-Martinez J. M. και συν., 2009; Papp-Wallace K. M. και συν., 2011). Μία καρβαπενέμη με τις παραπάνω ιδιότητες είναι η τομοπενέμη της οποίας η ανάπτυξη όμως σταμάτησε στις κλινικές δοκιμές (Bayes M. και συν., 2007; Koga T. και συν., 2008; Sugihara K. και συν., 2010). Καρβαπενέμες οι οποίες αναστέλλουν ειδικά τους MRSA έχουν επίσης συντεθεί και δύο από αυτές φαίνεται να έχουν ικανοποιητική δράση (15i και CP5484) (Maguyama T. και συν., 2009; Maguyama T. και συν., 2007). Επίσης αναπτύσσονται και καρβαπενέμες για χορήγηση από το στόμα με μία από αυτές (τεμπιπενέμη-πιβοξίλ) να βρίσκεται σε τελικά στάδια ελέγχου (Isoda T. και συν., 2006). Τέλος γίνονται προσπάθειες για σύνθεση κλινικά χρήσιμων τριμεμών με καρβαπενεμικό πυρήνα.

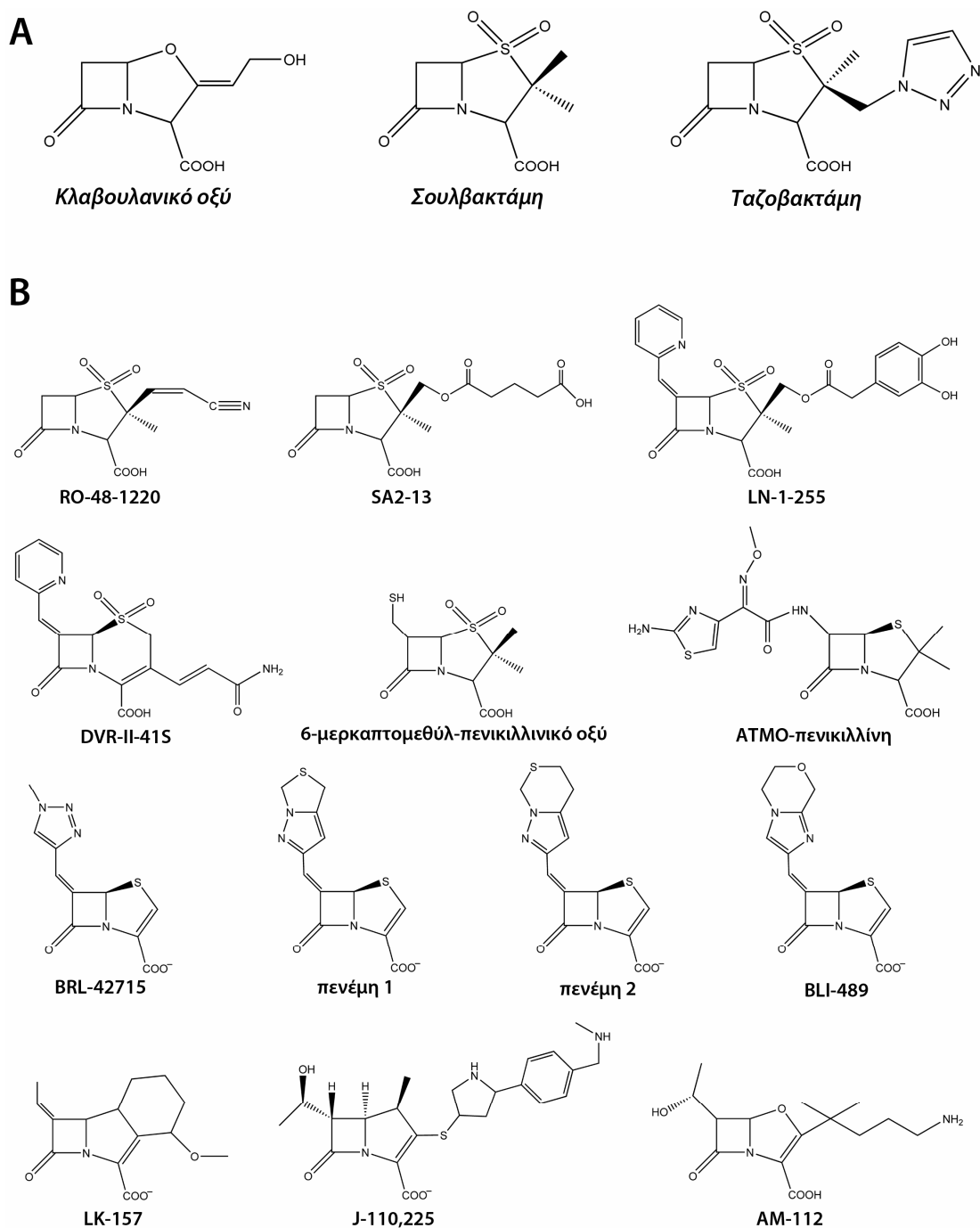
v. Κλαβουλανικό οξύ και άλλοι αναστολείς "αυτοκτονίας" β-λακταμασών

Η αναζήτηση β-λακταμικών στα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού του γένους *Streptomyces* απέδωσε και τον πρώτο ισχυρό αναστολέα β-λακταμασών. Το ίδιο έτος με την ανακάλυψη της θειεναμυκίνης βρέθηκε ότι το είδος *S. clavuligerus* παρήγαγε ένα β-λακταμικό μόριο που αναστείλει τη λειτουργία των πενικιλινασών ενώ δεν είχε αντιβακτηριακή δράση. Αυτό το β-λακταμικό ονομάστηκε κλαβουλανικό οξύ και ήταν συγγενικό μόριο με τις πενικιλίνες με τη διαφορά ότι στην θέση 1 του ετεροκυκλικού συστήματος αντί για θείο έφερε οξυγόνο (οξυπενάμη) (Brown και συν., 1976; Reading C. και Cole M., 1977). Στη θέση 2 του οξαζωλιδινικού δακτυλίου το κλαβουλανικό οξύ είναι υποκατεστημένο από υδροξυαιθυλιδενομάδα ενώ στη θέση 6 του β-λακταμικού δακτυλίου δεν υπάρχει υποκατάσταση (Εικόνα 12Α). Το κλαβουλανικό οξύ αναστέλλει τις πενικιλινάσες (και άλλες τάξης A β-λακταμάσες) ακυλιώνοντας την καταλυτική σερίνη ενώ το ακύλ-ένζυμο που δημιουργείται είναι σταθερό και δεν υδρολύεται εξ'αιτίας δευτερογενών αντιδράσεων που υφίσταται το δεσμευμένο β-λακταμικό (διάσπαση του δεσμού O1-C5). Ουσιαστικά δηλαδή το μόριο αυτό μιμείται το υπόστρωμα της β-λακταμάσης και την αναστέλλει χρησιμοποιώντας το μηχανισμό κατάλυσης ενώ το ένζυμο προσβάλλοντας τον β-λακταμικό δακτύλιο του αναστολέα "αυτοκτονεί" (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Η παραγωγή του κλαβουλανικού οξέος γίνεται ζυμωτικά χρησιμοποιώντας τροποποιημένα στελέχη *S. clavuligerus* ενώ το βιοσυνθετικό μονοπάτι του διαφέρει από αυτό των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών (Saudagar P. S. και συν., 2008).

Το κλαβουλανικό οξύ έδειξε τον δρόμο για τη σύνθεση και άλλων β-λακταμικών που συμπεριφέρονταν ως αναστολείς αυτοκτονίας β-λακταμασών. Τα μόρια αυτά ήταν παράγωγα του πενικιλινικού οξέος στα οποία το θείο του δακτυλίου θειαζολίνης είχε αντικατασταθεί από σουλφονύλ ομάδα (σουλφόνες πενικιλίνης) η οποία επίσης συμμετέχει σε δευτερογενείς αντιδράσεις στο στάδιο του ακύλ-ενζύμου. Η πρώτη σουλφόνη πενικιλίνης ήταν η σουλβακτάμη (Εικόνα 12Α) η οποία είχε συγκρίσιμες ιδιότητες με το κλαβουλανικό αναφορικά με την αναστολή πενικιλινασών (English, A. R. και συν., 1978). Ακολούθησε η σύνθεση της ταζοβακτάμης η οποία στην θέση 2 ήταν υποκατεστημένη από τριαζολική πλευρική αλυσίδα αυξάνοντας την ανασταλτική ικανότητα έναντι κάποιων β-λακταμασών τάξης A (Εικόνα 12Α) (Fisher J. και συν.,

1980). Όπως και το κλαβουλανικό οξύ οι δύο σουλφόνες είχαν ασθενή αντιβακτηριακή δράση. Τα τρία παραπάνω β-λακταμικά δεν ανέστελλαν τις υπόλοιπες τάξεις β-λακταμασών με καταλυτική σερίνη (τάξεις C και D) και τις μέταλλο-β-λακταμάσες (Bush K., 1988; Buynak J. D., 2006) με την ταζοβακτάμη να εμφανίζει *in vitro* κάποιο βαθμό ανασταλτικής δράσης έναντι ορισμένων τύπων κεφαλοσπορινασών (Bonomo R. A., 2001).

Οι αναστολείς αυτοί αποκαθιστήσουν την δράση των πενικιλινών σε στελέχη που παρήγαγαν τάξης A β-λακταμάσες και εισήλθαν σε σύντομο χρονικό διάστημα στην κλινική πράξη σε συνδυασμό με κάποια διευρυμένου ή εκτεταμένου φάσματος πενικιλίνη. Οι συνδυασμοί αυτοί είναι οι αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό οξύ (Augmentin), τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ, αμπικιλίνη-σουλβακτάμη και πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη. Οι συνδυασμοί πενικιλινών-αναστολέων αυτοκτονίας μπορούν να θεωρηθούν κλινικά επιτυχημένοι θεραπεύοντας πλήθος λοιμώξεων τόσο στην κοινότητα όσο και σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα ενώ κάποιοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη θεραπεία νοσοκομειακών λοιμώξεων από εντεροβακτήρια που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (π.χ. πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη) (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Ένα θέμα που προκύπτει από τη χρήση τους είναι το γεγονός ότι το κλαβουλανικό οξύ είναι επαγωγέας της έκφρασης του χρωμοσωμικού γονιδίου κεφαλοσπορινάσης των *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa* κ.α. με αποτέλεσμα να προκαλεί την υπερπαραγωγή του ενζύμου από τα βακτήρια αυτά και να τα καθιστά ανθεκτικά στην πενικιλίνη με την οποία συνδυάζεται (Livermore D. M. και συν., 1989; Lister P. D. και συν., 1999). Το παραπάνω φαινόμενο έχει θεωρηθεί ότι μπορεί να έχει κάποιες κλινικές επιπτώσεις και έχει προταθεί η χρήση του κλαβουλανικού σε συνδυασμό με κάποια τέταρτης γενεάς κεφαλοσπορίνη. Ο συνδυασμός κεφεπίμης με κλαβουλανικό οξύ εκτός από το παραπάνω πλεονέκτημα φαίνεται να αυξάνει επίσης και τη δράση αυτής έναντι των ΕΦΒΛ παραγωγών εντεροβακτηριακών (Livermore D. M. και συν., 2008). Εκτεταμένη χρήση των συνδυασμών αναστολέων αυτοκτονίας πενικιλινών οδήγησε στην επιλογή στελεχών που παράγουν μεταλλάκτες ή νέου τύπου ένζυμα που δεν αναστέλλονται από αυτούς.



Εικόνα 12: Α) Δομές β-λακταμικών αναστολέων αυτοκτονίας που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την απενεργοποίηση β-λακταμασών τάξης Α. Β) Προσπάθειες διέυρυνσης του φάσματος δράσης ανασταλτικών β-λακταμικών μορίων ώστε να είναι ενεργά και ως προς τις άλλες τάξεις β-λακταμασών. Τα μόρια αυτά βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο.

Η απενεργοποίηση και των άλλων τάξεων β-λακταμασών σερίνης πέρα της τάξης Α ή όλων μαζί ταυτόχρονα με την χρήση β-λακταμικών αναστολέων αυτοκτονίας

αποτελούσε και αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης καθώς αυτό θα διευκόλυνε σε σημαντικό βαθμό την αντιμετώπιση των των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά νοσοκομειακά (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Αρκετά μόρια με τις παραπάνω ιδιότητες έχουν συντεθεί αλλά δεν έχουν εισαχθεί ακόμα στην κλινική πράξη για ποικίλους λόγους όπως για παράδειγμα η διαφορετική φαρμακοκινητική σε σχέση με τα διαθέσιμα β-λακταμικά με τα οποία πρέπει να συνδυαστούν. Μία κατηγορία αναστολέων αυτού του είδους είναι οι C2 ή/και C6 υποκατεστημένες σουλφόνες πενικιλίνης οι οποίες προσέλκεισαν το ενδιαφέρον ύστερα από την επιτυχία της σουλβακτάμης και της ταζοβακτάμης (Richter H. G. και συν., 1996). Το πρώτο από αυτά έφερε υποκατάσταση ακρυλονιτριλίου στον C2 (RO-48-1220, Εικόνα 12B) και είχε παρόμοιες ιδιότητες με την ταζοβακτάμη κατά την αναστολή των τάξης A β-λακταμασών ενώ είχε καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι των ενζύμων τάξης C (Tzouvelekis L. S. και συν., 1997). Υποκατάσταση του C2 με μέθοξυ-άκυλο-βουτυρικό οξύ έδωσε το SA2-13 (Εικόνα 12B) το οποίο αν και ήταν πιο ασθενής αναστολέας από την ταζοβακτάμη αποδείχθηκε χρήσιμο καθώς αποκάλυψε κάποιες από τις μηχανιστικές παραμέτρους αναστολής των τάξης A β-λακταμασών από τις σουλφόνες πενικιλίνης (Padayatti P. S. και συν., 2006).

Η εμπειρία που είχε αποκτηθεί τόσο από τις κεφαλοσπορίνες/κεφαμυκίνες όσο και από τις καρβαπενέμες είχε δείξει ότι "ογκώδεις" υποκαταστάσεις στη θέση C6/C7 του δικυκλικού συστήματος οδηγούν σε σταθεροποίηση-παγίδευση του ακυλ-ενζύμου (και άρα μη-υδρόλυση) γεγονός που καθιστούσε τις τροποποιήσεις αυτού του είδους κατάλληλη στρατηγική για τη σύνθεση αναστολέων αυτοκτονίας. Υποκαταστάσεις με τις βέλτιστες ανασταλτικές ιδιότητες αφορούσαν μεθυλιδεν-ετεροκυκλικές αζωτούχες ομάδες. Έτσι το 6-(2-πυριδονύλ)-μεθυλιδέν παράγωγο μίας 2 υποκατεστημένης (με κατεχολύλ-ακετύλ-μεθύλ-ομάδα) σουλφόνης πενικιλίνης (LN-1-255, Εικόνα 12B) βρέθηκε ότι ανάστειλε σε νανομοριακές συγκεντρώσεις β-λακταμάσες των τάξεων A και D έχοντας επίσης δράση τόσο έναντι κάποιων κεφαλοσπορινασών όσο και ενζύμων τάξης A που υδρολύουν καρβαπενέμες (τα ένζυμα αυτά γενικά δεν αναστέλλονται αποτελεσματικά από τους κλινικά διαθέσιμους αναστολείς αυτοκτονίας) (Buynak J. D. και συν., 1999; Pattanaik P. και συν., 2009). Το μόριο αυτό εμφανίζει επίσης αυξημένη πρόσληψη από τα βακτήρια καθώς ο δακτύλιος κατεχόλης μιμείται τα φυσικά σιδεροφόρα που εκκρίνονται και επαναπροσλαμβάνονται μέσω ειδικών καναλιών της

εξωτερικής μεμβράνης (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Η πυριδονύλ-μεθυλιδέν ομάδα χρησιμοποιήθηκε και σε σουλφόνες κεφαλοσπορίνης υποκαθιστώντας την αντίστοιχη θέση (C7). Τα διάφορα μόρια που συντέθηκαν έφεραν ποικίλες υποκαταστάσεις στη θέση 3 με κάποιες από αυτές να ευνοούν την αναστολή των τάξης A και άλλες των τάξης C ενζύμων (Buynak J. D. και συν., 2000; Buynak J. D. και συν., 2002). Αυξημένη ηλεκτραρνητικότητα της 3 υποκατάστασης ευνοούσε την αναστολή και των δύο κατηγοριών. Ένα τέτοιο μόριο είναι το DVR-II-41S (Εικόνα 12B) το οποίο αναστέλλει σε νανομοριακές συγκεντρώσεις τις β-λακταμάσες των τάξεων A και C (Buynak J. D. και συν., 2000; Buynak J. D. και συν., 2002).

Οι σουλφόνες πενικιλίνης που φέρουν υποκατάσταση μόνο στη θέση 6 έχουν επίσης ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Κάποιες από αυτές εκτός από τις β-λακταμάσες με σερίνη στο ενεργό κέντρο μπορούν να αναστείλουν και μέταλλο-ένζυμα (τάξης B) όπως για παράδειγμα η 6-μερκαπτομεθύλ σουλφόνη πενικιλίνης (Εικόνα 12B) της οποίας η σουλφυδρολομάδα αλληλεπιδρά με τον καταλυτικό ψευδράργυρο καθιστώντας τον λιγότερο ενεργό (Buynak J. D. και συν., 2004). Η αμινο-θειαζόλ-μεθοξυίμινο πλευρική αλυσίδα των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος προστέθηκε επίσης και στον πενικιλινικό πυρήνα και το μόριο που προέκυψε (ATMO-πενικιλίνη, Εικόνα 12B) προκάλούσε περιορισμένου βαθμού αναστολή στις κεφαλοσπορινάσες (Trehan I. και συν., 2002).

Η τροποποίηση του πυρήνα των καρβαπενεμών (οι οποίες όπως αναφέρθηκε έχουν τα χαρακτηριστικά αναστολέα αυτοκτονίας) έδωσε επίσης μόρια με ισχυρές ανασταλτικές ιδιότητες. Η πιο σημαντική κατηγορία από αυτά τα παράγωγα είναι οι πενέμες (αντικατάσταση του C1 με θείο) με 6-μεθυλιδέν υποκατάσταση (Meroueh S. και συν., 2007). Η πρώτη μεθυλιδέν πενέμη ήταν το BRL-42715 το οποίο έφερε δακτύλιο τριαζόλης (Εικόνα 12B) και ανέστειλε ισχυρά τα ένζυμα των τάξεων A, C και D (Farmer, T. H. και συν., 1994; Matagne A. και συν., 1995). Το BRL-42715 αποτέλεσε τον οδηγό για τη σύνθεση και άλλων αναστολέων οι οποίοι στη μεθυλιδέν ομάδα έφεραν δι- και τρικυκλικές αζωτούχες υποκαταστάσεις (π.χ. πενέμη 1, πενέμη 2 και BLI-489, Εικόνα 12B) και εκτός από την ανασταλτική δράση έναντι των β-λακταμασών σερίνης επιδρούσαν και σε κάποια μέταλλο-ένζυμα (Weiss W. J. και συν., 2004; Venkatesan A. M., 2006). Ένα άλλο παράγωγο καρβαπενέμης με ανασταλτικές ιδιότητες είναι μία

τρινέμη η οποία στη θέση 6 έχει υποκατασταθεί από αιθυλιδέν ομάδα ενώ ο καρβαπενεμικός πυρήνας έχει συζευχθεί με κυκλοεξάνιο (LK-157, Εικόνα 12B). Το LK-157 είναι σχετικά ισχυρός αναστολέας για τα ένζυμα τάξης A και C αλλά δεν αναστέλει τα ένζυμα τάξης D (Vilar M. και συν., 2001; Copar A. και συν., 2002; Paukner S. και συν., 2009). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το J-110,225, μία "τυπική" 1-β-μέθυλο καρβαπενέμη (Εικόνα 12B), που αναστέλλει ισχυρά κάποιες μέταλλο-β-λακταμάσες ενώ απενεργοποιεί και τα ένζυμα των τάξεων A και C (Nagano R. και συν., 1999). Εκτεταμένο φάσμα αναστολής έχει και το AM-112 το οποίο είναι μία 6α-υδροξυ-αιθύλ οξαπενέμη (Εικόνα 12B) και αναστέλλει ισχυρά τα ένζυμα των τάξεων A, C και D (Jamieson C. E. και συν., 2003α; Jamieson C. E. και συν., 2003β).

vi. Μονοκυκλικές β-λακτάμες

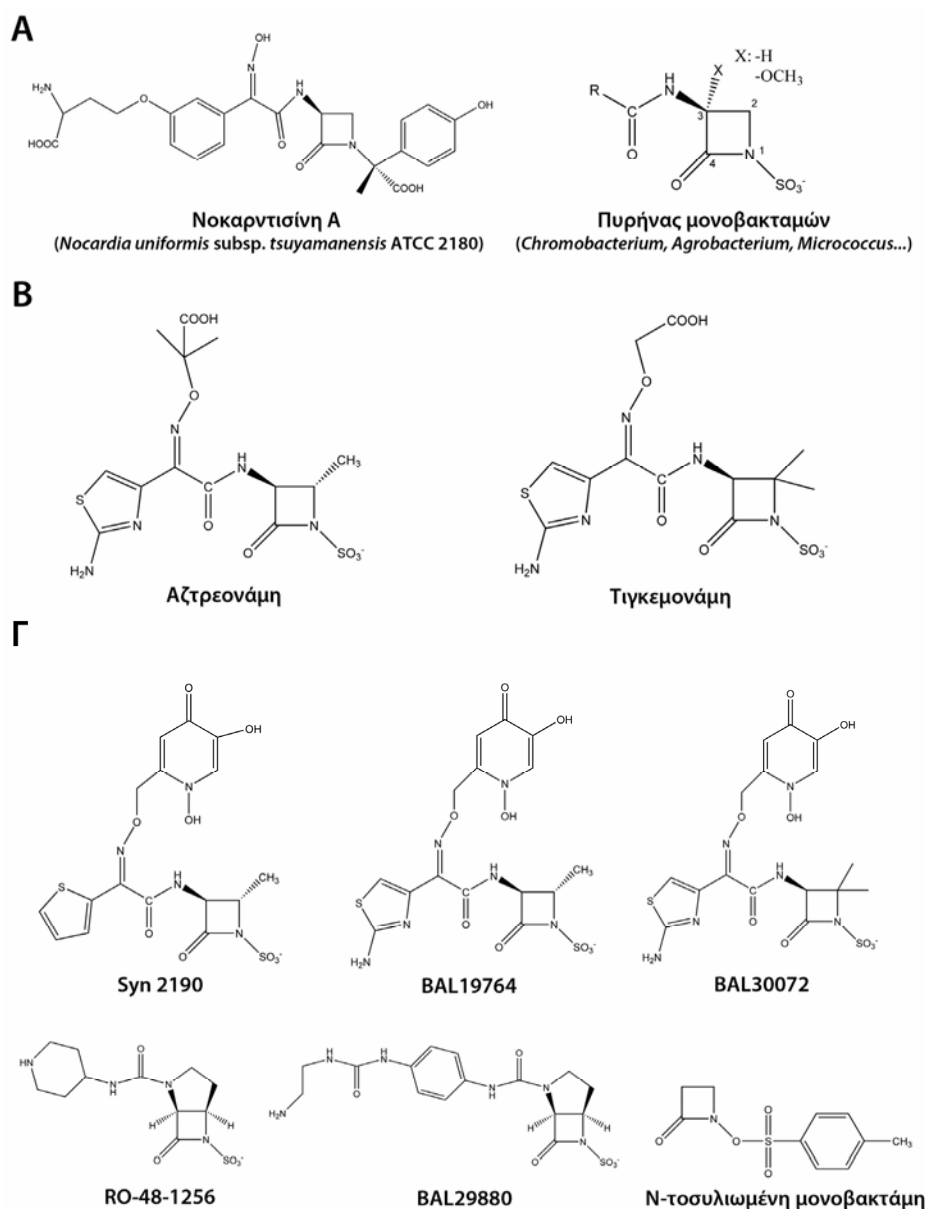
Οι μονοκυκλικές β-λακτάμες, ή μονοβακτάμες, είναι η τελευταία ομάδα αντιβιοτικών αυτού του είδους που βρέθηκε να παράγονται από βακτηριακά στελέχη. Η δομή τους χαρακτηρίζεται από το ότι ο β-λακταμικός δακτύλιος δεν είναι συμπυκνωμένος με κάποιον άλλο δακτύλιο. Η πρώτη φυσική μονοκυκλική β-λακτάμη είναι η νοκαρντισίνη A η οποία ανιχνεύθηκε σε διαδικασία ελέγχου αναστολής στελεχών *E. coli* από εκχυλίσματα καλλιεργειών διαφόρων Ακτινοβακτηρίων το 1975 (Aoki H. και συν., 1976). Την παρήγαγε το πρότυπο στέλεχος *Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanesis* ATCC 2180 και η δομή της αποτελούνταν από μία μεθύλ-κάρβοξυλ-ύδροξυφαινυλ υποκατάσταση στο άζωτο του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού δακτυλίου και από μία άκυλο-άμινο υποκατάσταση στον C3 του β-λακταμικού δακτυλίου που έφερε ύδροξυ-ίμινο ομάδα (Εικόνα 13A). Μόρια με παρόμοια δομή ανιχνεύθηκαν και σε στελέχη *Streptomyces* και σήμερα είναι γνωστά οκτώ από αυτά τα οποία συλλογικά ονομάζονται νοκαρντισίνες . Από τα παραπάνω β-λακταμικά μόνο η νοκαρντισίνη A είχε αντιβακτηριακή δράση αναστέλλοντας σε μέτριο βαθμό τα Gram αρνητικά και ασθενέστερα τα Gram θετικά ενώ εμφάνιζε ανοχή σε ενζυμική υδρόλυση (Hashimoto M. και συν., 1976; Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Δεν έγινε καμία προσπάθεια για βελτίωση των ιδιοτήτων των νοκαρντισινών και καμία από αυτές δεν χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη. Εν' τούτοις η νοκαρντισίνη A ίσως να ήταν η "πηγή έμπνευσης" για την προσθήκη οξυίμινο πλευρικών αλυσίδων στις κεφαλοσπορίνες

καθώς είναι το μόνο φυσικό β-λακταμικό που φέρει τέτοιου είδους υποκατάσταση και η ανακάλυψή του συνέπεσε με την σύνθεση της κεφουροξίμης, της πρώτης οξυίμινο κεφαλοσπορίνης.

Μία σειρά από άλλα β-λακταμικά ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1980 τα οποία αποτελούνταν από μη συζευγμένο β-λακταμικό δακτύλιο και στα οποία το άζωτο της αζετιδινόνης ήταν συνδεδεμένο με σουλφονικό ανιόν. Τα μόρια αυτά έχει καθιερωθεί να ονομάζονται μονοβακτάμες και παράγονταν από διάφορα βακτήρια των γενών *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Gluconobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* και *Staphylococcus* (Sykes R. B. και συν., 1981; Imada, A. και συν., 1981; Demain A. L. και Elander, R. P., 1999). Η θέση 3 του β-λακταμικού δακτυλίου των φυσικών μονοβακταμών ήταν υποκατεστημένη από διάφορες αμινο-άκυλο πλευρικές αλυσίδες (Εικόνα 13Α) ενώ κάποιες από αυτές έφεραν και 3-α-μέθοξυ υποκατάσταση (π.χ. η μονοβακτάμη του *Chromobacterium violaceum*). Οι φυσικές μονοβακτάμες έχουν ήπια αντιβακτηριακή δράση κυρίως κατά των Gram αρνητικών (Demain A. L. και Elander, R. P., 1999).

Οι φυσικές μονοβακτάμες αποτέλεσαν οδηγό για την ολική σύνθεση τροποποιημένων μορίων με βελτιωμένες ιδιότητες (Bonner D. P. και Sykes R. B., 1984). Υποκατάσταση με αμινοθειαζόλ-οξυίμινο ομάδα της αμινοάκυλο πλευρικής αλυσίδας έδωσε μόρια με κατά πολύ βελτιωμένες ιδιότητες και κλινικά χρήσιμα. Το περισσότερο πετυχημένο από αυτά είναι η αζτρεονάμη, η οποία φέρει την οξυίμινο πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης και στη θέση 2 του πυρήνα των μονοβακταμών είναι μέθυλο υποκατεστημένη (Εικόνα 13Β). Πρόκειται για αντιβιοτικό με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι μεγάλου αριθμού αερόβιων Gram αρνητικών συμπεριλαμβανομένης και της *P. aeruginosa* (Brogden R. N. και Heel R. C., 1986). Η αζτρεονάμη γενικά δεν υδρολύεται από καμία τάξη β-λακταμασών εκτός από των ΕΦΒΛ τάξης Α (Barry A. L. και συν., 1985; Gutmann L. και συν., 1988) ενώ συμπεριφέρεται ως ισχυρός αναστολέας των ενζύμων τάξης C απενεργοποιώντας τα σε νανομοριακές συγκεντρώσεις (Galleni M. και συν., 1988). Έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα σε χορήγηση από το στόμα και χρησιμοποιείται σε ενέσιμη μορφή. Επίσης για την καταπολέμηση πνευμονικών λοιμώξεων από *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση χορηγείται εισπνεόμενη με τη χρήση νεφελοποιητή. Η τιγκεμονάμη, η οποία φέρει την οξυίμινο πλευρική αλυσίδα

της κεφιζίμης και είναι διμέθυλο υποκατεστημένη στον C2 (Εικόνα 13B) μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα αλλά η χρήση αυτού του αντιβιοτικού είναι περιορισμένη (Fuchs P. C. και συν., 1988).



Εικόνα 13: Α) Φυσικές μονοκυκλικές β-λακτάμες. Οι νοκαρντισίνες δεν εισήλθαν ποτέ στην κλινική πράξη. Είναι τα μόνα φυσικά β-λακταμικά που φέρουν υδροξύιμινο ομάδα στην ακύλο-άμινο πλευρική αλυσίδα τους. Β) Συνθετικές μονοβακτάμες που φέρουν την οξυίμινο πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης (αζτρεονάμη) και της κεφιζίμης (τιγκεμονάμη). Η αζτρεονάμη είναι η μόνη μονοβακτάμη με ευρεία κλινική χρήση. Γ) Βελτίωση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των μονοβακτημών με προσθήκη σιδηροφόρου στην οξυίμινο πλευρική αλυσίδα τους. Δ) Προσπάθειες για βελτίωση των ανασταλτικών ιδιοτήτων των β-λακταμικών με γεφυροποίηση και τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων τους.

Οι ιδιότητες των οξυμίμο μονοβακταμών έχουν προσελκύσει εκ νέου το ενδιαφέρον και νέα παράγωγα αυτών βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης. Η στρατηγική σύνθεσης αφορά την προσθήκη 1,5-διϋδροξυ-4-πυριδόνης στην οξυμίμο πλευρική αλυσίδα (Syn 2190, BAL19764 και BAL30072, Εικόνα 13Γ) η οποία μιμείται τα φυσικά σιδεροφόρα και αυξάνει την πρόσληψη των αντιβιοτικών μέσω του βακτηριακού μονοπατιού εισόδου σιδήρου (Nishida K. και συν., 1999; Page M. G. και Heim J., 2009; Gaucher B. και συν., 2007). Η τροποποίηση αυτή αυξάνει την αντιβακτηριακή δράση έναντι των Gram αρνητικών και ιδιαίτερα έναντι των κλινικών στελεχών *P. aeruginosa*. Επίσης μελετάται και η δυνατότητα διεύρυνσης της αναστολής που προκαλούν οι μονοβακτάμες ώστε να απενεργοποιούν και άλλες τάξεις β-λακταμασών. Οι γεφυροποιημένες μονοβακτάμες RO-48-1256 και BAL29880 διατηρούν την ισχυρή ανασταλτική ικανότητα έναντι των τάξης C β-λακταμασών ενώ έχουν και κάποια δράση έναντι των τάξης A (Heinze-Krauss, I. και συν., 1998). Παρ'όλα αυτά δεν βελτιώνουν την *in vitro* αντιμικροβιακή δράση της πιπερακυλλίνης έναντι μικροοργανισμών που παράγουν τάξης A ένζυμα (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν και οι μονοβακτάμες που είναι N-υποκατεστημένες με όξυ-σουλφονύλ ομάδα με μία από αυτές (N-τοσύλ μονοβακτάμη, Εικόνα 13Γ) να είναι ισχυρός αναστολέας των β-λακταμασών τάξης A συμπεριλαμβανομένων κάποιων καρβαπενεμασών (Mourey L. και συν., 1998; Bulychen A. και συν., 2000).

Γ. Βακτηριακό τοίχωμα και μηχανισμός δράσης των β-λακταμών

Όπως αναφέρθηκε από τις πρώτες μελέτες με την βενζυλπενικιλίνη η ομάδα της Οξφόρδης είχε καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η αντιμικροβιακή δράση της οφείλεται στην λύση των βακτηρίων μέσω παρεμβολής στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος. Λύση παρατηρούνταν μόνο σε βακτηριακές καλλιέργειες που βρίσκονταν σε φάση αύξησης και στα κύτταρα τα οποία είχαν βρεθεί υπό την επίδραση του β-λακταμικού παρατηρούνταν συσσώρευση γλυκοζυλιωμένων νουκλεοτιδίων (πρόδρομα μόρια της βιοσύνθεσης του τοιχώματος) στο κυτταρόπλασμα και ασυνήθιστες κυτταρικές μορφολογίες. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα παραπάνω οφείλονται στην αναστολή βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, ενός κεντρικού συστατικού του βακτηριακού

τοιχώματος, της οποίας η δομή και λειτουργία αποκαλύφθηκε εν μέρει με τη βοήθεια των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Hammond S. M. και συν., 1984).

Τα βακτήρια ως μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί δεν διαθέτουν πολλές εξειδικευμένες κυτταρικές δομές για να επιτελέσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους. Η πιο σημαντική και εξειδικευμένη υπό-κυτταρική βακτηριακή δομή είναι το τοίχωμα. Πέρα από τη μηχανική στήριξη που παρέχει ώστε να αντισταθμιστούν οι αυξημένες εσωτερικές οσμωτικές πιέσεις επιτελεί και σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες όπως είναι η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, η αναγνώριση μοριακών μοτίβων που προέρχονται από το περιβάλλον τους (είτε αβιοτικά είτε από μικρο- και μεγαλοοργανισμούς με τους οποίους αλληλεπιδρούν), η κατάλληλη απόκριση στα μοριακά αυτά σήματα (π.χ. αλλαγή μορφολογίας, χημειοταξία, έκκριση μορίων τελεστών κλπ) και η κυτταρική διαίρεση. Η σημασία αυτού του προκαρυωτικού "μορφώματος" αντανακλάται και από το γεγονός ότι η δομή του είναι το κύριο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τους δύο κύριους εξελικτικούς κλάδους των βακτηρίων (βακτήρια με θετική και αρνητική χρώση Gram). Έτσι στα Gram αρνητικά βακτήρια το τοίχωμα αποτελείται από την λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, στη συνέχεια ακολουθεί μία στοιβάδα που αποτελείται από μόρια πολυσακχαριτών τα οποία φέρουν πεπτιδικές διακλαδώσεις και ενώνονται μεταξύ τους δημιουργώντας πλέγμα (πεπτιδογλυκάνη) ενώ μία εξωτερική λιπιδική μεμβράνη καλύπτει την παραπάνω δομή. Τα Gram θετικά δεν φέρουν την εξωτερική μεμβράνη με αποτέλεσμα χρωστικές που δεσμεύονται στο μόριο της πεπτιδογλυκάνης να τα βάφουν ειδικά και να τα διαχωρίζουν από τους παραπάνω μακρινούς συγγενείς τους (π.χ. η χρωστική Gram). Οι παραπάνω κεντρικές δομές των βακτηριακών τοιχωμάτων πλαισιώνονται και από άλλα μόρια πρωτεϊνικής, πολυσακχαριτικής και λιπιδικής φύσης τα οποία έχουν δομικό ή/και λειτουργικό ρόλο (π.χ. για τα Gram αρνητικά πορίνες εξωτερικής μεμβράνης, λιποπολυσακχαρίτες εξωτερικής μεμβράνης, καψιδιακοί πολυσακχαρίτες και για τα Gram θετικά λιποτειχοϊκά οξέα, πρωτεΐνη A και έξωπολυσακχαρίτες) (Hammond S. M. και συν., 1984).

Η πεπτιδογλυκάνη είναι μόριο κλειδί στη δομή και λειτουργία του βακτηριακού τοιχώματος. Λειτουργεί ως εξωσκελετός παρέχοντας δομική στήριξη αλλά και καθορίζει τη μορφολογία του βακτηριακού κυττάρου (Holtje J. V., 1998; Scheffers D. J. και Pinho

M. G., 2005) ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο του βακτηρίου (συμμετέχει και ενδέχεται να συντονίζει την επιμήκυνση και την διαίρεση του βακτηριακού κυττάρου σε μία διαδικασία που είναι συζευγμένη με την αντιγραφή του χρωμοσωμικού DNA; Scheffers D. J., 2001). Η δομή και λειτουργία της πεπτιδογλυκάνης είναι αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης καθώς πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα (μερικά από αυτά πολύ ουσιώδη όπως για παράδειγμα ποια είναι η τρισδιάστατη διαμόρφωσή της; Meroueh S. O. και συν., 2006; Vollmer W. και Seligman S. J., 2010). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από ένα δίκτυο μη-διακλαδισμένων πολυσακχαριτών (αλυσίδες γλυκάνης) οι οποίοι σχηματίζονται από περίπου 200 υπομονάδες δισακχαριτών που διασυνδέονται με πεπτιδικές αλυσίδες μικρού μήκους. Το σύστημα αυτό σχηματίζει ένα ενιαίο μόριο που περιβάλλει το κύτταρο και με κατάλληλη επεξεργασία μπορεί να απομονωθεί και να παρατηρηθεί σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου ομοιάζει με σάκκο (*sacculi*) (Hammond S. M. και συν., 1984). Η χημική σύσταση του τυπικού πέπτιδο-δισακχαρίτη (Εικόνα 14A) αποτελείται από τη Ν-ακέτυλο-γλυκοσαμίνη συνδεδεμένη με δεσμό O-β-1,4 με Ν-ακέτυλο-μουραμικό οξύ του οποίου η ομάδα γαλακτικού οξέος είναι συνδεδεμένη μέσω αμιδικού δεσμού με ένα τετραπεπτιδίο που συνήθως αποτελείται από L-αλανίνη, D-γλουταμικό οξύ, μέσο-διαμινοπιμελικό οξύ (με τον άνθρακα στον πεπτιδικό δεσμό να έχει διαμόρφωση L και το οπτικά ενεργό κέντρο της πλευρικής αλυσίδας D) και D-αλανίνη (η παραπάνω υπομονάδα ονομάζεται και μουροπεπτιδίο και το πολυμερές που δομούν τα μουροπεπτιδία αυτά -η πεπτιδογλυκάνη δηλαδή- μουρείνη). Σημειώνεται ότι το D-Glu συμμετέχει στην πεπτιδική αλυσίδα μέσω του καρβονυλίου του γ-καρβοξυλίου του (δηλαδή της πλευρικής αλυσίδας) και όχι με το καρβονύλιο της α-θέσης (Εικόνα). Οι δισακχαρίτες αυτοί ενώνονται με δεσμούς β-1,4 και σχηματίζουν αλυσίδες γλυκάνης ενώ οι γειτονικές αλυσίδες διασυνδέονται μεταξύ τους μέσω του καρβονυλίου της D-Ala της θέσης 4 του τετραπεπτιδίου και της αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας του μέσο-διαμινοπιμελικού οξέος της θέσης 3 (Εικόνα 14B). (Hammond S. M. και συν., 1984; Holtje J. V., 1998; Scheffers D. J. και Pinho M. G., 2005)

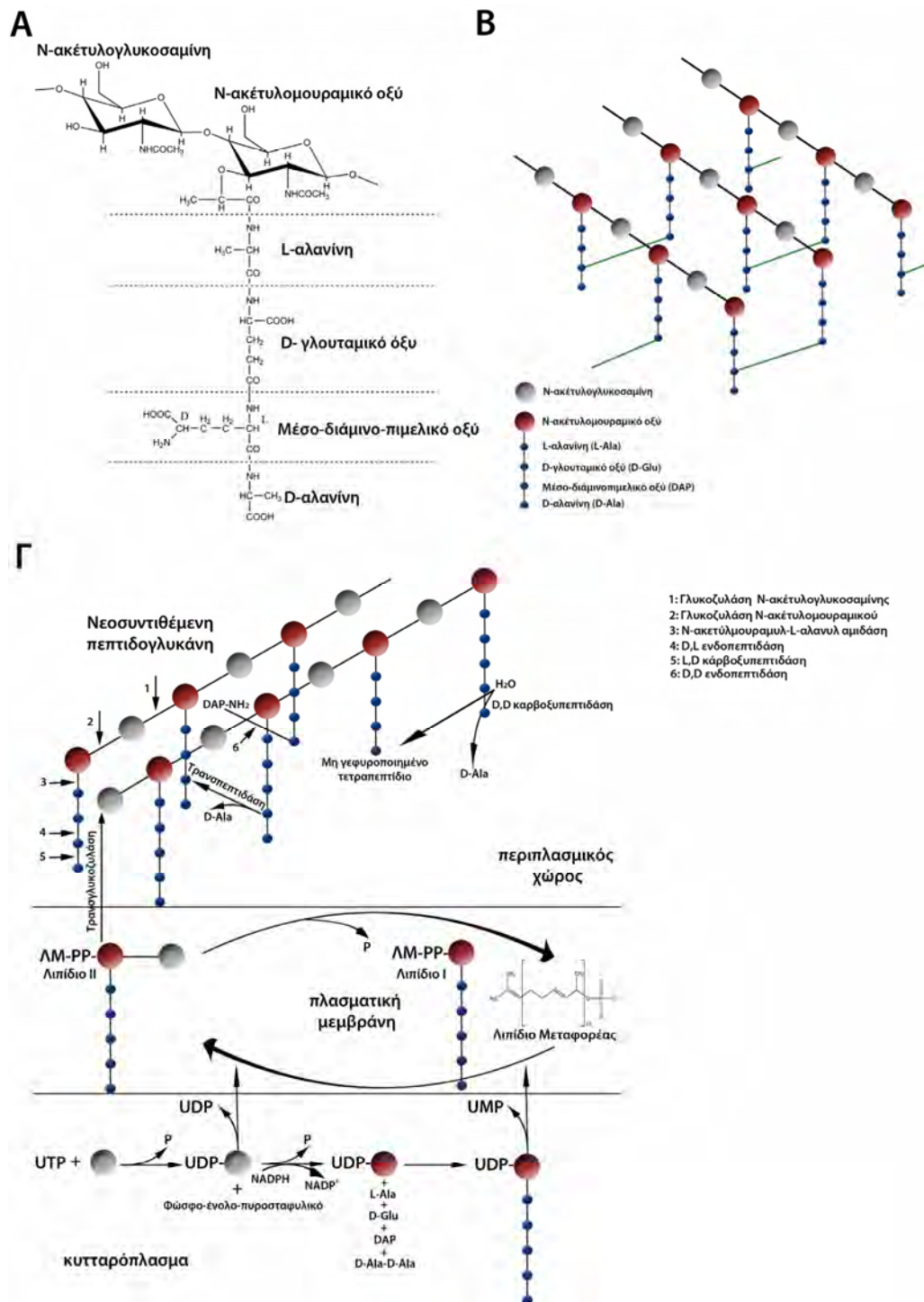
Η παραπάνω δομή είναι τυπική για το *E. coli* και τα περισσότερα Gram αρνητικά βακτήρια. Οι διαφοροποιήσεις που υφίστανται και απαντούν συνήθως στα Gram θετικά αφορούν την σύσταση και τη διασύνδεση των τετραπεπτιδίων. Έτσι σε αρκετά Gram

θετικά εκτός από το DAP το τρίτο αμινοξύ μπορεί να είναι η L-λυσίνη ενώ παράλληλα η διασύνδεση μεταξύ γειτονικών αλυσιδών δεν γίνεται απευθείας μεταξύ του τρίτου και τέταρτου καταλοίπου αλλά παρεμβάλλεται κάποιο πεπτίδιο (π.χ. στον *S. aureus* η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος στη θέση 3 συνδέεται με το καρβοξύλιο της D-Ala στη θέση 4 γειτονικών αλυσίδων μέσω ενός πενταπεπτιδίου D-γλυκίνης; Schneider T. και συν., 2004). Επίσης το ελεύθερο α-καρβοξύλιο του D-Glu στη θέση 2 μπορεί να συνδέεται με μία αμινομάδα ή να είναι περαιτέρω υποκατεστημένο (όταν στη θέση 3 βρίσκεται λυσίνη το καρβοξύλιο δεν είναι ποτέ ελεύθερο) (Hammond S. M. και συν., 1984). Εκτός από την διασύνδεση 4→3 στις περιπτώσεις που λείπει το τέταρτο αμινοξύ έχει αναφερθεί και διασύνδεση 3→3 η οποία φαίνεται να είναι συχνή στα μυκοβακτήρια αλλά και στο *E. coli* όταν αυτό εισέρχεται στη φάση στασιμότητας (Wietzerbin J. και συν., 1974; Tuomanen E. και Cozens R., 1987). Διαφοροποιήσεις αφορούν επίσης και τα σάκχαρα της πεπτιδογλυκάνης και κυρίως το μουραμικό οξύ το οποίο μπορεί να είναι ακετυλιωμένο στην θέση 6 (π.χ. στον *S. aureus*). Ο βαθμός διασύνδεσης στο μόριο της πεπτιδογλυκάνης διαφέρει επίσης μεταξύ των μικροοργανισμών με το *E. coli* να έχει περίπου 20% από τα τετραπεπτιδιά του γεφυρωποιημένα και το αντίστοιχο ποσοστό στον *S. aureus* να είναι >90%. (Hammond S. M. και συν., 1984; Scheffers D. J. και Pinho M. G., 2005)

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 14Γ) λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια με το πρώτο να αφορά την σύνθεση των πρόδρομων μορίων στο κυτταρόπλασμα, το δεύτερο τη μεταφορά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια ενός κατάλληλου φωσφολιπιδίου-μεταφορέα και το τρίτο την διασύνδεση με την υπάρχουσα επιμηκυνόμενη πεπτιδογλυκάνη (Vollmer W. και Bertsche U., 2008). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι ξεκινάει με την φόρτιση της N-ακέτυλο-γλυκοσαμίνης με διφωσφορική ουριδίνη. Η UDP-GlcNAc μετατρέπεται σε UDP-N-ακέτυλο-μουραμικό οξύ αντιδρώντας αρχικά με φώσφο-ένολο-πυροσταφυλικό οξύ και το μόριο που προκύπτει ανάγεται από μία NADPH-αναγωγή. Το UDP-MurNAc αντιδρά αρχικά με L-Ala σχηματίζοντας αμιδικό δεσμό και στην συνέχεια προστίθενται διαδοχικά τα D-Glu, DAP και το διπεπτίδιο D-αλανύλ-D-αλανίνη το οποίο συντίθεται ανεξάρτητα (Barreteau H. και συν., 2008). Το UDP-φορτισμένο μouro-πενταπεπτίδιο στην συνέχεια μεταφέρεται σε ένα ενεργοποιημένο με φωσφορική ομάδα λιπίδιο (ανδεκαπρενύλ-φωσφορικό οξύ, ή

βακτροπενόλη το οποίο συμμετέχει στην βιοσύνθεση και άλλων συστατικών του τοιχώματος) μέσω δημιουργίας πυροφωσφορικού δεσμού στην θέση 1 και απελευθέρωσης UMP. Στο παραπάνω μόριο (λιπίδιο I) που βρίσκεται στην εσωτερική λιπιδική στοιβάδα προστίθεται η UDP-GlcNAc μέσω β -1,4 δεσμού με το MurNAc και απελευθέρωσης UDP. (Bouhss A. και συν., 2008). Οι δύο παραπάνω αντιδράσεις καταλύονται από μεμβρανικά ένζυμα. Το βακτροπενόλ-διφωσφορικό δισακχαριτικό πενταπεπτίδιο (λιπίδιο II) στην συνέχεια μεταφέρεται στην εξωτερική στοιβάδα (πιθανώς από την δράση κάποιας φλιπάσης ή άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών; Poulsen L. R. και συν., 2008; Mohammadi T. και συν., 2011) όπου συνδεεται με την GlcNAc προϋπάρχουσας αλυσίδας πεπτιδογλυκάνης μέσω β -1,4 δεσμού και απελευθερώνει το πυροφώσφο-βακτροπενόλ (Valvano M. A., 2008). Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από ένζυμα με ενεργότητα τρανσγλυκοζυλάσης (Lovering A. L. και συν., 2007).

Τα νέα μουροπεπτίδια που μεταφέρονται στην πεπτιδογλυκάνη μπορούν να γεφυροποιηθούν με αυτά γειτονικών αλυσιδών ταυτόχρονα με την αντίδραση τρανσγλυκοζυλίωσης καθώς η πρωτεΐνη που φέρει την ενεργότητα τρανσγλυκοζυλάσης συνήθως διαθέτει και επικράτεια με ενεργότητα τρανσπεπτιδάσης (Εικόνα 14Γ). Η αντίδραση διασύνδεσης περιλαμβάνει αναγνώριση του τελικού D-Ala-D-Ala του νέου μουροπεπτιδίου και της πλευρικής αλυσίδας του μέσο-διάμινοπιμελικού οξέος γειτονικής πεπτιδογλυκάνης από την τρανσπεπτιδάση και μεταφορά του D-Ala καρβονυλίου της θέσης 4 της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας στην αμινομάδα του m-DAP με ταυτόχρονη απομάκρυνση της καρβοξυτελικής D-Ala του πενταπεπτιδίου (Vollmer W. και Bertsche U., 2008). Η αντίδραση διασύνδεσης δεν συμβαίνει πάντα ταυτόχρονα με την τρανσγλυκοζυλίωση και ένζυμα που φέρουν μόνο ενεργότητα τρανσπεπτιδάσης μπορούν να δράσουν σε μεταγενέστερα στάδια της επιμήκυνσης της πεπτιδογλυκάνης. Πάντως το ποσοστό των μουρο-πενταπεπτιδίων που απαντά στο μόριο της πεπτιδογλυκάνης διατηρείται χαμηλό εξαιτίας της δράσης D,D-καρβοξυπεπτιδασών οι οποίες υδρολύουν τον πεπτιδικό δεσμό D-Ala-D-Ala απομακρύνοντας το τελικό αμινοξύ. Η δράση ενζύμων αυτού του είδους αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης του βαθμού διασύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης καθώς οι τρανσπεπτιδάσες μπορούν να καταλύσουν την σύνδεση D-Ala-m-DAP μόνο στην περίπτωση που η αλυσίδα-δότης είναι πενταπεπτίδιο με τελικό D-Ala-D-Ala (Hammond S. M. και συν., 1984).



Εικόνα 14: Α) Δομή της υπομονάδας πεπτιδογλυκάνης. Β) Διασύνδεση 3-4 με DD πεπτιδικούς δεσμούς κατά τη δόμηση μορίων μουρείνης. Παρουσιάζεται μία διάσταση αλλά η διαδυνδέσεις μπορούν να γίνουν σε περισσότερες δημιουργώντας στρώματα αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης. Γ) Βιοσύνθεση πεπτιδογλυκάνης και δράση αποικοδομητικών ενζύμων που συμμετέχουν στην διαδικασία ανακύκλωσης αυτής. Η δομή του βακτηριακού τοιχώματος καθορίζεται από την ισορροπημένη δράση βιοσυνθετικών και αποικοδομητικών ενζύμων. Τα β-λακταμικά αναστέλλουν το στάδιο 3-4 DD διασύνδεσης κατά την είσοδο νέων υπομονάδων στο τοίχωμα που καταλύεται από τρυσπεπτιδάσες και την απομάκρυνση της τελικής αλανίνης που καταλύεται από D,D κάρβοξυπεπτιδάσες που συμμετέχουν στην αναδιάταξη της πεπτιδογλυκάνης.

Εκτός από ένζυμα με την παραπάνω ενεργότητα επί της μουρεΐνης δρουν και άλλες βακτηριακές υδρολάσες που διασπούν διάφορους δεσμούς του μορίου (Εικόνα 14Γ). Έτσι οι γλυκοζυλάσες της N-ακετυλογλυκοσαμίνης διασπούν τον δεσμό GlcNAc-β-1,4-MurNAc άλλα ένζυμα διασπούν τον δεσμό MurNAc-β-1,4-GlcNAc. Ειδικές αμιδάσες διασπούν τον δεσμό μεταξύ του μουραμικού οξέος και της L-Ala ενώ η πεπτιδική αλυσίδα μπορεί να υδρολυθεί μεταξύ των θέσεων 2 και 3 και μεταξύ 3 και 4 από D,L-ενδοπεπτιδάσες και L,D-καρβοξυπεπτιδάσες αντίστοιχα. Τέλος ειδικές ενδοπεπτιδάσες (D,D-ενδοπεπτιδάσες) μπορούν να υδρολύσουν τις διασυνδέσεις μεταξύ γειτονικών αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης, έχουν δηλαδή δράση αντίθετη από αυτή των τρανσπεπτιδασών, δημιουργώντας την δυνατότητα για νέες διασυνδέσεις (Vollmer W. και συν., 2008).

Αρκετά από τα παραπάνω αυτολυτικά ένζυμα (αυτολυσίνες) συμμετέχουν στην διαδικασία ανακύκλωσης της πεπτιδογλυκάνης με τα προϊόντα της αποικοδόμησης (συνήθως δι- και τρι-μουροπεπίδια) να επανεισέρχονται στο κυτταρόπλασμα μέσω κατάλληλων καναλιών και να επαναπροωθούνται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μουρεΐνης (για το *E. coli* έχει βρεθεί ότι το 90 % των προϊόντων αποικοδόμησης χρησιμοποιείται ξανά στο τοίχωμα). Αυτή η δυναμική διαδικασία συνεχούς σύνθεσης και αποικοδόμησης καθορίζει τη δομή του τοιχώματος η οποία μπορεί να αναμορφωθεί όταν αυτό απαιτηθεί μέσω κατάλληλης ρύθμισης της λειτουργίας των ενζύμων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ανακύκλωσης της πεπτιδογλυκάνης (Wyckoff T. J. και συν., 2012; Johnson J. W. και συν., 2013). Αν και οι μηχανισμοί ρύθμισης της ανακύκλωσης της μουρεΐνης δεν έχουν διακριβωθεί πλήρως αυτοί σίγουρα υφίστανται και είναι αυστηροί. Απόδειξη για αυτό αποτελεί το σχεδόν πανομοιότυπο και κληρονομίσιμο μέγεθος και σχήμα των κυττάρων σε μία καλλιέργεια βακτηρίων του ίδιου είδους (Cabeen M. T. και Jacobs-Wagner C., 2005; Young K. D., 2006).

Αρκετά από τα μόρια που συμμετέχουν στην δόμηση του τοιχώματος δεν απαντούν σε κανένα άλλο οργανισμό παρά μόνο στα βακτήρια (π.χ. τα D αμινοξέα, το μουραμικό οξύ και το δι-αμινοπιμελικό οξύ). Έτσι τα αντιβιοτικά που στοχεύουν το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα συνήθως εμφανίζουν πολύ μικρή τοξικότητα στον άνθρωπο και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η φύση εκμεταλλευόμενη τη μοναδικότητα κάποιων συστατικών του τοιχώματος κατασκεύασε μόρια τα οποία

μιμούνται τα δομικά αυτά στοιχεία και περιεμβάλλονται στα διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης (Koch A. L., 2003). Ο αμιδικός δεσμός του β-λακταμικού δακτυλίου προσομοιάζει τον αντίστοιχο του D-Ala-D-Ala διπεπτιδίου στο καρβοξυτελικό άκρο των νεοσυντιθέμενων μouro-πενταπεπτιδίων και η βιολογική δράση των β-λακταμικών βασίζεται στην δέσμευσή τους στα ένζυμα που αναγνωρίζουν αυτό το συστατικό.

Τα β-λακταμικά ουσιαστικά βοήθησαν στην ανακάλυψη των παραπάνω ενζύμων (Waxman D. J. και συν., 1980; Hammond S. M. και συν., 1984) που ονομάστηκαν συλλογικά πενικιλοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) και φέρουν κυρίως ενεργότητες τρανσπεπτιδάσης ή D,D-καρβοξυπεπτιδάσης. Διάφορα συστήματα κατάταξης έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίησή τους (Ghuysen J. M., 1991; Goffin C. και Ghuysen J. M., 2002; Macheboeuf, P. και συν., 2006) βάσει του μεγέθους και των ενεργοτήτων τους. Παρακάτω δίνεται η ταξινόμηση των PBPs βάσει της θεωρητικής *in vivo* δράσης τους (Ghuysen J. M., 1991). Έτσι οι PBPs υψηλής μοριακής μάζας τάξης A (HMMA, στο *E. coli* οι PBP1a, 1b και 1c) είναι δι-λειτουργικά ένζυμα με ενεργότητα τρανσγλυκοζυλάσης και τρανσπεπτιδάσης ενώ οι PBPs υψηλής μοριακής μάζας τάξης B (HMMB, οι PBP2 και PBP3 του *E. coli*) φέρουν μόνο ενεργότητα τρανσπεπτιδάσης. Στις PBPs υψηλής μοριακής μάζας κατηγοριοποιούνται και πρωτεΐνες που δεν έχουν δράση στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης αλλά λειτουργούν ως αισθητήρες πενικιλίνης και επάγουν την έκφραση γονιδίων αντοχής (BlaR: *B. licheniformis* και *S. aureus*, επαγωγή έκφρασης γονιδίου β-λακταμάσης και MecR: *S. aureus* και *S. epidermidis* επαγωγή του γονιδίου ανθεκτικής στην πενικιλίνη τρανσπεπτιδάσης PBP2a; κατηγοριοποιούνται στις PBPs υψηλής μοριακής μάζας τάξης C; Zhang, H. Z. και συν., 2001; Fisher J. F. και συν., 2005). Οι πενικιλοδεσμευτικές πρωτεΐνες χαμηλής μοριακής μάζας των τάξεων A και B (LMMA και LMMB, στο *E. coli* οι PBP5 και PBP6 αντίστοιχα) είναι D,D-καρβοξυπεπτιδάσες. Συνήθως αυτήν την καταλυτική ενεργότητα διαθέτουν και κάποιες PBPs χαμηλής μοριακής μάζας τάξης C (LMMC) οι οποίες ενδέχεται να είναι παράλληλα (*E. coli* PBP4) ή μεμονωμένα (*E. coli* PBP7) και D,D-ενδοπεπτιδάσες.

Οι πεπτιδο-τροποποιητικές επικράτειες των PBPs ανήκουν στην κατηγορία των ακύλ-τρανσφερασών σερίνης που χαρακτηρίζονται από το καταλυτικό μοτίβο SerXXLys (εξάιρεση αποτελεί μία PBP του *S. albus* G που είναι ένζυμο εξαρτώμενο από Zn^{2+} ;

Massova I. και Mobashery S., 1998). Ο μηχανισμός κατάλυσης βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή του οξυγόνου του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης (το οποίο ενεργοποιείται από την πλευρική αλυσίδα κάποιου αμινοξέος που λειτουργεί ως βάση και συνήθως είναι η αποπρωτονιωμένη μορφή της λυσίνης του μοτίβου SXXK) στον άνθρακα του καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού D-Ala-D-Ala (Εικόνα 15A). Το τετραεδρικό ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας που δημιουργείται και φέρει οξυανιόν σταθεροποιείται μέσω δύο αμιδικών ομάδων του σκελετού του ενζύμου με τη μία να ανήκει στην καταλυτική σερίνη και την άλλη στο αμινοξύ που ακολουθεί το συντηρημένο μοτίβο K(H)TG(S) (οπή οξυανιόντος). Ο αμιδικός δεσμός στο τετραεδρικό ενδιάμεσο διασπάται με το άζωτο της αποχωρούσας αμινομάδας της καρβοξυτελικής D-Ala να έλκει ηλεκτρόνια από αυτόν και να τα μεταφέρει σε ένα πρωτόνιο που συνήθως παρέχεται από την πλευρική αλυσίδα του πρώτου αμινοξέος της συντηρημένης τριπλέτας Y(S)XN με την ταυτόχρονη δράση της λυσίνης του SXXK (Fisher J. F. και συν., 2005; Pratt R. F., 2008). Το ακυλένζυμο που δημιουργείται στην περίπτωση των τρανσπεπτιδασών αμινολύεται από την πρωτοταγή αμίνη της πλευρικής αλυσίδας του m-DAP με αποτέλεσμα την διασύνδεση D-Ala-m-DAP ενώ στην περίπτωση των καρβοξυπεπτιδασών υδρολύεται με απελευθέρωση μouro-τετραπεπτιδίου (Fisher J. F. και συν., 2005; Pratt R. F., 2008). Η κατάρρευση του ακυλ-ενζύμου (αντίδραση απακυλίωσης) στις δύο παραπάνω περιπτώσεις λαμβάνει χώρα μέσω δημιουργίας τετραεδρικών ενδιαμέσων τα οποία σταθεροποιούνται όπως και στην περίπτωση της ακυλίωσης. Οι D,D-ενδοπεπτιδάσες χρησιμοποιούν παρόμοιο μηχανισμό με τις καρβοξυπεπτιδάσες με την διαφορά ότι αναγνωρίζουν την διασύνδεση D-Ala-m-DAP. (Pratt R. F., 2008)

Η δέσμευση των μouroπεπτιδίων στο ενεργό κέντρο των PBPs αρχικά περιλαμβάνει την αναγνώριση του καρβοξυλίου του αποχωρούντος αμινοξέος από κάποιο θετικά φορτισμένο αμινοξύ του ενζύμου. Στην συνέχεια το καρβονύλιο του υπό διάσπαση πεπτιδικού δεσμού τοποθετείται στην οπή οξυανιόντος και δέχεται την επίθεση της ενεργοποιημένης σερίνης με την ενέργεια της κατάστασης μετάπτωσης να διατηρείται χαμηλή εξαιτίας της "εξουδετέρωσης" του αρνητικού φορτίου από τις δύο αμινομάδες της οπής και άλλων ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποστρώματος και του ενεργού κέντρου που διαχέουν την υψηλή ενέργεια

που αναπτύσσεται τοπικά. Η ισχύς των αλληλεπιδράσεων αυτών και άρα η απόδοση ακυλίωσης είναι συνάρτηση του βαθμού συμπληρωματικότητας του ενεργού κέντρου με την εκάστοτε κατάσταση μετάπτωσης με την συμπληρωματικότητα αυτή να καθορίζει την ειδικότητα των PBPs για συγκεκριμένα πεπτιδικά υποστρώματα. Το καρβονύλιο του πεπτιδικού δεσμού που προηγείται της D-Ala φαίνεται ότι επίσης αναγνωρίζεται ειδικά από συγκεκριμένα κατάλοιπα των ενζύμων και συμμετέχει στο παραπάνω σταθεροποιητικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων (Fisher J. F. και συν., 2005).

Οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες διαθέτουν τις παραπάνω θέσεις αναγνώρισης του N-ακύλ-D-Ala-D-Ala τελικού τμήματος των νεοσυντιθέμενων μουροπενταπεπτιδίων και μάλιστα σε ανάλογη διαμόρφωση. Οι τρεις δομές μοιράζονται τον κοινό σκελετό CO-N-C-CO-N-C-COO⁻ με τα δύο ασύμμετρα κέντρα του D-Ala-D-Ala να είναι της ίδιας διαμόρφωσης με τα αντίστοιχα των β-λακταμικών (Εικόνα 15Γ; Goffin C. και Ghuysen J. M., 2002). Ο παραπάνω σκελετός στις τρεις δομές δεν είναι ισοστερικός εφόσον η γεωμετρία του αμιδικού δεσμού μεταξύ των δύο αλανινών και αυτού του β-λακταμικού δακτυλίου διαφέρει σημαντικά. Έτσι η γωνία που σχηματίζει το καρβονύλιο με τα γειτονικά του άτομα (α) είναι 117° στο μουροπεπτιδίο και 90° στα β-λακταμικά ενώ η γωνία δίδρο του C-N δεσμού (ω) είναι 180° στα πεπτιδία, 155° στις κεφαλοσπορίνες και 135° στις πενικιλίνες. Η δομική αναλογία μεταξύ των β-λακταμικών και του τελικού διπεπτιδίου οφείλεται στην κατανομή των αρνητικών ηλεκτροστατικών πεδίων που δημιουργούνται i) από το καρβοξύλιο της θέσης C3/C4 των συστημάτων πενάμης και κεφέμης και από το καρβοξύλιο της τελικής D-Ala (θέση αναγνώρισης 1, Εικόνα 15Γ, Δ) ii) από το καρβονύλιο του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού δακτυλίου και του πεπτιδικού του D-Ala-D-Ala (θέση αναγνώρισης 2, Εικόνα 15Γ, Δ) και iii) του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού της άμινο-άκυλο υποκατάστασης των β-λακταμικών και του 3-4 πεπτιδικού δεσμού των μουροπεπτιδίων (θέση αναγνώρισης 3, Εικόνα 15Γ, Δ). Οι τρεις παραπάνω ομάδες βρίσκονται σχεδόν στο ίδιο επίπεδο και οι μεταξύ τους αποστάσεις είναι παρεμφερείς και στις τρεις δομές με την απόσταση του οξυγόνου στην ομάδα 2 από τον άνθρακα στην ομάδα 1 να είναι από 3,5 έως 4,5 Å και των ατόμων οξυγόνων των ομάδων 2 και 3 να είναι περίπου 4,8 Å (Εικόνα 15Δ). (Goffin C. και Ghuysen J. M., 2002)

Αυτή η σχεδόν ταυτόσημη διεύθετηση των ηλεκτραρνητικών ομάδων των β-λακταμικών με τις αντίστοιχες των υποστρωμάτων των PBPs οδηγεί στην δέσμευσή τους στο ενεργό κέντρο των ενζύμων και στην αποδοτική ακυλίωση της καταλυτικής σερίνης με ταυτόχρονο "άνοιγμα" του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού χρησιμοποιώντας τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου (Ghuysen J. M., 1991; Pratt R. F., 2002). Στο ακυλένζυμο που δημιουργείται η αποχωρούσα αμινομάδα παραμένει δεσμευμένη εφόσον αυτή στα β-λακταμικά είναι κυκλοποιημένη. Το ακυλ-ένζυμο των β-λακταμικών με τις PBPs είναι σταθερό και δεν μπορεί να συμμετάσχει σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης (πιθανότατα εξαιτίας στερεοχημικής παρεμπόδισης από το άζωτο του ανοιγμένου β-λακταμικού δακτυλίου. Pratt R. F., 2002) με την υδρόλυση που παρατηρείται στις καρβοξυπεπτιδάσες και στις ενδοπεπτιδάσες να είναι πολύ χαμηλή. Έτσι τα β-λακταμικά μιμούμενα ορισμένα χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων των D,D-πεπτιδο-τροποποιητικών ενζύμων ακυλιώνουν "μόνιμα" το καταλυτικό αμινοξύ αυτών διακόπτοντας την λειτουργία τους (Εικόνα 15B).

Οι άλλες ομάδες β-λακταμικών διαθέτουν ανάλογες ηλεκτραρνητικές υποκαταστάσεις στις αντίστοιχες θέσεις που αναγνωρίζονται από τις PBP's. Έτσι οι καρβαπενέμες στην θέση αναγνώρισης 3 φέρουν το υδροξύλιο της 6α-ύδροξυ-αιθυλο-ομάδας ενώ οι μονοβακτάμες στην θέση αναγνώρισης 1 αντί για το καρβοξυλικό ανιόν διαθέτουν σουλφονικό ανιόν. Επίσης ο μηχανισμός αναγνώρισης και ακυλίωσης του β-λακταμικού δακτυλίου στις PBP's εξηγεί γιατί β-λακταμικά που δεν φέρουν καρβοξύλιο ή ανάλογη ομάδα στην θέση C3/C4 δεν μπορούν να ακυλώσουν τις PBP's όπως και την έλλειψη αντιμικροβιακής δράσης των Δ²-κεφεμών (το καρβοξύλιο δεν είναι στο ίδιο επίπεδο με το καρβονύλιο του β-λακταμικού). Η ύπαρξη ηλεκτραρνητικής ομάδας στην θέση αναγνώρισης 3 και η διαμόρφωση αυτής επίσης σχετίζεται με την ισχύ της αντιβακτηριακής δράσης (π.χ. το κλαβουλανικό οξύ δε φέρει αντίστοιχη ομάδα και στα ολιβανικά οξέα το υδροξύλιο συνδέεται με άνθρακα που έχει διαμόρφωση S που το τοποθετεί εκτός του επιπέδου που σχηματίζουν οι ηλεκτραρνητικές ομάδες). Εκτός από τις βασικές θέσεις αναγνώρισης των β-λακταμικών επιπλέον ομάδες δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο των πεπτιδασών, που συνήθως εντοπίζονται στην ακυλο-άμινο πλευρική αλυσίδα τους (ή σε ανάλογες υποκαταστάσεις), και καθορίζουν την ειδικότητα τους έναντι των διαφορετικών PBP's του ίδιου ή διαφορετικών οργανισμών.

Η επαγωγή της βακτηριακής λύσης από τα β-λακταμικά διαμεσολαβείται από την αναστολή της λειτουργίας των PBP's και κυρίως αυτής των τρανσπεπτιδασών. Αν και οι PBP's χαμηλής μοριακής μάζας, οι οποίες φέρουν ενεργότητες καρβοξυπεπτιδάσης και ενδοπεπτιδάσης, είναι η περισσότερο άφθονες στα κύτταρα και το μεγαλύτερο ποσοστό του επιδρώντος β-λακταμικού έχει δεσμευτεί σε αυτές (π.χ. οι PBP5 και PBP6 του *E. coli* δεσμεύουν το 90% των β-λακταμικών ~2000 μόρια/κύτταρο) η λειτουργία τους που σχετίζεται με την αναδιαμόρφωση των διασυνδέσεων της πεπτιδογλυκάνης (*remodeling*) φαίνεται ότι δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση του βακτηρίου. Αντίθετα οι PBP's υψηλής μοριακής μάζας που καταλύουν τις αντιδράσεις 4→3 τρανσπεπτιδίωσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην σύνθεση νέας πεπτιδογλυκάνης διατηρώντας το σχήμα το βακτηρίου, συμμετέχοντας στην επιμήκυνση του κυττάρου και στην δημιουργία διαφράγματος (*septum*) κατά την κυτταρική διαίρεση (Hammond S. M. και συν., 1984; Koch A. L., 2000). Η αναστολή της λειτουργίας των τρανσπεπτιδασών από τα β-λακταμικά οδηγεί στην λύση των βακτηρίων καθώς διαταράσσεται η ισορροπία

βιοσύνθεσης-αποικοδόμησης της πεπτιδογλυκάνης που οδηγεί στην επαγωγή της δράσης των αυτολυσινών (Hammond S. M. και συν., 1984; Rice K. C. και Bayles K. W., 2008).

Τα διάφορα β-λακταμικά δεν αναστέλλουν στον ίδιο βαθμό όλες τις τρανσπεπτιδάσες και κάποια εμφανίζουν υψηλή συγγένεια και απόδοση ακυλίωσης μόνο για κάποιες εξ' αυτών (Nozaki Y. και συν., 1979; Yang Y. και συν., 1995). Έτσι σε υπό-ανασταλτικές μη-λυτικές συγκεντρώσεις κάποια β-λακταμικά επιδρούν στην μορφολογία του βακτηρίου μέσω αναστολής συγκεκριμένων PBPs. Για παράδειγμα η κεφαλεξίνη και άλλες κεφαλοσπορίνες εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την PBP3 του *E. coli* η οποία συμμετέχει στην δημιουργία των διαφραγμάτων (septa) κατά την φάση της κυτταρικής διαίρεσης και βακτήρια που έρχονται σε επαφή με μικρές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών αυτών εμφανίζουν επιμήκη νηματοειδή κυτταρική μορφολογία (δημιουργία συγκυττίων) (Masuyoshi S. και συν., 1981; Hammond S. M. και συν., 1984). Η ύπαρξη των β-λακταμικών στην φύση αποδίδεται στον ανταγωνισμό των μικροοργανισμών σε φυσικά περιβάλλοντα για την πρόσβαση σε θρεπτικά υλικά και αυτή η μάλλον ανθρωποκεντρική άποψη φαίνεται εν μέρει να ισχύει. Η παραπάνω δράση των β-λακταμικών επί της κυτταρικής μορφοποίησης όμως ίσως να αντανακλά και κάποιες φυσιολογικές λειτουργίες των μορίων αυτών που είχαν σε κάποιο αρχικό εξελικτικό στάδιο ή εξακολουθούν να έχουν στα βακτήρια που τα παράγουν. Σε αυτό δε συντείνει και η ύπαρξη φυσικών β-λακταμών που δεν έχουν έντονη αντιβακτηριακή δράση.

3. Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ

A. Εξελικτικές και μηχανιστικές θεωρήσεις

Τα ένζυμα που απενεργοποιούν τις β-λακτάμες παράγονταν από βακτήρια μερικές εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια πριν την εποχή των αντιβιοτικών. Η εξέλιξη των β-λακταμασών θεωρείται ότι συνέβη παράλληλα με αυτή των βιοσυνθετικών γονιδίων των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Ενεργότητα β-λακταμάσης περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Abraham και Chain στην Οξφόρδη το 1940 οι οποίοι εργαζόμενοι με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα *E. coli* διαπίστωσαν την ύπαρξη "ενός βακτηριακού ενζύμου ικανού στο να καταστρέφει την πενικιλίνη" (Abraham E. P. και Chain E., 1940). Σήμερα υποθέτουμε ότι η ομάδα της Οξφόρδης ανίχνευσε την ενεργότητα της β-

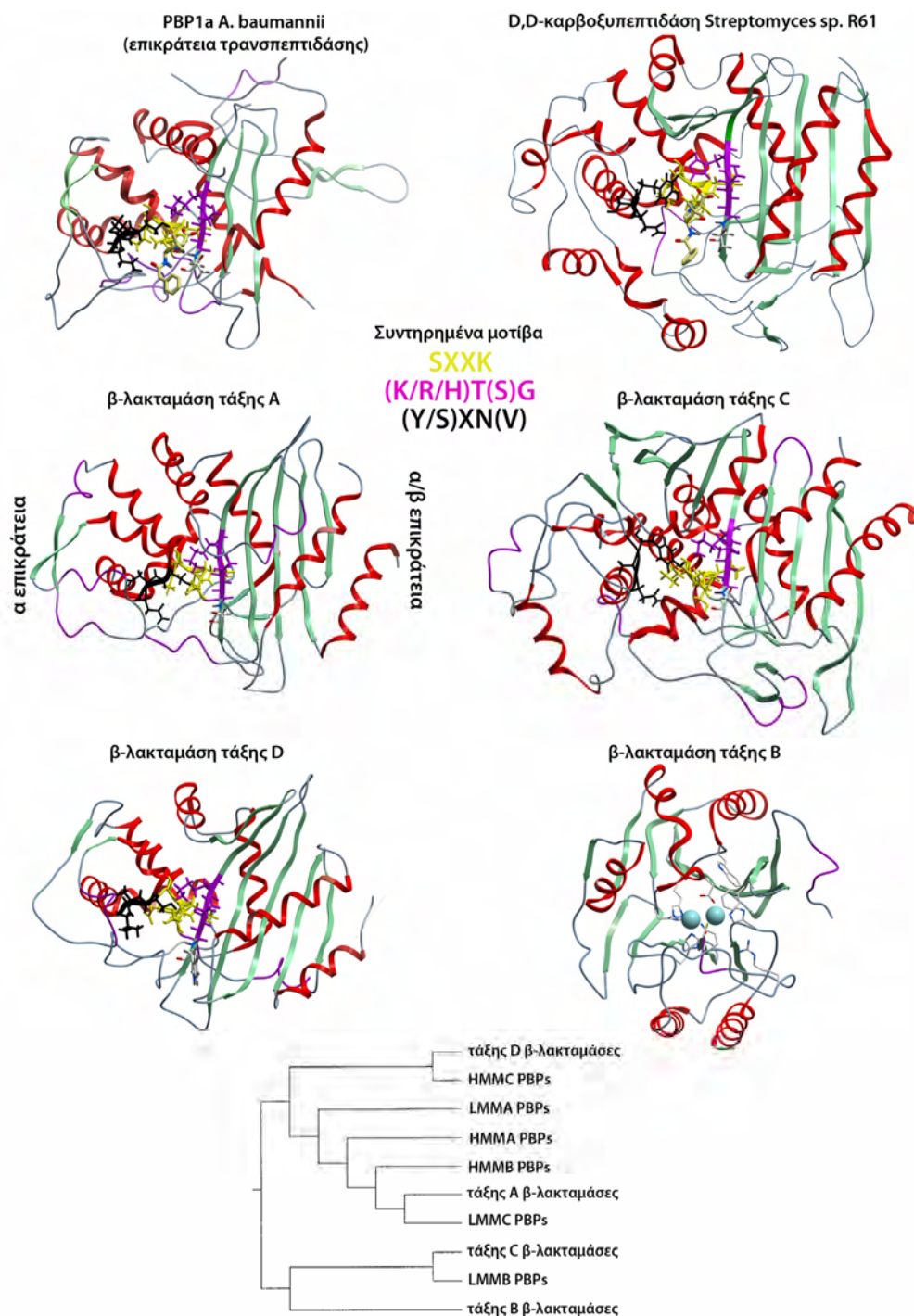
λακταμάσης τάξης C που παράγεται από το αντίστοιχο χρωμοσωμικό γονίδιο του *E. coli* (Matagne A. και συν., 2001). Χρωμοσωμικά γονίδια β-λακταμασών απαντούν σε αρκετά βακτήρια είτε Gram αρνητικά είτε θετικά και η ύπαρξή τους στην φύση δεν φαίνεται να είναι τόσο σπάνια όπως είχε αρχικά υποτεθεί. Η αιτιολόγηση της ύπαρξης και της διασποράς των γονιδίων β-λακταμασών στην φύση πολύ πριν την εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών από τον άνθρωπο τοποθετείται μέσα στα πλαίσια του *βιολογικού πολέμου* που διεξάγεται μεταξύ των οργανισμών που παράγουν β-λακταμικά και των γειτόνων τους που αναστέλλονται από αυτά. Έτσι η επιλογή γονιδίων που κωδικοποιούσαν για απενεργοποιητικά ένζυμα των β-λακταμικών προσέδιδε εξελικτικό πλεονέκτημα στα βακτήρια που αλληλεπιδρούσαν με τους παραγωγούς μικροοργανισμούς. Βέβαια το παραπάνω δεν αποκλείει και κάποιο αρχέγονο ίσως ρόλο των β-λακταμασών στην φυσιολογία των βακτηριών καθώς τα ένζυμα αυτά παράγονται και από βακτήρια που συνθέτουν β-λακταμικά με την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων να ρυθμίζεται αυστηρά από διάφορους μηχανισμούς.

Η παραπάνω διαδικασία επιλογής επιταχύνθηκε σημαντικά όταν στον βιολογικό αυτό πόλεμο εισήλθε ο άνθρωπος. Εξαιτίας της πλαστικότητας των βακτηριακών γονιδιωμάτων γενετικοί τόποι β-λακταμασών μεταφέρθηκαν πολύ γρήγορα σε ευαίσθητα κλινικά στελέχη όταν τα β-λακταμικά άρχισαν να χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς. Η εξελικτική αυτή διαδικασία ήταν και είναι πολύ αποδοτική καθώς η εμπειρία που αποκτήθηκε τα τελευταία 70 χρόνια έχει δείξει ότι κάθε φορά που ένα νέο αντιβιοτικό, που δεν υδρολύεται από τις εκάστοτε διεσπαρμένες β-λακταμάσες, εισάγεται στη θεραπευτική αμέσως συνοδεύεται από την επιλογή νέων γονιδίων που παράγουν ένζυμα με ικανότητα απενεργοποίησής του (Medeiros A. A., 1997; Perez F. και συν., 2007). Τα γονίδια αυτά ενδέχεται να έχουν προκύψει από μεταλλάξεις προϋπαρχόντων γονιδίων β-λακταμασών ή να κωδικοποιούν για νέου τύπου ένζυμα που έχουν ήδη υψηλή ενεργότητα υδρόλυσης έναντι των νέων αντιβιοτικών. Εξάλλου, όπως φαίνεται και στην προηγούμενη ενότητα, ο άνθρωπος δεν πρωτοτύπησε ιδιαίτερα στον σχεδιασμό νέων αντιβιοτικών και τις σημαντικότερες τροποποιήσεις που εισήγαγε στα β-λακταμικά, ειδικότερα αυτές που προσδίδουν αντοχή σε υδρόλυση, τις διδάχθηκε από τη φύση και άρα είναι λογικό να υπάρχουν ήδη ένζυμα που θα έχουν ειδικότητα έναντι των μορίων που φέρουν αυτές τις τροποποιήσεις. Έτσι λοιπόν δεν πρέπει να εκπλήσει το γεγονός ότι

από το τέλος της δεκαετίας του 1940, λίγα χρόνια δηλαδή μετά την έναρξη χρήσης πενικιλίνης σε μεγάλη κλίμακα, ο σταφυλοκοκκικός πληθυσμός που απομονώνονταν στα βρετανικά νοσοκομεία είχε αποκτήσει αντοχή σε αυτή εξαιτίας της παραγωγής β-λακταμάσης. (Frere J. M., 1995; Matagne A. και συν., 1999)

Οι β-λακταμάσες που έχουν περιγραφεί ως σήμερα κατηγοριοποιούνται βάσει της πρωτοταγούς τους δομής και του μηχανισμού κατάλυσης στις τέσσερις τάξεις που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια (Ambler R. P. και συν., 1991; Hall B. G. και Barlow M., 2005). Παράλληλα με το σύστημα κατάταξης αυτό (ταξινόμηση κατά Ambler) χρησιμοποιείται και ταξινόμηση βάσει των υδρολυτικών τους ικανοτήτων έναντι των διαφόρων β-λακταμικών υποστρωμάτων (ταξινόμηση κατά Jacoby-Bush-Medeiros; Bush K. και συν., 1995). Το σύστημα αυτό αρχικά ήταν λειτουργικό και χρησιμοποιούνταν παράλληλα με το σύστημα Ambler, καθώς ο διαχωρισμός ήταν συμβατός και με την ομολογία της πρωτοταγούς δομής των ενζύμων και του μηχανισμού κατάλυσης. Η επιλογή όμως β-λακταμασών με νέες υδρολυτικές ιδιότητες οδηγούσε συχνά σε κατηγοριοποίηση πολύ διαφορετικών ενζύμων στην ίδια λειτουργική ομάδα με αποτέλεσμα να προκαλούνται συγχύσεις. Αν και η κατηγοριοποίηση βάσει των καταλυτικών ιδιοτήτων αναθεωρήθηκε (Bush K. και Jacoby G. A., 2009) το σύστημα ταξινόμησης κατά Ambler θεωρείται πιο εύχρηστο.

Οι β-λακταμάσες των τάξεων A, C και D (βΛτA, βΛτC και βΛτD αντίστοιχα) ακυλιώνονται σε μία καταλυτική σερίνη από τα β-λακταμικά, χρησιμοποιώντας έναν καταλυτικό μηχανισμό παρόμοιο με τις PBPs. Θεωρείται ότι έχουν εξελιχθεί από κάποιες αρχέγονες πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες οι οποίες σταδιακά απέκτησαν τη δυνατότητα να υδρολύουν τον εστερικό δεσμό μεταξύ σερίνης - β-λακταμικού στο στάδιο του ακυλ-ενζύμου (Massova I. και Mobashery S., 1998; Koch L. A., 2000). Συγκρίνοντας τόσο την αμινοξική αλληλουχία όσο και την τριτοταγή δομή μεγάλου αριθμού β-λακταμασών σερίνης και PBPs οι Massova I. και Mobashery S. πρότειναν ότι οι β-λακταμάσες που ανήκουν στην τάξη A έχουν κοινό πρόγονο με τις PBPs χαμηλής μοριακής μάζας τάξης C ενώ οι βΛτD βρίσκονται εξελικτικά πιο κοντά με τις LMM τάξης A (Εικόνα 16). Αντίθετα, σε μία αντίστροφη εξελικτική διαδικασία οι πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος HMMC φαίνεται ότι προέκυψαν από τις βΛτD με κάποιο αντιπρόσωπο από αυτές να χάνει την υδρολυτική του ικανότητα.



Εικόνα 16: Δομές των τεσσάρων μοριακών τάξεων β-λακταμασών και κάποιων PBPs. Τα τρία καταλυτικά μοτίβα τοποθετούνται με παρόμοιο τρόπο ανάμεσα στις α/β και α επικράτειες των ενζύμων αλλά στις β-λακταμάσες σερίνης του ακύλ-ένζυμο υδρολύεται ενώ στις πενικιλινοδεσμευτικές όχι. Οι μέταλλο-β-λακταμάσες (τάξης B) δεν σχετίζονται με τα υπόλοιπα ένζυμα της κατηγορίας, αλλά το γεγονός ότι τα δύο κατιόντα Zn^{2+} του ενεργού κέντρου δεσμεύονται από δύο α/β επικράτειες ενδεχομένως αντανακλά κάποια αρχαία σχέση των ενζύμων με α/β υδρολάσες. Δίνεται επίσης και φυλογενετικό δένδρο που δηλώνει κάποιες υποθετικές εξελικτικές σχέσεις μεταξύ β-λακταμασών και PBPs.

Οι βΛτC θεωρούνται γενικά οι λιγότερο "εξελιγμένες" από τις β-λακταμάσες σερίνης με την διαφοροποίησή τους από κάποια D,D-καρβοξυπεπτιδάση LMM τάξης B να έγινε σχετικά πρόσφατα. Αυτό αντανακλάται και στο μηχανισμό που χρησιμοποιούν για να καταλύσουν την υδρόλυση των β-λακταμικών ο οποίος σε μεγάλο βαθμό είναι κοινός με αυτόν που χρησιμοποιούν τα συγγενικά τους μόρια για να υδρολύσουν το καρβοξυτελικό διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala των μouroπενταπεπτιδίων, αντίθετα με τις βΛτA και βΛτD οι οποίες φέρουν τροποποιημένους καταλυτικούς μηχανισμούς. Η παραπάνω ανάλυση επίσης έδειξε ότι τα ένζυμα της ομάδας βΛτC/LMMB προέκυψαν σε κάποιο αρχέγονο προκαρυωτικό οργανισμό και διαφοροποιήθηκαν ανεξάρτητα από τις άλλες PBP/β-λακταμάσες γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικές συνθήκες επιλογής. (Massova I. και Mobashery S., 1998)

Η τριτοταγής δομή των β-λακταμασών σερίνης είναι ανάλογη αυτής των D,D-πεπτιδασών (Εικόνα 16) και αποτελείται από μία επικράτεια που φέρει 5-7 β-αλυσίδες διατασσόμενες σε αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια ενώ 2 ή 3 α-έλικες διασυνδέουν κάποιες από αυτές (α/β επικράτεια) και μία επικράτεια πλούσια σε α-έλικες (α επικράτεια). Οι δύο επικράτειες ενώνονται από μία Ω-θληιά το μέγεθος της οποίας ποικίλει στις διάφορες κατηγορίες ενζύμων. Στο σημείο επαφής των δύο επικρατειών δημιουργείται η αύλακα του ενεργού κέντρου στην οποία εντοπίζονται τα συντηρημένα μοτίβα SXXK, Y(S)XN και K(H)TG(S) που φέρουν τα καταλυτικά αμινοξέα. Τόσο στις PBP όσο και στις β-λακταμάσες τα αμινοξέα αυτά τοποθετούνται με παρόμοια διαμόρφωση με το SXXK που φέρει την πυρηνόφιλη σερίνη να εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο μίας α-έλικας που προβάλλει στον πυθμένα του ενεργού κέντρου, το Y(S)XN σε μία θηλειά ή α-έλικα και το K(H)TG(S) σε μία β-αλυσίδα, δομές που δημιουργούν κάποια από τα τοιχώματα της πτυχής του ενεργού κέντρου (Εικόνα 16) (Lobkovsky E. και συν., 1993, Nukaga M. και συν., 2002; Minasov G. και συν., 2001; Smith C. A. και συν., 2013). Αν και τα καταλυτικά αμινοξέα διατάσσονται με παρόμοιο τρόπο στις β-λακταμάσες και στις πενικιλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες στις μεν πρώτες το ακυλένζυμο των β-λακταμικών μπορεί να υδρολυθεί ενώ στις άλλες όχι (Lamotte-Brasseur J. και συν., 1994).

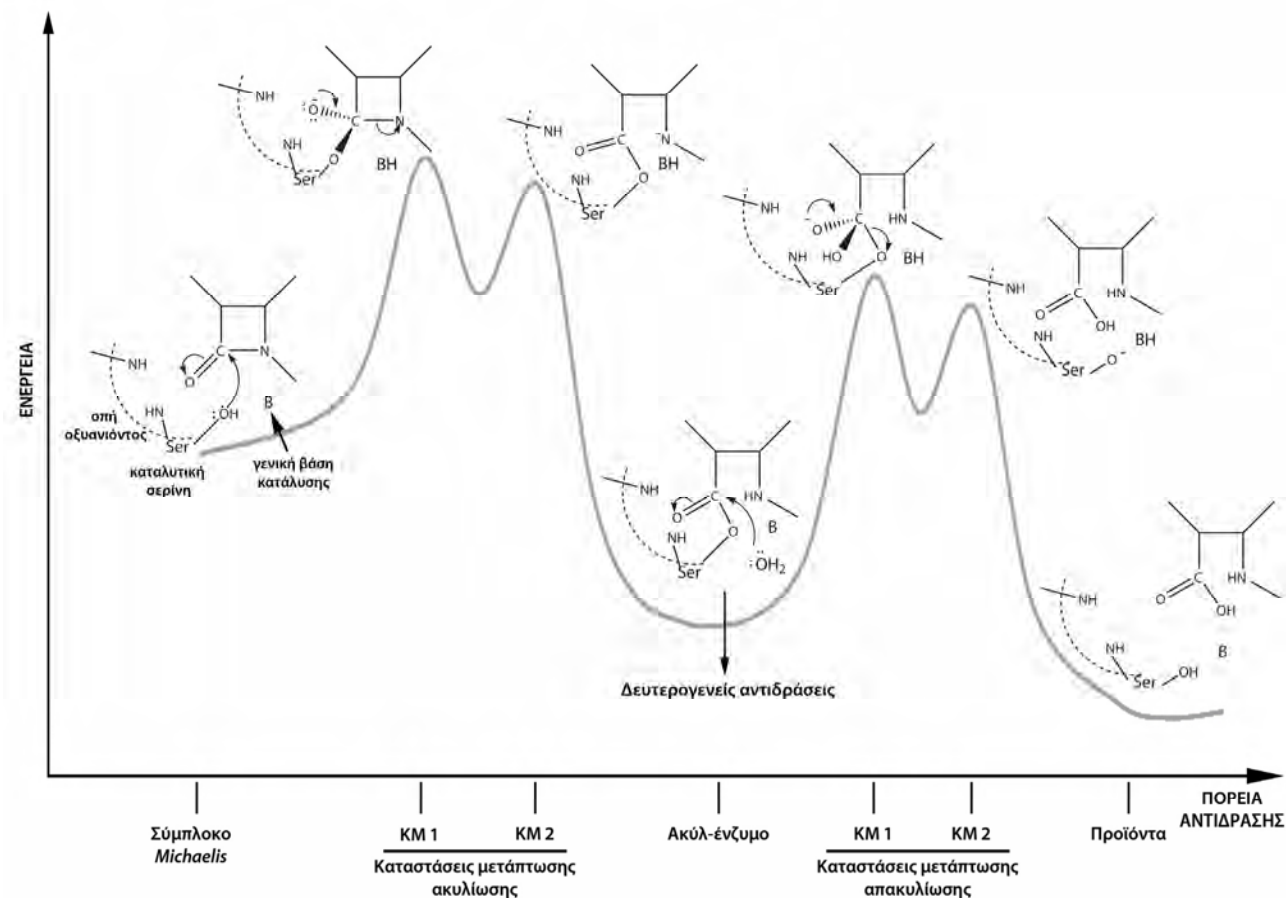
Η επικράτεια α/β είναι ένα δομικό μοτίβο που απαντά και σε άλλα υδρολυτικά ένζυμα τόσο προκαρυωτικών όσο και ευκαρυωτικών οργανισμών που συνήθως φέρουν

ενεργότητες διάσπασης αμιδικών, εστερικών, αιθερικών και άλλων δεσμών. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται συλλογικά α/β υδρολάσες και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται πρωτεάσες σερίνης (θρυψίνη, σουμπτυλυσίνη κ.α.), αμιδάσες, πεπτιδάσες, χολινεστεράσες, φωσφολιπάσες, υδρολάσες εποξειδίων κ.α. (Nardini M. και Dijkstra B. W., 1999; Holmquist M., 2000; Carr P. D. και Ollis D. L., 2009; Marchot P. και Chatonnet A., 2012). Λειτουργούν με καταλυτικές τριάδες όπως δηλαδή οι β-λακταμάσες και οι PBPs (η πυρηνόφιλη ομάδα εκτός από την πλευρική αλυσίδα σερίνης μπορεί να εντοπίζεται στην αντίστοιχη κυστεΐνης ή ασπαρτικού οξέος) και το γεγονός ότι η αναδίπλωση αυτή απαντά σε ένζυμα οργανισμών και από τα τρία βασίλεια της ζωής δηλώνει ότι είναι μία πολύ πετυχημένη προσαρμογή για την υδρόλυση πολωμένων δεσμών αυτού του είδους (Marchot P. και Chatonnet A., 2012). Αυτό το δομικό μοτίβο φαίνεται να συνδέει κατά κάποιο τρόπο τις β-λακταμάσες τάξης B (βΛτB) με τα υπόλοιπα ένζυμα της κατηγορίας. Αν και οι βΛτB διαφέρουν τόσο στον καταλυτικό μηχανισμό (εφόσον χρησιμοποιούν κατιόντα ψευδραργύρου για να υδρολύσουν τον αμιδικό δεσμό) όσο και στην αμινοξική αλληλουχία με τις PBPs και τις β-λακταμάσες σερίνης η δομή τους αποτελείται από δύο α/β επικράτειες η κάθε μία από τις οποίες δεσμεύει ένα καταλυτικό Zn^{2+} μέσω καταλοίπων ιστιδίνης, μίας κυστεΐνης και ενός ασπαρτικού (Εικόνα 16) (Lassaux P. και συν., 2010). Έτσι έχει υποτεθεί ότι θα μπορούσαν να έχουν προέλθει από τον διπλασιασμό του γονιδίου κάποιας αρχέγονης α/β υδρολάσης (Massova I. και Mobashery S., 1998). Πράγματι οι βΛτB μοιράζονται δομικές ομοιότητες με μέταλλο-υδρολάσες πολύ απομακρυσμένων οργανισμών με κάποιες από αυτές να ανήκουν σε Αρχαίους προκαρυωτικούς οργανισμούς και κάποιες σε ευκαρυωτικούς (π.χ. η γλυοξυλάση II του ανθρώπου) γεγονός που δηλώνει ότι φυλογένεσή τους ξεκίνησε πριν τον διαχωρισμό Βακτηρίων, Αρχαίων και Ευκάρυων (Hall B. G. και συν., 2004; Garau G. και συν., 2005).

Η κατάλυση της υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου από τα ένζυμα σερίνης διαμεσολαμβάνεται από μηχανισμούς ανάλογους (Εικόνα 17) με αυτούς των D,D-πεπτιδασών και ουσιαστικά τα όσα είναι γνωστά για την ενζυμική δράση των PBPs έχουν προκύψει από την μελέτη β-λακταμασών καθώς υπήρχε μεγαλύτερο ενδιαφέρον για αυτές ως παράγοντες επικυνδινότητας για τη δημόσια υγεία. Το αρχικό στάδιο της αλληλεπίδρασης των ενζύμων αυτών με τα υποστρώματά τους περιλαμβάνει την είσοδο

του β-λακταμικού στο ενεργό κέντρο διαμεσολαβούμενη από τη μεγάλης εμβέλειας ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του καρβοξυλίου των δικυκλικών αντιβιοτικών (ή του σουλφονικού ανιόντος στις μονοβακτάμες) και θετικά φορτισμένων αμινοξέων του ενζύμου (Fenollar-Ferrer C. και συν., 2003). Ακολουθώς το υπόστρωμα προσανατολίζεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μικρότερης εμβέλειας που αφορούν κυρίως τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου του β-λακταμικού και των δύο αμινομάδων της οπής οξυανιόντος (η οποία δημιουργείται από τα ίδια αμινοξέα με αυτά των PBPs). (Fisher J. F. και συν., 2005)

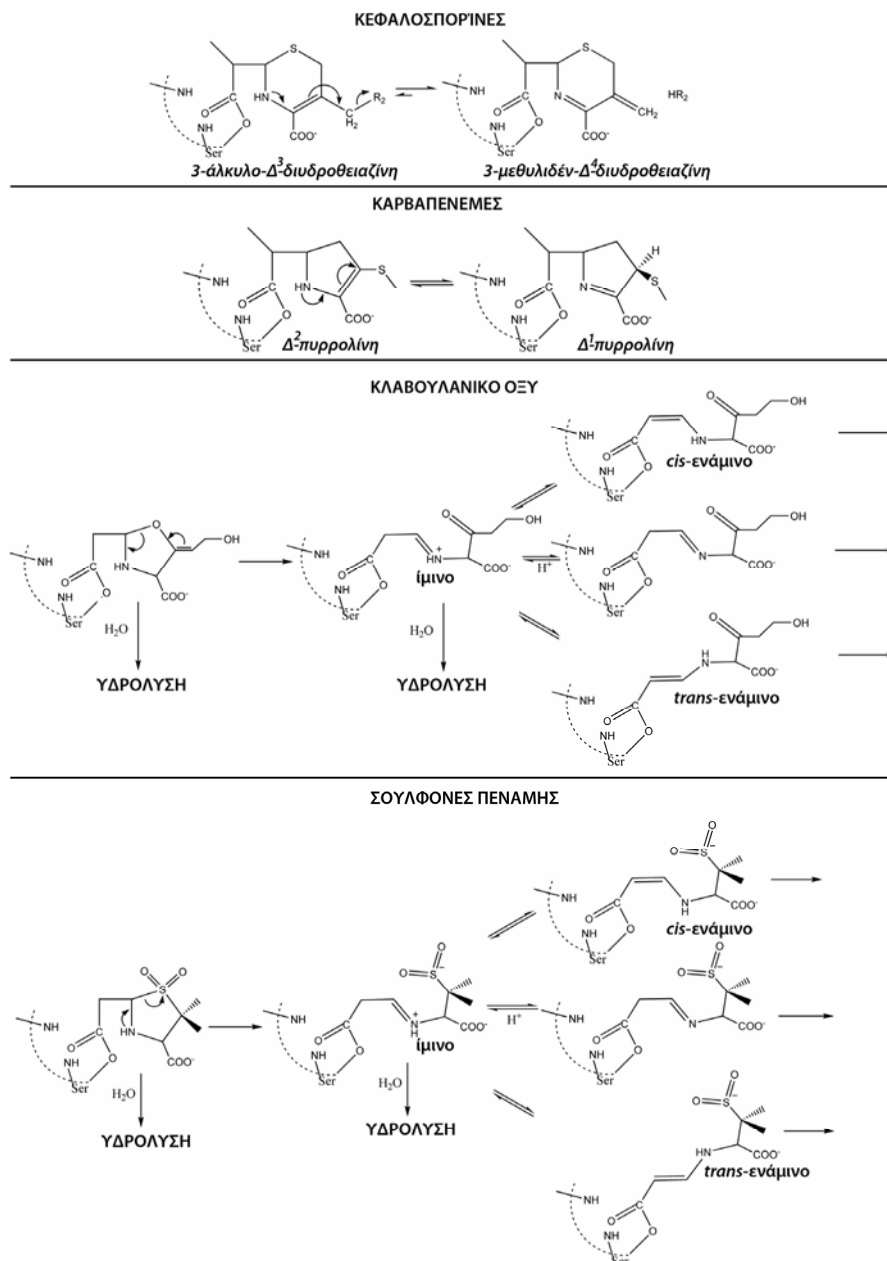
Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου (σύμπλοκο *Michaelis*, Εικόνα 17) έχει ως αποτέλεσμα την εντοπισμένη εμφάνιση αποσταθεροποιητικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που εξισορροπούνται από αλληλεπιδράσεις κυρίως υδροφοβικής φύσης μεταξύ άλλων ομάδων του υποστρώματος και καταλοίπων του ενεργού κέντρου. Η εμφάνιση υψηλής τοπικά ενέργειας αντανακλάται στην αυξημένη συχνότητα δόνησης του καρβονυλίου εντός της οπής οξυανιόντος όπως προκύπτει από φάσματα IR (Hokenson M. J. και συν., 2000). Η τοποθέτηση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου μέσω υδρόφοβων και πολικών αλληλεπιδράσεων μειώνουν την ενέργεια των ριζών κατάστασης μετάπτωσης με την ταυτόχρονη δράση καταλοίπων που λειτουργούν ως βάσεις και οξέα κατά Brønsted (δηλαδή ως δέκτες και δότες πρωτονίων) (Fisher J. F. και συν., 2005). Μάλιστα τα καταλυτικά κέντρα των ενζύμων είναι κατασκευασμένα έτσι ώστε να εμφανίζουν μέγιστη συμπληρωματικότητα για τις καταστάσεις μετάπτωσης παρά για το υπόστρωμα στο σύμπλοκο *Michaelis* (αρχή του Hammond) (Hammond G. S., 1955).



Εικόνα 17: Ενεργειακό τοπίο κατά την ενζυμική υδρόλυση β-λακταμικών από τις β-λακταμάσες σερίνης. Τα ένζυμα αυξάνουν την ενέργεια των αντιδρώντων στην πυθμενική κατάσταση και μειώνουν την ενέργεια των καταστάσεων μετάπτωσης μέσω αλληλεπιδράσεων καταλοίπων του ενεργού κέντρου με ομάδες των β-λακταμικών. Η ενεργοποίηση των πυρηνόφιλων κατά τις αντιδράσεις ακυλίωσης και απακυλίωσης διαμεσολαβείται από αμινοξέα που λειτουργούν ως βάσεις κατά Bronsted. Η πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας (που συμβαίνει ταυτόχρονα με τη διάρρηξη του αμιδικού δεσμού κατά την ακυλίωση ή του εστερικού κατά την απακυλίωση στις καταστάσεις υψηλής ενέργειας) διαμεσολαβείται από κατάλοιπα που λειτουργούν ως οξέα κατά Bronsted. Στην Εικόνα χάρη απλοποίησης δίνεται η γενική βάση κατάλυσης η οποία λειτουργεί και ως συζυγές οξύ κατά την πρωτονίωση των αποχωρούσων ομάδων. Τους δύο παραπάνω ρόλους τους διαδραματίζουν συνήθως δύο ή περισσότερα αμινοξέα και το παραπάνω σχήμα ισχύει μόνο για τις β-λακταμάσες τάξης D όπου η καρβοξυλιωμένη λυσίνη του SXXK λειτουργεί ως βάση και συζυγές οξύ κατά τη διπλή μετατόπιση. Στην πυθμενική κατάσταση του ακυλενζύμου μπορούν να λάβουν χώρα δευτερογενείς αντιδράσεις.

Το αποτέλεσμα της δημιουργίας του κατάλληλα προσανατολισμένου συμπλόκου είναι η σταθεροποίηση της τετραεδρικής κατάστασης μετάπτωσης που δημιουργείται από την προσθήκη οξυγόνου της καταλυτικής σερίνης στον άνθρακα του καρβονυλίου μέσω της δράσης της πλευρικής αλυσίδας κάποιου αμινοξέος που λειτουργεί ως βάση (Εικόνα 17). Κατά την πορεία της αντίδρασης ουσιαστικά μεταφέρονται αρνητικά φορτία από την γενική βάση κατάλυσης στο οξυγόνο του καρβονυλίου μέσω της καταλυτικής σερίνης με τα καθαρά αποτελέσματα αυτής της αναμετάδοσης φορτίου να είναι η πρωτονίωση της γενικής βάσης, η προσθήκη του οξυγόνου στον άνθρακα και η ανάπτυξη οξυανιόντος σε τετραεδρική διαμόρφωση (κατάσταση μετάπτωσης ακυλίωσης 1, Εικόνα 17). Στο παραπάνω τετραεδρικό ενδιάμεσο υψηλής ενέργειας το άζωτο του β-λακταμικού δακτυλίου αποκτά έντονο βασικό χαρακτήρα έλκοντας τα ηλεκτρόνια του αμιδικού δεσμού (κατάσταση μετάπτωσης ακυλίωσης 2, Εικόνα 17) μέχρις ότου δεχθεί ένα πρωτόνιο από την πλευρική αλυσίδα κάποιου αμινοξέος που θα λειτουργήσει ως οξύ και το τετραεδρικό ενδιάμεσο να καταρρεύσει. Στη νέα κατάσταση ελάχιστης ενέργειας η καταλυτική σερίνη έχει ακυλωθεί από το β-λακταμικό με τον αμιδικό δεσμό να μην υφίσταται πλέον και το άζωτο να έχει πρωτονιωθεί (ακυλ-ένζυμο, Εικόνα 17; Fisher J. F. και συν., 2005). Η κατάσταση πρωτονίωσης του αποχωρούντος αζώτου εξαρτάται από τον δακτύλιο με τον οποίο είναι συμπυκνωμένος ο β-λακταμικός και διαφέρει στα ακυλ-ένζυμα των πενικιλινών, κεφαλοσπορινών καρβαπενεμών και αναστολέων αυτοκτονίας (Page M. G., 2008). Στα ακυλένζυμα των πενικιλινών το άζωτο είναι πρωτονιωμένο ενώ στις καρβαπενέμες ενδέχεται να είναι αποπρωτονιωμένο καθώς ο Δ^2 -πυρρολινικός δακτύλιος μπορεί να ισομερισθεί προς Δ^1 (Εικόνα 18; Zafarella G. και Mobashery S., 1992; Taibi P. και Mobashery S., 1995; Page M. G., 2008). Στις αντίστοιχες ρίζες των κεφαλοσπορινών η απο-πρωτονίωση του αζώτου επάγει την απομάκρυνση της R2 πλευρικής αλυσίδας όταν αυτό είναι δυνατόν (Εικόνα 18; Page M. G., 2008). Το είδος της ρίζας ακυλ-ενζύμου που θα ευνοηθεί εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο της β-λακταμάσης ενώ η ποικίλου βαθμού σταθερότητα των ριζών αυτών έχει επιπτώσεις στην απόδοση της αντίδρασης απακυλίωσης που ακολουθεί. Μέσω της κατάστασης πρωτονίωσης του αζώτου ρυθμίζονται και οι δευτερογενείς αντιδράσεις που υφίστανται το κλαβουλανικό οξύ και οι σουλφόνες πενικιλίνης κατά την ακυλίωση των ενζύμων που αναστέλουν με κάποιες από τις αρχικές ρίζες ακυλ-ενζύμων να μπορούν να

υδρολυθούν (π.χ. ρίζες ιμίνης, Εικόνα 18) και αυτές που δημιουργούνται στην πορεία της αντίδρασης να αναστέλλουν μόνιμα το ένζυμο (στα ένζυμα τάξης A αντιδρώντας με τη σερίνη του μοτίβου SDN) (Brown R. P. και συν., 1996; Yang Y. και συν., 2000; Drawz S. M. και συν., 2009).



Εικόνα 18: Χημική αναδιάταξη ακύλ-ενζύμου στις β-λακταμάσες σερίνης. Στις κεφαλοσπορίνες όταν στην R2 υπάρχει ομάδα που μπορεί να αποχωρήσει οι ρίζες ακυλενζύμου αφορούν κυρίως δομές όπου το άζωτο είναι αποπρωτονιωμένο. Ισομερισμός του ακύλ-ενζύμου των καρβαπενεμών όπου ο διπλός δεσμός εντοπίζεται μεταξύ C1 και C2 και θεωρείται ότι δίνει ρίζες που δεν μπορούν να υδρολυθούν. Οι αναστολές αυτοκτονίας των βΛαΤΑ υφίστανται σημαντική τροποποίηση στο στάδιο ακύλ-ενζύμου με τις ρίζες εναμίνης να αντιδρούν με την σερίνη του μοτίβου SDN (Ser130) αναστέλλοντας μόνιμα το ένζυμο με κάποιες από τις ενδιάμεσες ρίζες όμως να μπορούν να υδρολυθούν.

Η απαकुλίωση του ακυλ-ενζύμου διαμεσολαβείται από την πυρηνόφιλη προσθήκη ενός ενεργοποιημένου μορίου νερού στο καρβονύλιο του εστερικού δεσμού. Η μεταφορά αρνητικών φορτίων από το οξυγόνο του υδρολυτικού νερού στο καρβονύλιο κατά τη δημιουργία του τετραεδρικού ενδιάμεσου οξυανιόντος συμβαίνει όπως και στην ακυλίωση μέσω της δράσης ενός αμινοξέος που λειτουργεί ως βάση (Εικόνα 17). Η κατάρρευση της τετραεδρικής ρίζας με μεταφορά αρνητικού φορτίου στο οξυγόνο της σερίνης κατά την διάσπαση του εστερικού δεσμού είναι ενεργειακά λιγότερο απαιτητική σε σχέση με την αντίστοιχη διαδικασία στο στάδιο της ακυλίωσης καθώς ο εστερικός δεσμός είναι πιο ενεργός από τον αμιδικό (ο αμιδικός δεσμός είναι ο περισσότερος σταθερός από τους δεσμούς που συμμετέχουν καρβονυλομάδες εξαιτίας του συντονισμού που εμφανίζει το άτομο του αζώτου). Η καταλυτική σερίνη κατά την κατάρρευση της τετραεδρικής ρίζας κατάστασης μετάπτωσης πρωτονιώνεται από ένα κατάλοιπο του ενεργού κέντρου που λειτουργεί ως οξύ (Εικόνα 17). (Pratt R. F., 2002)

Τα αμινοξέα που λειτουργούν ως βάσεις και οξέα κατά τις αναμεταδόσεις φορτίου στην πορεία της κατάλυσης ανήκουν κυρίως στα συντηρημένα μοτίβα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το πώς ακριβώς συμβαίνουν αυτές οι μετακινήσεις πρωτονίων αποτελεί μέχρι και σήμερα αντικείμενο μελέτης και διχογνωμιών (Lamotte-Brasseur, J. και συν., 1994; Fisher J. F και Mobashery S., 2009; Tripathi R. και Nair N. N., 2013). Σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν η λυσίνη του μοτίβου SXXK και το πρώτο αμινοξύ του μοτίβου (Y/S)XN τα οποία είτε μόνα τους ή μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου ενεργοποιούν τα πυρηνόφιλα και πρωτονιώνουν τις αποχωρούσες ομάδες (Fisher J. F. και συν., 2005). Οι βΛτΑ χρησιμοποιούν ένα επιπλέον αμινοξύ το οποίο είναι συντηρημένο σε αυτές αλλά απουσιάζει από τα υπόλοιπα ένζυμα (το γλουταμικό οξύ στην θέση 166 της θηλειάς Ω) (Meroueh S. O. και συν., 2005), ενώ η γενική βάση κατάλυσης στις βΛτD είναι η N-καρβοξυλιωμένη μορφή της λυσίνης του SXXK η οποία δρά και ως συζυγές οξύ (Li J. και συν., 2005; Verma V. και συν., 2011; Leonard D. A. και συν., 2013). Το θετικό αμινοξύ του μοτίβου (K/H)T(G/S) φαίνεται να έχει επίσης σημαντικό ρόλο ως συστατικό του δικτύου δεσμών υδρογόνου ρυθμίζοντας τις pKa των αμινοξέων που συμμετέχουν άμεσα στην αντίδραση (Fisher J. F. και συν., 2005). Η προσέγγιση της πυρηνόφιλης σερίνης κατά την ακυλίωση γίνεται από το α-επίπεδο του β-λακταμικού, ενώ κατά την απαकुλίωση το υδρολυτικό νερό επιτίθεται από την β-

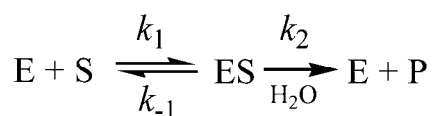
επιφάνεια του εστερικού δεσμού με εξαίρεση τις βΛτΑ στις οποίες καταλαμβάνει μία ισχυρή θέση πρόσδεσης στην α-επιφάνεια του δεσμού όπου ενεργοποιείται από το Glu166 (Hermann J. C. και συν., 2006; Hata M. και συν., 2006). Κατά τη μη ενζυμική υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου σε αλκαλικό pH η προσθήκη οξυανιόντος στον άνθρακα του καρβονυλίου αποτελεί το περιοριστικό στάδιο της αντίδρασης και το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και στις βΛτΑ (Page M. I. και Laws A. P., 1998) ενώ αντίθετα στις βΛτC για ορισμένα υποστρώματα το στάδιο που περιορίζει την ταχύτητα της υδρόλυσης συνήθως είναι η απακυλίωση (Galleni M. και συν., 1988).

Έτσι λοιπόν οι β-λακταμάσες καταλύουν την υδρόλυση των υποστρωμάτων τους επιστρατεύοντας δύο ομάδες αμινοξέων στο ενεργό κέντρο. Η πρώτη ομάδα έχει άμεση σχέση με τους μηχανισμούς κατάλυσης και απαρτίζεται κατ' ελάχιστο από πέντε αμινοξέα τα οποία πρέπει να διατηρούνται σταθερά και να μην υφίστανται μεταλλάξεις. Στην άλλη ομάδα αμινοξέων ανήκουν ουσιαστικά όλα τα υπόλοιπα κατάλοιπα του εκάστοτε ενεργού κέντρου που έρχονται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα και μέσω των αλληλεπιδράσεών τους καθορίζουν το βαθμό σταθερότητας που θα επιτευχθεί ώστε να μειωθεί η ενέργεια των ριζών μετάπτωσης. Αυτές οι αμινοξικές θέσεις αναγνώρισης του υποστρώματος είναι λιγότερο σταθερές και αντιστοιχούν στα κατάλοιπα εκείνα που μεταλλάσσονται υπό την άσκηση εξελικτικών πιέσεων. Οι εξελικτικές αυτές πιέσεις οδηγούν στη δημιουργία νέων ενζύμων εντός κάθε τάξης β-λακταμάσης τα οποία αποκτούν αυξημένη υδρολυτική ικανότητα για συγκεκριμένα υποστρώματα μέσω βελτίωσης της συμπληρωματικότητας για τις ρίζες μετάπτωσης του περιοριστικού σταδίου της αντίδρασης. Οι αμινοξικές αυτές αλλαγές δε θα πρέπει να επηρεάζουν σημαντικά τη θέση και τις ιδιότητες των καταλοίπων της καταλυτικής μηχανής όπως δε θα πρέπει να προκαλούν και μεγάλες αλλαγές στην σταθερότητα ολόκληρης της πρωτεΐνης.

Γνωρίζοντας τα παραπάνω θα μπορούσε να υποτεθεί ότι οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι μεταλλάξεις των β-λακταμασών οδηγούν σε νέες υδρολυτικές ιδιότητες είναι σαφείς και άρα η πρόβλεψη της λειτουργίας συγκεκριμένων καταλοίπων ή δομών του ενζύμου ως προς την υδρόλυση νέων υποστρωμάτων είναι μία σχετικά απλή υπόθεση. Ωστόσο, τα δεδομένα από μελέτες δομής- λειτουργίας δείχνουν ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει. Δεν είναι μόνο η συγγένεια του ενεργού κέντρου ως προς τα διάφορα υποστρώματα που καθορίζει την ταχύτητα υδρόλυσης. Η καταλυτική σερίνη πρέπει να

ακυλωθεί μέσω μεταφοράς πρωτονίων σε διάφορα ιονιζόμενα αμινοξέα των οποίων η pK_a εξαρτάται από το ηλεκτροστατικό μικροπεριβάλλον τους που οριοθετείται από άλλα μεταβλητά αμινοξέα του ενεργού κέντρου ή και από το ίδιο το υποστρώμα που επίσης φέρει πολικές ομάδες ικανές να δράσουν επί των καταστάσεων πρωτονίωσης των καταλοίπων της καταλυτικής συσκευής (Fisher J. F. και συν., 2005). Παρόμοιες παρατηρήσεις αφορούν και το στάδιο της επίθεσης του υδρολυτικού νερού. Η δυνατότητα για δευτερογενείς αντιδράσεις στο στάδιο του ακυλ-ενζύμου αυξάνει περαιτέρω την πολυπλοκότητα του φαινομένου καθώς οι διάφορες ρίζες που προκύπτουν ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται δύσκολα ενώ υδρολύονται με διαφορετικές ταχύτητες. Τέλος μία επιπλέον παράμετρος είναι η δυνατότητα για ισομερισμό των ίδιων των ενζύμων προς διαμορφώσεις που υδρολύουν με διαφορετική απόδοση τα υποστρώματα (Page M. G., 2008). Συνεπώς η συσχέτιση δομής-λειτουργίας στις β-λακταμάσες εξακολουθεί να είναι αντικείμενο εντατικών ερευνητικών προσπαθειών

Η παράμετρος της λειτουργίας στην εξίσωση δομής-λειτουργίας προσεγγίζεται με τεχνικές ενζυμικής κινητικής εκτιμώντας την ταχύτητα υδρόλυσης των διαφόρων υποστρωμάτων μέσω παρακολούθησης της διάσπασης του β-λακταμικού δακτυλίου κυρίως με την χρήση φασματοφωτομετρίας υπεριώδους. Κάθε ένζυμο χαρακτηρίζεται εκτιμώντας τις καταλυτικές παραμέτρους σταθερής κατάστασης ενώ σε μικρότερη κλίμακα χρησιμοποιούνται και τεχνικές γρήγορης κινητικής για τον προσδιορισμό των μικροσκοπικών σταθερών της ταχύτητας υδρόλυσης των επιμέρους σταδίων της υδρόλυσης. Για μία ενζυμική αντίδραση υδρόλυσης ενός σταδίου όπως φαίνεται στο σχήμα 1 (που θεωρητικά συμβαίνει στις βΛτΒ) η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης στην



Σχήμα 1

σταθερή κατάσταση (εκεί δηλαδή όπου η συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος θα παραμένει σταθερή εξαιτίας των ίδιων ρυθμών σχηματισμού του και αποικοδόμησης του σε ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα με την πρόθεση ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του ενζύμου), γνωρίζουμε ότι σχετίζεται με την συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ με την εξίσωση

Michaelis-Menten (εξίσωση 1). V_{\max} η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης η οποία επιτυγχάνεται όταν το ένζυμο έχει κορεστεί από αυξανόμενες συγκεντρώσεις του

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Εξίσωση 1}$$

υποστρώματος. Η τιμή της εξαρτάται από την σταθερά ταχύτητας ανακύκλωσης του ενζύμου k_{cat} και από την αρχική συγκέντρωση του ενζύμου $[E]_0$ (εξίσωση 2).

$$V_{\max} = k_{cat} \cdot [E]_0 \quad \text{Εξίσωση 2}$$

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

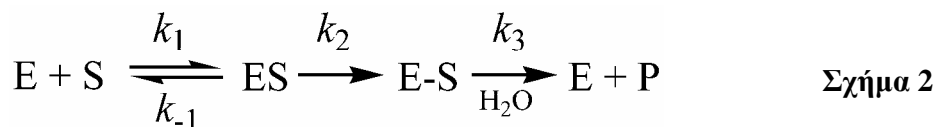
Η σταθερά K_m (σταθερά *Michaelis*) που εκφράζεται σε μονάδες μοριακότητας είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος K_s (αναφέρεται και ως K_d , εξίσωση 3) και αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι η μισή της μέγιστης ταχύτητας. Η σταθερά κατάλυσης k_{cat} έχει μονάδες σταθεράς ταχύτητας αντίδρασης πρώτης τάξης (s^{-1}) και στην απλή αυτή περίπτωση αντιστοιχεί στην σταθερά της ταχύτητας μετατροπής του συμπλόκου ES σε ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα (k_2) (Fersht A., 1999; Coperland R. A., 2000). Σε πιο περίπλοκες αντιδράσεις με περισσότερα καταλυτικά στάδια χημικών μετατροπών η σταθερά αυτή προκύπτει συνυπολογίζοντας την ταχύτητα κάθε επιμέρους σταδίου (το αντίστροφό της δίνεται από το άθροισμα των αντιστρόφων σταθερών των επιμέρους σταδίων) αλλά πάντα η σημασία της είναι ίδια· εκφράζει τον ρυθμό με τον οποίο ελεύθερο ένζυμο αναγεννάται ώστε να εισέλθει σε νέο κύκλο αντίδρασης με την τιμή να μην ξεπερνά την ταχύτητα του εκάστοτε περιοριστικού σταδίου. Επίσης η σταθερά *Michaelis* δεν είναι πάντα ισοδύναμη με την θερμοδυναμική σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος. Για παράδειγμα στην παραπάνω απλή περίπτωση η K_m είναι ίση με αυτή μόνο στην περίπτωση που η ταχύτητα διάστασης του συμπλόκου ES στα συστατικά του (k_{-1}) είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα μετατροπής του σε

προϊόντα (k_2). Σε αντίθετη περίπτωση αυτή δίνεται από την εξίσωση 4 (μηχανισμός Briggs-Haldane; Fersht A., 1999). Όταν ο μηχανισμός κατάλυσης εμπεριέχει και άλλα

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Εξίσωση 4}$$

στάδια χημικής μετατροπής και άλλες μη ομοιοπολικά δεσμευμένες ρίζες τότε πρέπει να συνυπολογιστούν και οι ταχύτητες των επιμέρους σταδίων. Πάντως η φυσική σημασία της K_m δεν αλλάζει και αντιστοιχεί πάντα στην συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης σε σταθερή κατάσταση είναι η μισή της μέγιστης ταχύτητας ενώ δίνει ένα μέτρο της φαινόμενης συνολικής σταθεράς διάστασης όλων των ομοιοπολικών και μη-ομοιοπολικών συμπλόκων που δημιουργούνται κατά την πορεία της αντίδρασης. Το πηλίκο k_{cat}/K_m των δύο παραπάνω σταθερών έχει επίσης φυσική σημασία. Έχει μονάδες σταθεράς ταχύτητας δεύτερης τάξης ($s^{-1} \cdot M^{-1}$) και αντανακλά την ταχύτητα *σύγκρουσης* ενζύμου-υποστρώματος ώστε να προκύψει ενεργοποιημένο σύμπλοκο (αυτό φαίνεται καθαρά όταν $[S] \ll K_m$ εξίσωση 5). Συνήθως δηλώνει την καταλυτική απόδοση του ενζύμου ενώ αποτελεί μέτρο της ειδικότητάς του για συγκεκριμένα υποστρώματα. Η σταθερά ειδικότητας k_{cat}/K_m δεν μπορεί να υπερβεί το όριο της διάχυσης μορίων σε διάλυμα ($10^8 - 10^9 s^{-1} \cdot M^{-1}$). Σε κάποια ένζυμα η παραπάνω σταθερά πλησιάζει αυτό το όριο και η μετατροπή των υποστρώματων τους σε

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} \cdot [E]_0 \cdot [S] \approx \frac{k_{cat}}{K_m} \cdot [E] \cdot [S] \quad \text{Εξίσωση 5}$$



προϊόντα γίνεται τόσο γρήγορα όσο γρήγορα τους παρέχονται από το διάλυμα (έχουν αποκτήσει δηλαδή καταλυτική τελειότητα). (Coperland R. A., 2000). Στις β-λακταμάσες σερίνης ο καταλυτικός μηχανισμός μπορεί να περιγραφεί από το σχήμα 2 (Matagne A. και συν., 1998). Όπου k_2 και k_3 οι σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεων ακυλίωσης και απακυλίωσης αντίστοιχα. Οι κινητικές παράμετροι σταθερής κατάστασης k_{cat} , K_m , και k_{cat}/K_m σχετίζονται με αυτές στην κατάσταση ισορροπίας (η οποία σε αυτή την περίπτωση προϋποθέτει τόσο η συγκέντρωση του συμπλόκου *Michaelis* όσο και του ακυλενζύμου να διατηρούνται σταθερές) βάσει των εξισώσεων 6, 7 και 8 (Galleni M. και Frere J. M., 2007). Αμινοξικές αλλαγές στις β-λακταμάσες που οδηγούν σε φαινοτύπους αντοχής έναντι νέων β-λακταμικών αντιβιοτικών τροποποιούν τις μικροσκοπικές σταθερές των επιμέρους σταδίων με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται η συνολική απόδοση της αντίδρασης. Η καταλυτική απόδοση συνηθίζεται να εκτιμάται με το πηλίκο

$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad \text{Εξίσωση 6}$$

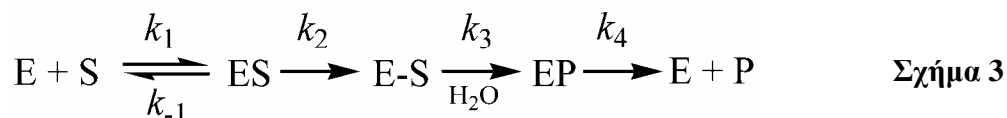
$$K_m = \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Εξίσωση 7}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2} \quad \text{Εξίσωση 8}$$

k_{cat}/K_m αλλά στις περιπτώσεις όπου η αύξηση της καταλυτικής ικανότητας οφείλεται αποκλειστικά στην αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης του εστέρα (k_3) όταν αυτή αποτελεί το περιοριστικό στάδιο της αντίδρασης το πηλίκο αυτό δεν επηρεάζεται σύμφωνα με την εξίσωση 8 (Page M. G., 2008). Αυτό ισχύει ως ένα βαθμό για τις βΛτC κατά την αλληλεπίδρασή τους με τις οξυμίμο κεφαλοσπορίνες όπου το ένζυμο ακυλιώνεται πολύ γρήγορα αλλά το ακυλ-ένζυμο υδρολύεται με πολύ αργό ρυθμό και μεταλλάξεις που αυξάνουν την υδρολυτική ικανότητα δεν έχουν μεγάλη επίδραση στο k_{cat}/K_m . Σύμφωνα με το σχήμα 2 η βελτίωση της απόδοσης κατάλυσης των β-

λακταμασών μέσω μεταλλάξεων μπορεί να επιτευχθεί με α) αύξηση της ταχύτητας δημιουργίας του συμπλόκου *Michaelis* k_1 , β) μείωση της ταχύτητας διάστασης αυτού του συμπλόκου k_{-1} , γ) αύξηση της ταχύτητας ακυλίωσης k_2 και δ) αύξηση της ταχύτητας απακυλίωσης k_3 . Οι μεταβολές αυτές αντανακλώνται στις παραμέτρους κινητικής σταθερής κατάστασης που υπολογίζονται βάσει των εξισώσεων 1 και 2 με εκτίμηση της αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Έτσι αν η μετάλλαξη βελτιώσει τη συγγένεια του ενζύμου για ένα δεδομένο υπόστρωμα μόνο (μέσω αύξησης της k_1 και μείωση της k_{-1}) θα παρατηρηθεί μείωση της K_m και ανάλογη αύξηση του k_{cat}/K_m με την σταθερά κατάλυσης να παραμένει σταθερή. Όταν αυξάνεται κάποια από τις σταθερές k_2 ή k_3 τότε αυξάνεται η σταθερά *Michaelis* ενώ η k_{cat} αυξάνεται μόνο στην περίπτωση που το στάδιο που επηρεάζεται είναι το περιοριστικό (Page M. G., 2008). Στην πραγματικότητα οι περισσότερες μεταλλάξεις επάγουν πιο σύνθετες αλλαγές επηρεάζοντας περισσότερο από ένα στάδια κατάλυσης με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το ποιο στάδιο της αντίδρασης επηρεάζεται από τις μακροσκοπικές σταθερές. Αλλαγές μεγάλης τάξης μεγέθους στην k_{cat} προκαλούνται συνήθως από ταυτόχρονη τροποποίηση των ταχυτήτων τόσο της ακυλίωσης όσο και της απακυλίωσης (Page M. G., 2008).

Ο καταλυτικός μηχανισμός που περιγράφεται στο σχήμα 2 είναι μία προσέγγιση της πραγματικότητας. Οι διάφορες β-λακταμάσες σερίνης κατά την υδρόλυση συγκεκριμένων υποστρωμάτων παρουσιάζουν περισσότερο περίπλοκα μονοπάτια αντιδράσεων. Έτσι στην περίπτωση που η απομάκρυνση των προϊόντων από το ενεργό κέντρο παρεμποδίζεται για κάποιο λόγο τότε η συνολική ταχύτητα της αντίδρασης θα εξαρτάται και από την ταχύτητα αυτού του σταδίου (σχήμα 3). Στις μακροσκοπικές



καταλυτικές παραμέτρους επηρεάζεται τότε και η σταθερά ταχύτητας απομάκρυνσης των προϊόντων k_4 (Page M. G., 2008). Εφαρμόζοντας την προσέγγιση σταθερής

κατάστασης και για το μη ομοιοπολικό σύμπλοκο ενζύμου προϊόντος προκύπτουν οι εξισώσεις 9 και 10.

$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot k_4}{k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4 + k_3 \cdot k_4} \quad \text{Εξίσωση 9}$$

$$K_m = \frac{k_3 \cdot k_4}{k_2 \cdot k_3 + k_2 \cdot k_4 + k_3 \cdot k_4} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Εξίσωση 10}$$

Είναι σαφές ότι ακόμα και για τους παραπάνω σχετικά απλούς μηχανισμούς οι σταθερές κατάλυσης k_{cat} και K_m είναι σύνθετες εμπιριέχοντας το σύνολο των σταθερών ταχύτητας των καταλυτικών βημάτων και άρα επηρεάζονται σημαντικά από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν σε αυτές. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι η θερμοκρασία (σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius η ταχύτητα των αντιδράσεων αυξάνεται εκθετικά με την αύξηση της θερμοκρασίας) και το pH του διαλύματος καθώς όπως αναφέρθηκε η πορεία της κατάλυσης εξαρτάται από την κατάσταση πρωτονίωσης ορισμένων καταλυτικών αμινοξέων (Fersht A., 1999). Έτσι όταν συγκρίνονται οι μακροσκοπικές κινητικές σταθερές ενός ενζύμου και ενός μεταλλάκτη του θα πρέπει οι πειραματικές συνθήκες να είναι ίδιες και να βρίσκονται υπό αυστηρό έλεγχο. Είναι συχνό το φαινόμενο εξάλλου όταν συγκρίνονται κινητικές σταθερές ίδιων ή συγγενικών ενζύμων που έχουν μετρηθεί από διαφορετικά εργαστήρια να παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις. Στα πειραματικά αυτά σφάλματα συμβάλλει και το ότι για να υπολογιστούν οι σταθερές αυτές προεξοφλείται ότι η δημιουργία και η κατανάλωση των συμπλόκων (ομοιοπολικών και μή) που συμμετέχει το ένζυμο βρίσκονται σε ισορροπία διαφορετικά η εξίσωση 1, που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό τους, δεν ισχύει. Η σταθερή κατάσταση είναι δύσκολο να επιτευχθεί κατά την υδρόλυση κάποιων β-λακταμικών υποστρωμάτων από συγκεκριμένες β-λακταμάσες και η ισορροπία υφίσταται μόνο για ένα μικρό διάστημα που διαρκεί για μερικές δεκάδες δευτερόλεπτα από την έναρξη της αντίδρασης.

Στην δυσκολία αυτή συμβάλλει και η ύπαρξη διακλαδισμένων αντιδράσεων που όπως αναφέρθηκε αφορούν είτε τη μετατροπή του υποστρώματος στο στάδιο του ακυλ-

Διακλαδισμένα μονοπάτια αντιδράσεων στο στάδιο του ακυλ-ένζυμου όπως αναφέρθηκε παρουσιάζουν και οι αναστολείς αυτοκτονίας των β-λακταμασών σερίνης (σχήμα 6) (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010; Papp-Wallace K. M. και συν., 2010). Η μη αντιστρεπτή αναστολή που προκαλούν τα μόρια αυτά μελετάται με πειράματα ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας ένα υπόστρωμα που υδρολύεται ικανοποιητικά από τα υπό εξέταση ένζυμα. Η πιο απλή παράμετρος που μπορεί να υπολογιστεί είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50 % μείωση στην ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος αναφοράς (IC_{50}). Η παράμετρος αυτή αν και είναι κατάλληλη στο να προσδιορίσει το πόσο ισχυρός είναι ένας αναστολέας έναντι συγκεκριμένων ενζύμων δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για μηχανιστικές συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ενζύμων καθώς η αναστολή που προκαλούν τα συγκεκριμένα μόρια εξαρτάται από την ταχύτητα ακυλίωσης της καταλυτικής σερίνης, την απόδοση των δευτερογενών αντιδράσεων που οδηγούν σε ρίζες ακυλενζύμου που δεν υδρολύονται, την υδρόλυση κάποιων ακυλενζύμων (π.χ. οι ρίζες ιμίνης των ακυλ-ένζυμων του κλαβουλανικού οξέος και των σουλφονών) αλλά και από την συγγένεια που έχει το ένζυμο για το υπόστρωμα που ανταγωνίζεται ο αναστολέας (Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Με κατάλληλη ρύθμιση των πειραματικών συνθηκών όπως για παράδειγμα αυξημένοι χρόνοι επώασης των ενζύμων με τους αναστολείς, συγκέντρωση υποστρώματος στα επίπεδα της K_m που παρουσιάζει το κάθε ένζυμο και θεωρώντας ότι η υδρόλυση είναι πολύ χαμηλή οι τιμές των IC_{50} μπορούν να συγκριθούν με μεγαλύτερη ασφάλεια. Ακριβέστερη προσέγγιση της ισχύος αναστολής επιτυγχάνεται με υπολογισμό των σταθερών αναστολής (K_i). Δύο τύποι σταθερών αυτού του είδους μπορεί να υπολογιστούν: η κινητική σταθερά αναστολής που είναι αντίστοιχη με την K_m όταν το β-λακταμικό συμπεριφέρεται ως υπόστρωμα και εσωκλύει εκτός από την σταθερά διάστασης τις σταθερές ταχύτητας ακυλίωσης και απακυλίωσης και η θερμοδυναμική σταθερά αναστολής που αντιστοιχεί στην σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου αναστολέα. Ο υπολογισμός της κινητικής σταθεράς αναστολής γίνεται με προσδιορισμό του ρυθμού αναστολής (k_{obs}) που παρουσιάζει το β-λακταμικό κατά την σχετικά αργή μη-αντιστρεπτή (εξαιτίας της ακυλίωσης) δέσμευσή του στο ένζυμο παρακολουθώντας

την αλλαγή στον ρυθμό ταχύτητας της υδρόλυσης του υποστρώματος αναφοράς για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σύμφωνα με την εξίσωση 11 (Copeland R. A., 2000). (όπου [P] η συγκέντρωση του προϊόντος, V_0 η αρχική ταχύτητα και V_f η τελική ταχύτητα στο παράθυρο του χρόνου που εξετάζεται). Το [P] κατά τον φασματοφωτομετρικό

$$[P] = V_f \cdot t + \frac{V_0 - V_f}{k_{obs}} \cdot (1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)) \quad \text{Εξίσωση 11}$$

προσδιορισμό της υδρόλυσης των β-λακταμικών μπορεί να προσομοιωθεί από την διαφορά των απορροφήσεων $A_{app} - A_t$ με την προϋπόθεση ότι και οι ταχύτητες V_0 και V_f εκφράζονται ως dA/dt . (Papp-Wallace K. M. και συν., 2010)

Έχει βρεθεί εμπειρικά ότι αυξάνοντας την συγκέντρωση του αναστολέα και διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του υποστρώματος ο ρυθμός αναστολής θα αυξάνεται σύμφωνα με την εξίσωση 1 όπου V τώρα θα είναι η k_{obs} , το V_{max} η μέγιστη ταχύτητα αναστολής k_{inact} που επιτυγχάνεται σε "άπειρη" συγκέντρωση αναστολέα, [S] η συγκέντρωση του αναστολέα [I], και K_m θα είναι η κινητική σταθερά αναστολής K_i η οποία αντιστοιχεί στην συγκέντρωση αναστολέα όπου η k_{obs} είναι η μισή της k_{inact} (Copeland R. A., 2000; Papp-Wallace K. M. και συν., 2010). Με επώαση ποσοτήτων ενζύμου και αναστολέα σε διάφορες αναλογίες για χρονικό διάστημα τέτοιο ώστε να έχει επιτευχθεί ισορροπία και στη συνέχεια μέτρηση της εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας μπορεί να εκτιμηθεί το πηλίκιο I:E όπου παρατηρείται >90% αναστολή του ενζύμου το οποίο δίνει ένα μέτρο για την στοιχειομετρία της αντίδρασης ενζύμου αναστολέα (δηλαδή πόσα μόρια αναστολέα χρειάζονται για να προκαλέσουν πλήρη αναστολή ενός μορίου ενζύμου ή διαφορετικά σε πόσους κύκλους αντίδρασης επιτυγχάνεται πλήρης αναστολή). Το πηλίκιο αυτό ονομάζεται αριθμός ανακύκλωσης (*turn-over number*, t_n) και ισούται με το πηλίκιο k_{cat}/k_{inact} το οποίο είναι αυξημένο όταν η ταχύτητα αναστολής είναι μικρή ή όταν η ταχύτητα υδρόλυσης του ακυλενζύμου είναι αυξημένη (Bush K. και συν., 1993; Drawz S. M. και Bonomo R. A., 2010). Για το σχήμα 6 είναι $k_{cat}/k_{inact} = k_3/k_4$ (Papp-Wallace K. M. και συν., 2010). Η θερμοδυναμική σταθερά αναστολής (K_i ή $K_D = k_{-1}/k_1$) μπορεί να υπολογιστεί με πειράματα ανταγωνισμού μόνο κατά τα στάδια πριν την κατάσταση ισορροπίας σύμφωνα με την εξίσωση Morrison που χαρακτηρίζει την αναστολή ενζύμων από μόρια που δεσμεύονται πολύ ισχυρά (Copeland R. A., 2000; Frase H. και συν., 2009). Συνήθως η θερμοδυναμική σταθερά

είναι μικρότερη από την κινητική. Στις περιπτώσεις όπου η ακυλίωση και η συσσώρευση ριζών που δεν έχουν τη δυνατότητα να υδρολυθούν είναι πολύ γρήγορες τότε οι δύο σταθερές ενδέχεται να συμπίπτουν. Οι αλληλεπιδράσεις β-λακταμικών υποστρωμάτων με β-λακταμάσες τις οποίες ακυλιώνουν γρήγορα και σχετικά μόνιμα μπορεί να περιγραφούν από τις παραπάνω εξισώσεις με κάποιες όμως τροποποιήσεις (De Meester F. και συν., 1987).

Η παράμετρος της δομής στις μελέτες συσχέτισης αυτής με την λειτουργία των μορίων συνήθως διερευνάται με κρυσταλλογραφία. Οι κρυσταλλογραφικές δομές των διαφόρων τύπων β-λακταμασών εντός κάθε τάξης όταν αυτές είναι σε ελεύθερη κατάσταση δείχνουν ότι η τριτοταγής δομή των ενζύμων είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη. Μεταλλάκτες με πολύ διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες ενδέχεται να μην διαφέρουν δομικά από το πατρικό ένζυμο όταν είναι σε ελεύθερη κατάσταση. Συνεπώς απαιτείται γνώση της δομής των συμπλόκων που δημιουργούν με τα υποστρώματα για τα οποία εμφανίζουν διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες. Σύμπλοκα *Michaelis* φυσικών β-λακταμασών σερίνης με τα υποστρώματά τους έχουν κρυσταλλοποιηθεί σπάνια, καθώς όπως φαίνεται η ακυλίωση του καταλυτικού αμινοξέος και στις συνθήκες του κρυστάλλου είναι πολύ αποδοτική ακόμα και στις περιπτώσεις που το στάδιο αυτό καταλύεται με χαμηλή ταχύτητα. Μη ομοιοπολικά σύμπλοκα των ενζύμων αυτών με τα υποστρώματά τους μπορούν να προκύψουν μεταλλάσσοντας τα καταλυτικά αμινοξέα (συνήθως την καταλυτική σερίνη ή την λυσίνη του μοτίβου SXXK) αλλά σε αυτή την περίπτωση τα όποια αποτελέσματα θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή καθώς είναι βέβαιη η αλλαγή στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου λόγω των μεταλλάξεων σημαντικών αμινοξικών θέσεων. Ο προσδιορισμός της δομής ακύλ-ενζύμων είναι πιο εύκολος αρκεί να εξετάζονται υποστρώματα τα οποία παρουσιάζουν χαμηλές ταχύτητες απακυλίωσης. Για αρκετά β-λακταμικά όμως (π.χ. πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες) είναι δύσκολη η παγίδευση ακύλ-ενζύμου στον κρύσταλλο. Όπως και παραπάνω μεταλλάξεις σε σημαντικά για την απακυλίωση αμινοξέα μπορούν να επιτρέψουν την ανάκτηση αντίστοιχων δομών. Εύρεση της δομής σε χαμηλά ή υψηλά pH όπου τα ένζυμα θα παρουσιάζουν πολύ χαμηλή ενεργότητα μπορεί επίσης να επιτρέψει τη μελέτη των συμπλόκων που εμφανίζονται κατά την διάρκεια της αντίδρασης αλλά σε αυτήν την περίπτωση τα ένζυμα πρέπει να είναι σταθερά στις αντίστοιχες συνθήκες ενώ

αποκλίσεις από τη δομή που θα απαντά σε φυσιολογικές συνθήκες πρέπει να θεωρούνται δεδομένες. Σημαντικό εργαλείο στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των β-λακταμασών με τα υποστρώματά τους είναι η χρήση μορίων που δημιουργούν ομοιοπολικά σύμπλοκα με την καταλυτική σερίνη και φέρουν τις πλευρικές αλυσίδες των β-λακταμικών. Τα μόρια αυτά λειτουργούν ως αναστολείς των ενζύμων δημιουργώντας σταθερά σύμπλοκα τα οποία στις περιπτώσεις βορονικών ή φωσφονικών οξέων είναι αντίστοιχα των τετραεδρικών καταστάσεων μετάπτωσης που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η χρήση ανάλογων μορίων είναι διαδεδομένη και στη μελέτη άλλων ακύλτρασφερασών σερίνης όπως οι πρωτεάσες.

Δομές συμπλόκων με β-λακταμικά ή ανάλογα αυτών, μεταλλαγμένων και πατρικών ενζύμων ενδέχεται επίσης να μην διαφέρουν γεγονός που υποδεικνύει ότι οι αλλαγές που οδηγούν σε διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες δεν αφορούν την πυθμενική ή πυθμενικές καταστάσεις αλλά την δυναμική του μορίου. Δομική ανάλυση των διαφόρων διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει μία πρωτεΐνη σε διάλυμα μπορεί να γίνει με φασματοσκοπία NMR ή με κυκλικό διχρωισμό (CD) όπου εξετάζεται το περιεχόμενο μίας πρωτεΐνης ως προς τις δευτεροταγείς δομές οι οποίες ενδέχεται να μεταβάλλονται κατά τη δέσμευση του υποστρώματος και την πορεία της αντίδρασης ή σε πιθανό ισομερισμό των ενζύμων. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες που έχουν προκύψει από κρυσταλλογραφία προσφέρει επίσης τη δυνατότητα λεπτομερούς εξέτασης των πιθανών διαμορφώσεων των ενζύμων κατά τα διάφορα στάδια της αντίδρασης. Η δομή και η φύση των διαφόρων ριζών που ενδέχεται να εμφανιστούν κατά την αλληλεπίδραση των ενζύμων με τα β-λακταμικά υποστρώματα σε διάλυμα μπορούν να μελετηθούν με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως φασματοσκοπία μάζας (MS), υπέρυθρου (IR) και Raman.

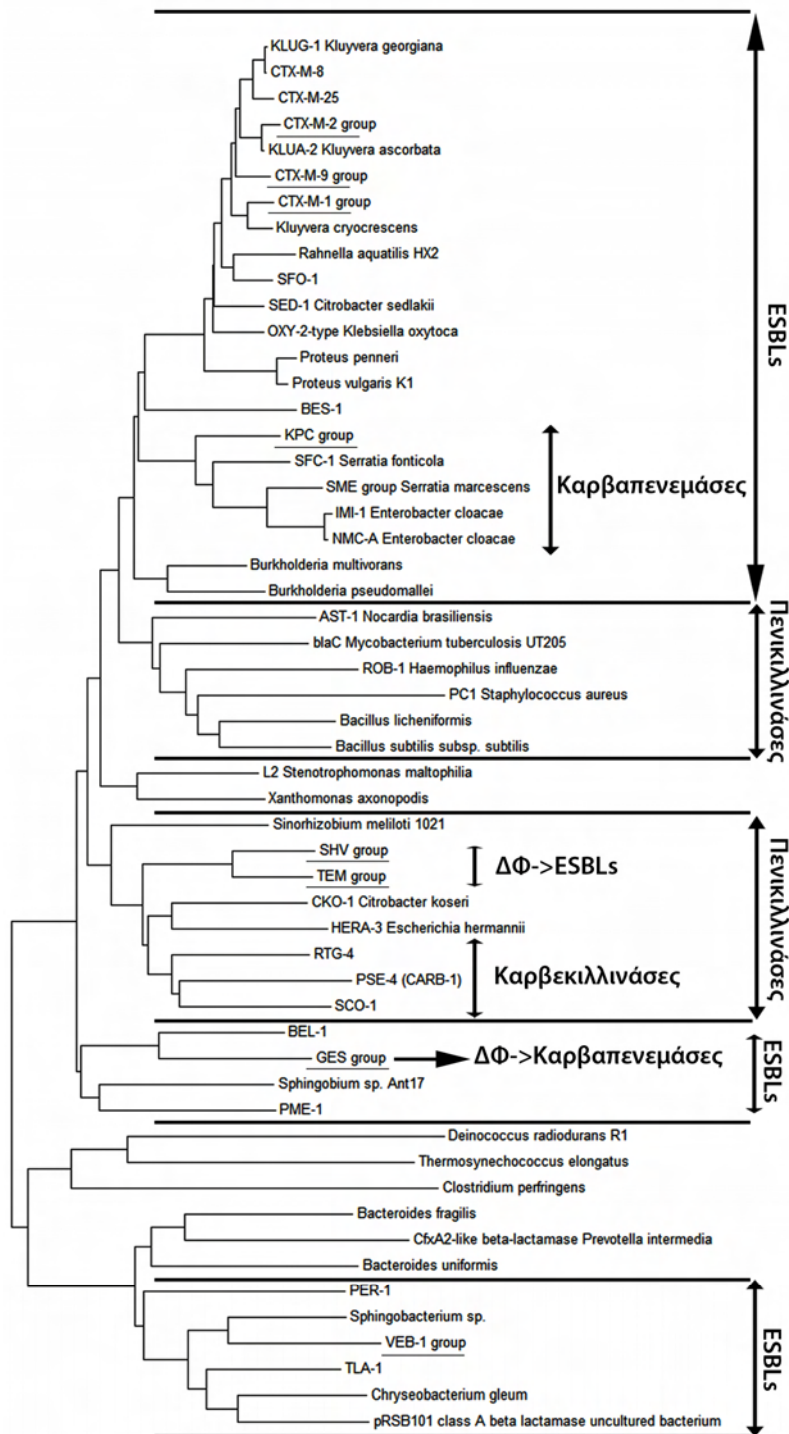
B. β-λακταμάσες μοριακής τάξης A

i. Τύποι, γενετική εντόπιση και κινητοποίηση

Οι β-λακταμάσες τάξης A είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες και αντιπρόσωποι αυτών απαντούν στα χρωμοσώματα μεγάλου αριθμού εξελικτικά απομακρυσμένων βακτηρίων (Hall B. G. και Barlow M., 2004). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των βΛτA εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια με τις μεταξύ τους ομολογίες αρκετές φορές να είναι μικρότερες από

30% . Παρ' όλα αυτά όλες μοιράζονται σχεδόν ταυτόσημες τριτοταγείς δομές και τον ίδιο μηχανισμό κατάλυσης. Ανεξάρτητα γεγονότα μεταφοράς γονιδίων βΛτΑ σε πλασμίδια συντέλεσαν στην εξάπλωση τους σε ευαίσθητα βακτηριακά στελέχη. Για τα περισσότερα από τα γονίδια μεταφερόμενων γονιδίων βΛτΑ ο χρωμοσωμικός πρόγονος είναι άγνωστος. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων η ομολογία που εμφανίζουν τα γονίδια αυτά με τα αντίστοιχα χρωμοσωμικά βακτηρίων των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί είναι πολύ χαμηλή (Εικόνα 19). Το παραπάνω είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο ότι το ποσοστό των γνωστών γονιδιωμάτων είναι πολύ μικρό σε σχέση με τον αριθμό των βακτηριακών ειδών που υπάρχουν στη φύση χωρίς όμως να μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα τα γεγονότα μεταφοράς κάποιων γονιδίων να έγιναν σε απομακρυσμένο εξελικτικό χρόνο.

Η πρώτη βΛτΑ με κλινική σημασία ήταν η πενικιλινάση PC1 στελεχών *S. aureus*. Το ένζυμο αυτό υδρόλυε ουσιαστικά μόνο πενικιλίνες ενώ είχε μικρή ενεργότητα έναντι των κεφαλοσπορινών (Ambler R. P., 1975). Ο πληθυσμός των Gram αρνητικών βακτηρίων που απομονώνονταν σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα έπειτα από κάποια χρόνια χρήσης β-λακταμικών άρχισε να εμφανίζει και αυτός αντοχή εξαιτίας ενός παράγοντα πλασμιδιακής εντόπισης ο οποίος μπορούσε να μεταφερθεί και από πλασμίδιο σε πλασμίδιο ή από πλασμίδια σε χρωμοσώματα (Datta N. και Kontomichalou P., 1965; Heffron F. και συν., 1975). Ο παράγοντας αυτός ήταν το γονίδιο της TEM-1 β-λακταμάσης η οποία διατηρώντας την καταλυτική της ικανότητα έναντι των πενικιλινών είχε παράλληλα και αυξημένη ενεργότητα έναντι των κεφαλοσπορινών πρώτης γενεάς σε σχέση με την πενικιλινάση του *S. aureus* (διευρημένο φάσμα δράσης). Τα γονίδια *bla*_{TEM} είχαν εξαπλωθεί ήδη από τη δεκαετία του 1970 σε διάφορα Gram αρνητικά που ανήκαν κυρίως σε πρωτεοβακτήρια με τα εντεροβακτηριακά *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *P. mirabilis* και *Providencia sp.* να είναι από τους κύριους ξενιστές ενώ εντοπίζονταν και σε άλλα Gram αρνητικά (*P. aeruginosa*, *H. influenzae* και *N. gonorrhoeae*) (Bradford P. A., 2001). Τις ίδιες βιοχημικές ιδιότητες είχαν και τα συγγενικά με τις TEM ένζυμα τύπου SHV-1 που επιλέχθηκαν επίσης σε παράλληλο χρόνο και εξαπλώθηκαν κυρίως στα εντεροβακτηριακά και ιδιαίτερα σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* (εντοπίζονται κυρίως σε *K. pneumoniae* ενώ έχει



Εικόνα 19: Φυλογενετικές σχέσεις των β-λακταμασών τάξης A οι οποίες υπολογίστηκαν με τον αλγόριθμο Neighbor joining χρησιμοποιώντας αντιστοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών τους. Οι αλληλουχίες αναλύθηκαν με το λογισμικό MEGA. Οι περισσότερες φυλογενετικές γραμμές χαρακτηρίζονται από κοινές καταλυτικές ιδιότητες. Οι κλινικά σημαντικές επίκτητες βΛαΑ υπογραμμίζονται. Οι βΛαΑ που παράγονται από χρωμοσωμικά γονίδια συγκεκριμένων βακτηρίων δίνονται με τα ονόματα των μικροοργανισμών. Οι TEM και SHV μπορούν να διευρύνουν το φάσμα τους προς την υδρόλυση κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς και οι GES προς καρβαπενέμες. ESBLs: εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες. ΔΦ: διεύρυνση φάσματος.

υποθεθεί ότι προέρχονται από το αντίστοιχο χρωμοσωμικό γονίδιο του συγκεκριμένου είδους) (Matthew M. και συν., 1979; Miriagou V. και συν., 2005). Σήμερα σποραδική εντόπιση των γονιδίων των TEM και SHV β-λακταμασών αναφέρεται και σε *A. baumannii* (Poirel L. και συν., 2012).

Σημειακές μεταλλάξεις (συνήθως περισσότερες από μία) στα *bla*_{TEM} και *bla*_{SHV} των *Enterobacteriaceae* οδηγούν στην διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων τους ώστε να υδρολύουν και τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (Knox J. R., 1995; Tzouveleki L. S. και Bonomo R. A., 1999; Bradford P. A., 2001). Εξαιτίας αυτής της ιδιότητάς τους οι παραπάνω ποικιλίες καθιερώθηκε να ονομάζονται εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ΕΦΒΛ και στην αγγλική βιβλιογραφία ESBLs). Ορισμένες ποικιλίες δεν απενεργοποιούνται αποδοτικά από τους αναστολείς αυτοκτονίας ενώ κάποιοι μεταλλάκτες των TEM εμφανίζουν σύνθετες ιδιότητες παρουσιάζοντας τόσο χαρακτήρα ΕΦΒΛ όσο και ανθεκτικότητα στους αναστολείς. Ως σήμερα έχουν βρεθεί 217 ποικιλίες TEM από τις οποίες 91 έχουν χαρακτηριστεί ως ΕΦΒΛ, 38 ως ανθεκτικές σε αναστολή (Inhibitor Resistant TEM, IRT) ενώ 11 διαθέτουν σύνθετες ιδιότητες (CMT) (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>). Οι SHV δεν έχουν υποστεί ανάλογη φαινοτυπική διαφοροποίηση και από τις 183 ποικιλίες που είναι σήμερα γνωστές 46 είναι ΕΦΒΛ και 5 ανθεκτικές σε αναστολή (<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>). Οι TEM και SHV ΕΦΒΛ οδήγησαν στο πρώτο επιδημικό κύμα ανθεκτικών στις οξυμίμο κεφαλοσπορίνες εντεροβακτηριακών στελεχών (Bradford P. A., 2001). Οι ευρύτερα διαδεδομένες είναι οι TEM-3, TEM-52, SHV-12 και SHV-5 (Poirel L. και συν., 2012).

Το δεύτερο ανάλογο κύμα αφορούσε την εξάπλωση στελεχών που παρήγαγαν τις CTX-M β-λακταμάσες (Bonnet R., 2004; Canton R. και Coque T. M., 2006). Τα αντίστοιχα γονίδια μεταφέρθηκαν σε πλασμίδια από τα χρωμοσώματα βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Kluyvera* sp. των εντεροβακτηριακών με τα *Kluyvera cryocrescens*, *K. ascorbata* και *K. georgiana* να φέρουν πολύ συγγενικά γονίδια (Decousser J. W. και συν., 2001; Humeniuk C. και συν., 2002; Poirel L. και συν., 2002). Τα ένζυμα CTX-M είχαν ήδη την ικανότητα υδρόλυσης οξυμίμο κεφαλοσπορινών δείχνοντας προτίμηση στην κεφοταξίμη και στα συγγενή με αυτή μόρια (π.χ. κεφτριαξόνη) και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως κεφοταξιμάσες (Bonnet R., 2004). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 152 ένζυμα τύπου CTX-M (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) τα οποία

διαφοροποιούνται σε 4 ή 5 διακριτές ομάδες με το πιο διαδεδομένα να είναι αυτά των ομάδων της CTX-M-1 (περιέχει τις κλινικά σημαντικές CTX-M-3 και CTX-M-15), CTX-M-2 και CTX-M-9. Φαινοτυπική διαφοροποίηση μέσω μεταλλάξεων συμβαίνει και στα ένζυμα αυτού του τύπου αλλά είναι πολύ περιορισμένου βαθμού και αφορά την διεύρυνση του φάσματος προς οξυίμινο υποστρώματα (όπως κεφταζιδίμη, κεφεπίμη και αζτρεονάμη) που δεν υδρολύονται αποδοτικά από τους τυπικούς αντιπροσώπους της ομάδας (Bonnet R., 2004).

Τα *bla*_{CTX-M} έχουν εξαπλωθεί πέρα από τα *E. coli* και *K. pneumoniae* (Mavroidi A. και συν., 2002; Bonnet R., 2004) και σε άλλα εντεροβακτηριακά κυρίως *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* (Bonnet R., 2004) ενώ λιγότερο συχνά απαντούν στα *Citrobacter freundii*, *Serratia* sp., *Pantoea agglomerans*, *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. και στα συγγενικά με το *E. coli* *Shigella* sp. (Kanamori H. και συν., 2011; Aibinu I. και συν., 2012; Mlynarczyk, A. και συν., 2009). Εκτός από την εξάπλωση των συγκεκριμένων γονιδίων σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα το τελευταίο διάστημα εντοπίζονται συχνά και σε βακτήρια που απομονώνονται από ασθενείς της κοινότητας, από ζώα αλλά και από φυσικά περιβάλλοντα (Hu Y. Y. και συν., 2013). Ο εντοπισμός τους δεν περιορίζεται μόνο στα εντεροβακτηριακά αλλά και σε στελέχη *Aeromonas* sp. και *Pseudomonas* sp. που απομονώνονται από υδάτινα οικοσυστήματα (Maravic A. και συν., 2013; Tacao M. και συν., 2014).

Οι CTX-M ανήκουν σε μία ευρύτερη φυλογενετική γραμμή των βΛτΑ που περιλαμβάνει και άλλα ένζυμα με ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος (Εικόνα 19). Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται είτε από χρωμοσωμικά γονίδια Gram αρνητικών (π.χ. *Serratia fonticola* AmpA, SED-1 *C. freundii*, *Proteus vulgaris* K1, *Burkholderia pseudomalei*; Tamaki M. και συν., 1994; ; Matsumoto Y. και Inoue M., 1999; Petrella S. και συν., 2001; Papp-Wallace K. M. και συν., 2013) είτε από πλασμιδιακά εντοπισμένα (π.χ. SFO-1, BES-1) που έχουν βρεθεί σποραδικά σε κάποια Εντεροβακτήρια (Matsumoto Y. και Inoue M., 1999; Bonnet R. και συν., 2000). Συγγενικές με τα παραπάνω μόρια είναι και οι βΛτΑ που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν εκτός από το οξυίμινο υποστρώματα και καρβαπενέμες. Οι καρβαπενεμάσες τάξης A αρχικά βρέθηκαν στα χρωμοσώματα κάποιων στελεχών *E. cloacae* (NMC-A; Naas T. και Nordmann P., 1994; Mariotte-Boyer S. και συν., 1996 και IMI-1, -5; Rasmussen B. A. και συν., 1996),

Serratia marcescens (SME-1, -5; Naas T. και συν., 1994; Queenan A. M. και συν., 2000; Queenan A. M. και συν., 2006) και *S. fonticola* (SFC-1; Henriques I. και συν., 2004; Fonseca F. και συν., 2007). Τα ένζυμα αυτά αν και εμφανίζουν ενδιαφέρον από άποψη βιοχημικών ιδιοτήτων όπως αποδείχθηκε δεν έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία καθώς ως τώρα δεν έχουν μεταφερθεί σε πλασμίδια (Queenan A. M. και Bush K., 2007). Ένας αντιπρόσωπος όμως της ομάδας μεταφέρθηκε σε πλασμίδια, εξαπλώθηκε και προκάλεσε επιδημίες ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* σε διάφορες χώρες μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα (άλλες χώρες που αντιμετώπισαν ανάλογες επιδημίες είναι οι ΗΠΑ και το Ισραήλ) (Tzouveleki L. S. και συν., 2012). Πρόκειται για τις καρβαπενεμάσες τύπου KPC-2 η πρώτη από τις οποίες βρέθηκε σε στέλεχος *S. enterica* sv. Cubana στις ΗΠΑ (Miriagou V. και συν., 2003) ενώ σύντομα αναφέρθηκαν και στελέχη *Klebsiella oxytoca* και *K. pneumoniae* που επίσης παρήγαγαν το ένζυμο (Yigit H. και συν., 2003; Smith Moland E. και συν., 2003). Σημειακές μεταλλάξεις έχουν δώσει 18 ποικιλίες (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) με την KPC-2 να εξακολουθεί να είναι η πιο διαδεδομένη από αυτές και να απομονώνεται από νοσοκομειακά στελέχη *K. pneumoniae* παγκοσμίως ενώ μικρότερου βαθμού παγκόσμια εξάπλωση εμφανίζει και η KPC-3 (κυρίως στις ΗΠΑ, Ισραήλ και Ιταλία) (Viau R. A. και συν., 2013; Garcia-Fernandez A. και συν., 2012). Κάποιες από τις αντικαταστάσεις αμινοξέων τροποποιούν ελαφρώς τις κινητικές σταθερές τους για τα διάφορα β-λακταμικά υποστρώματα χωρίς όμως να επάγουν δραματικές αλλαγές στην ειδικότητα των ενζύμων. Πέρα από τις *K. pneumoniae* εξακολουθούν να απομονώνονται από στελέχη *S. enterica* ενώ έχουν μεταφερθεί και σε *E. coli* (Mavroidi A. και συν., 2012). Στελέχη *E. cloacae*, *C. freundii* και *P. mirabilis* που παράγουν KPC-2 τύπου καρβαπενεμάση απομονώνονται σποραδικά (Luo Y. και συν., 2014; Tibbetts R. και συν., 2008).

Ένζυμα τα οποία έχουν διασπαρεί σε νοσοκομειακά στελέχη είναι και οι ΕΦΒΛ τύπου GES (Naas T. και συν., 2008). Εώς τώρα 24 φυσικοί μεταλλάκτες των ενζύμων έχουν βρεθεί κυρίως σε *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* και *A. baumannii* εντοπισμένα σε πλασμίδια και χρωμοσώματα ενώ η γεωγραφική τους εξάπλωση είναι παγκόσμια (Poirel L. και συν., 2000; Giakkouri P. και συν., 2000; Poirel L. και συν., 2001; Mavroidi A. και συν., 2001; Bae I. K. και συν., 2007; Delbruck H. και συν., 2012; Poirel L. και συν., 2012; Bebrone C. και συν., 2013). Μελέτες αλληλούχησης

βακτηριακών γονιδιωμάτων σε λύματα και υδάτινα οικοσυστήματα έχουν αναδείξει την ύπαρξη γονιδίων *bla*_{GES} σε μη καλλιεργημένα και περιβαλλοντικά βακτήρια γεγονός που δηλώνει διασπορά σε μη νοσοκομειακά ενδιαιτήματα (Manageiro V. και συν., 2013). Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις τροποποιούν την ειδικότητα των ενζύμων ισχυροποιώντας την ικανότητα υδρόλυσης οξυίμινο υποστρωμάτων ή προσδίδοντας χαρακτήρα καρβαπενεμάσης (Queenan A. M. και Bush K., 2007). Αυτή η ιδιότητα των ενζύμων τύπου GES (να μπορούν δηλαδή μέσω σημειακών μεταλλάξεων να αποκτήσουν ενεργότητα καρβαπενεμάσης) τα έχει αναδείξει ως κλινικά σημαντικά. Τη μεγαλύτερη ενεργότητα την εμφανίζει η GES-5 και τα παράγωγά της. Καρβαπενεμάσες τάξης A τύπου GES δεν έχουν βρεθεί ως τώρα σε στελέχη *K. pneumoniae*.

Περιορισμένη διασπορά εμφανίζουν οι ΕΦΒΛ τύπου PER-1 και VEB-1 (Nordmann P. και συν., 1993; Poirel L. και συν., 1999; Naas T. και συν., 2008; Poirel L. και συν., 2012). Τα γονίδια *bla*_{PER} έχουν βρεθεί σε *P. aureginosa* και *A. baumannii* ενώ σποραδικά έχουν αναφερθεί και σε κάποια εντεροβακτηριακά (Naas T. και συν., 2008). Σε συγκεκριμένους γεωγραφικούς τόπους η συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων που φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια ενδέχεται να είναι αυξημένη (π.χ. Τουρκία) (Poirel L. και συν., 2012). Επτά διαφορετικά ένζυμα έχουν αναφερθεί χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τις υδρολυτικές τους ιδιότητες. Στην Ευρώπη και την Ασία ο κύριος τύπος είναι η PER-1 ενώ στη Ν. Αμερική απομονώνονται πιο συχνά βακτήρια που παράγουν την PER-2 (Poirel L. και συν., 2012). Ανάλογα χαρακτηριστικά έχουν και τα ένζυμα τύπου VEB-1 (εννιά ποικιλίες) τα οποία απομονώνονται κυρίως από *A. baumannii* και *P. aureginosa* ενώ το τελευταίο διάστημα εντοπίζονται και σε Εντεροβακτήρια κυρίως *P. mirabilis* (Paragiannitsis C. C. και συν., 2012). Σποραδικά έχουν εμφανιστεί και κάποιες άλλες πλασμιδιακές ΕΦΒΛ όπως οι PME-1, BEL-1, -3 και TLA-1 χωρίς όμως να έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία (Silva J. και συν., 2000; Poirel L. και συν., 2005; Tian G. B. και συν., 2011). Κάποιου βαθμού διασπορά εμφανίζουν και πενικιλινάσες που είναι ειδικές ως προς την υδρόλυση καρβενικιλίνης (Choury D. και συν., 2000). Οι καρβενικιλινάσες (CARB-1, -15) εντοπίζονται σε πλασμίδια ή χρωμοσώματα κυρίως *P. aureginosa* και *A. baumannii* (Bonnin R. A. και συν., 2012) ενώ έχουν αναφερθεί και σε κάποια εντεροβακτηριακά (*Salmonella* sp. και *V. cholerae*; Llanes C. και συν., 1999; Melano R. και συν., 2002). Το συγγενικό με αυτές μόριο SCO-

I έχει βρεθεί σε *A. baumannii* και *E. coli* (Poirel L. και συν., 2007; Papagiannitsis C. C. και συν., 2007). Ένα ένζυμο της κατηγορίας, η RTG-4 (CARB-10) έχει αποκτήσει κάποια ενεργότητα υδρόλυσης οξυμίνο κεφαλοσπορινών ιδιαίτερα της κεφεπίμης (Potron A. και συν., 2009).

Τα γονίδια των βΛτΑ καθώς και άλλων παραγόντων αντοχής μπορούν να διασπαρούν σε βακτηριακούς πληθυσμούς μέσω μετακίνησης των αντίστοιχων γενετικών τόπων από χρωμοσώματα σε πλασμίδια και από πλασμίδια σε άλλα πλασμίδια ή χρωμοσώματα. Η μετακίνηση των γονιδίων αντοχής διαμεσολαβείται κυρίως από μεταθετά στοιχεία και ιντεγκρόνια (αν και τα ίδια δεν μπορούν να μετακινηθούν μπορούν να προσλάβουν μεταθετές κασσέτες γονιδίων μέσω ειδικών αλληλουχίων ανασυνδυασμού). Τα μεταθετά στοιχεία στην πιο απλή μορφή τους δομούνται από το γονίδιο μίας πρωτεΐνης (τρανσποζάση) η οποία καταλύει τον ανασυνδυασμό του συγκεκριμένου τμήματος με μη-ομόλογο DNA μέσω αναγνώρισης των δύο αλληλουχίων αναστραμμένων επαναλήψεων (Inverted Repeats, IR Left και IR) που βρίσκονται στα 5' και 3' άκρα του γονιδίου (Nevers P. και Saedler H., 1977). Αυτές οι αλληλουχίες εισδοχής (IS) μπορούν να μετακινηθούν σε διάφορα νουκλεϊκά οξέα είτε χρωμοσωμικά είτε πλασμιδιακά οδηγώντας σε διπλασιασμό της θέσης εισδοχής τους. Κάποιες από αυτές έχουν τη δυνατότητα να μετακινούν κατά την διάρκεια της μετάθεσης και το γειτονικό τμήμα του DNA που βρίσκεται κατωμερώς του IRR αναγνωρίζοντας την δική τους αλληλουχία IRL και κάποια άλλη αλληλουχία που εντοπίζεται στο τμήμα που αποσπάται και λειτουργεί ως μη-τυπική αλληλουχία IRR. Αυτό το είδος μετακίνησης ονομάζεται μετάθεση ενός άκρου και όταν οι αντίστοιχες IS (π.χ. Tn21, *ISEcp1*; Avila P. και συν., 1988; Poirel L. και συν., 2005) βρεθούν "δίπλα" στο γονίδιο κάποιας βΛ μπορούν να το αποσπάσουν και να το εισάγουν σε διαφορετικά σημεία του ίδιου μορίου ή σε διαφορετικά μόρια. Άλλες αλληλουχίες εισδοχής μπορούν επίσης να μετακινήσουν γειτονικά τμήματα μέσω μετάθεσης κυλιώμενου κύκλου (IS91 και ISCR τύπου) (Tavakoli N. και συν., 2000; Toleman M. A. και συν., 2006). Δύο αλληλουχίες εισδοχής ίδιου ή συγγενικών τύπων μπορούν να μετακινήσουν το τμήμα του DNA που παρεμβάλλεται μεταξύ τους με την τρανσποζάση να αναγνωρίζει την IRL της μίας IS και την IRR της άλλης. Αυτές οι διατάξεις χαρακτηρίζονται ως σύνθετα τρανσποζόνια τάξης I και αποτελούν έναν από τους συνήθεις τρόπους μετακίνησης γονιδίων βΛ (π.χ. τα

τρανσποζόνια που δομούνται από τις IS26) (Miriagou V. και συν., 2005). Ένας άλλος τύπος σύνθετων τρανσποζονίων αφορά αυτά τα οποία περιλαμβάνουν εκτός από το γονίδιο της τρανσποζάσης το γονίδιο και μίας ρεζολβάσης που καταλύει την απομάκρυνση του ενός αντιγράφου του τρανσποζονίου από το ανασυνδυασμένο μόριο ενώ μεταξύ των ακραίων ανεστραμμένων επαναλήψεων παρεμβάλλονται και άλλα τρανσποζόνια ή γονίδια αντοχής (Lett M. C., 1988). Για παράδειγμα το πρώτο τρανσποζόνιο που βρέθηκε ήταν αυτού του τύπου και περιείχε το γονίδιο TEM β-λακταμάσης (Tn3 τρανσποζόνιο τάξης II). Οι αλληλουχίες εισδοχής παρέχουν υποκινητές για την έκφραση των γειτονικών τους γονιδίων (π.χ. IS1, *ISEcp1*, IS26 κ.α.) και η απόσταση των γονιδίων βλ από αυτούς προσδιορίζει ως ένα βαθμό την απόδοση της μεταγραφής (Poirel L. και συν., 2012).

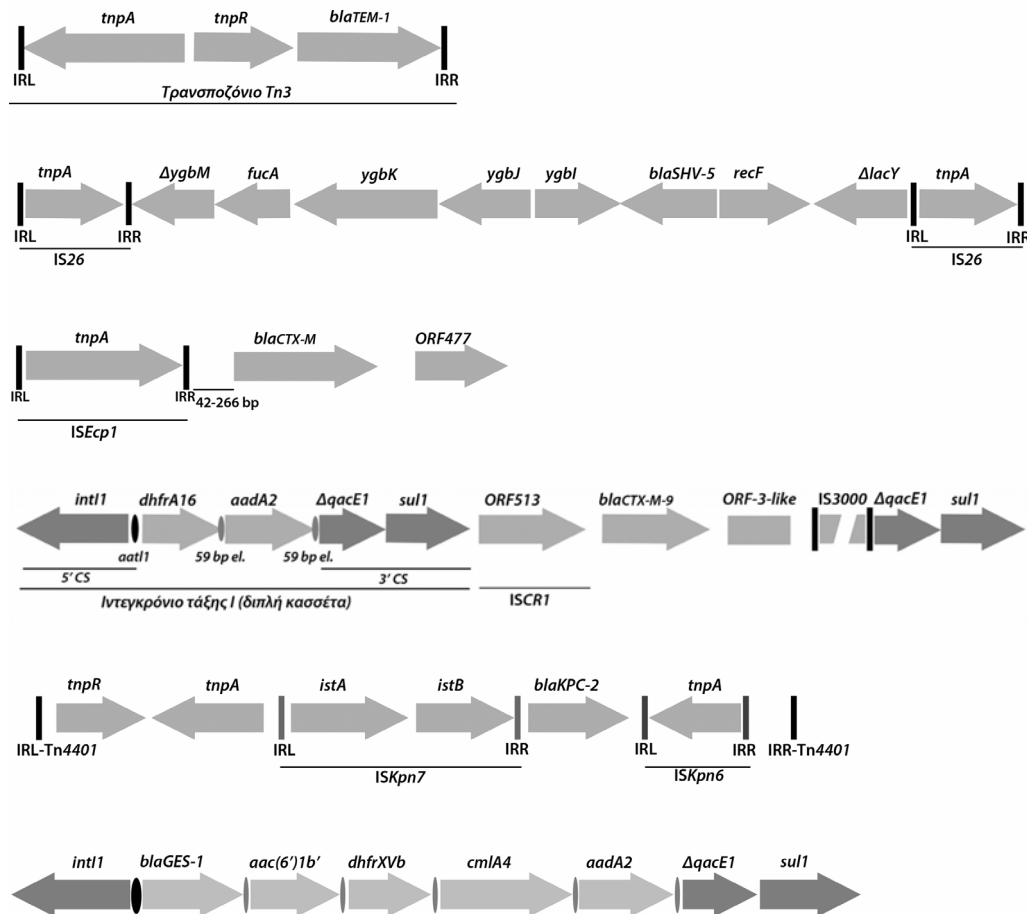
Τα ιντεγκρόνια που επίσης συμμετέχουν στις διαδικασίες μετακίνησης γονιδίων β-λακταμασών είναι γενετικά στοιχεία που περιλαμβάνουν το γονίδιο μίας ιντεγκράσης η οποία αναγνωρίζει μία αλληλουχία στο 5' άκρο του γονιδίου της (*aatI*) και εισάγει σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτή του γονιδίου της μετακινούμενες κασσέτες κυρίως γονιδίων αντοχής που φέρουν μία συντηρημένη αλληλουχία συνήθως 59 βάσεων (59 bp-element) μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Hall R. M. και Collis, C. M., 1995). Η ιντεγκράση μπορεί να προσελκύσει διαδοχικά διάφορα γονίδια στις συγκεκριμένες δομές δημιουργώντας σύνθετα ιντεγκρόνια με πολλαπλές κασσέτες ενώ μπορεί να καταλύσει και την αντίστροφη αντίδραση, της απομάκρυνσης δηλαδή των γονιδίων με μορφή κασσέτας, οπότε αν δύο διαφορετικά ιντεγκρόνια βρεθούν στο ίδιο βακτήριο και σε διαφορετικά μόρια νουκλεϊκών οξέων γονίδια αντοχής μπορούν να μεταπηδήσουν από το ένα στο άλλο. Στο 3' άκρο των ιντεγκρονίων υπάρχει μία συντηρημένη περιοχή που συνήθως περιλαμβάνει το γονίδιο *sulI* που προσδίδει αντοχή στις σουλφοναμίδες και θραύσμα του γονιδίου *qacE1* (3' CS) ενώ το 5' άκρο που φέρει το γονίδιο της ιντεγκράσης (5' CS) ελέγχει την έκφραση των γονιδίων που εισάγονται στο ιντεγκρόνιο παρέχοντας κατάλληλους υποκινητές μερικοί τύποι των οποίων είναι ισχυροί ενεργοποιητές της μεταγραφής (Papagiannitsis C. C. και συν., 2009). Με βάση την ομολογία των γονιδίων της ιντεγκράσης διακρίνονται σε τρεις τάξεις. Τα ιντεγκρόνια μπορούν να συμμετάσχουν στη δόμηση περιοχών με πολλαπλά γονίδια αντοχής ενώ αρκετές φορές συνδυάζονται και με τρανσποζόνια (Bonnet R., 2004; Miriagou V και

συν., 2005). Η ύπαρξη ομόλογων περιοχών με πολλαπλούς τόπους αντοχής σε διαφορετικά πλασμίδια μπορεί να οδηγήσει και σε μεταξύ τους ανασυνδυασμούς δημιουργώντας δομές όπου οι σταθερές περιοχές των μετακινούμενων γενετικών στοιχείων έχουν διαραγεί οπότε αυτά είναι μη λειτουργικά.

Αντιπρόσωποι από τους παραπάνω τύπους γενετικών οχημάτων εμπλέκονται στις μετακινήσεις των γονιδίων των κλινικά σημαντικών βΛτΑ (Εικόνα 20). Τα *bla*_{TEM} εντοπίζονται πάντα σε τραπεζοζόνια Tn3 (Partridge S. R. και Hall R. M., 2005) ή παράγωγα αυτών ενώ τα *bla*_{SHV} εντοπίζονται σε σύνθετα τραπεζοζόνια που έχουν IS26 στα άκρα τους (Miriagou V., 2005). Τα πλασμιδιακά οχήματα που συμβάλλουν στην διασπορά των *bla*_{TEM} ανήκουν κυρίως στην ομάδα ασυμβατότητας IncI1 ενώ συγκεκριμένες ΕΦΒΛ όπως η TEM-52 εκφράζονται και από πλασμίδια των ομάδων IncA/C, IncN και IncX. Το *bla*_{SHV-5} εντοπίζεται συνήθως σε πλασμίδια τύπου IncL/M ενώ το *bla*_{SHV-12} σε IncI1, IncK και στα IncFII/FI. (Poirel L. και συν., 2012)

Τα γονίδια των CTX-M μετακινήθηκαν από το χρωμόσωμα στελεχών *Kluyvera* sp. κυρίως μέσω της διαδικασίας μετάθεσης ενός άκρου από το *ISEcp1* μαζί με ένα γονίδιο άγνωστης λειτουργίας (ORF477). Γονίδια ενζύμων από τις ομάδες των CTX-M-1, CTX-M-2 και CTX-M-9 μεταφέρθηκαν σε πλασμίδια μέσω ανεξάρτητων γεγονότων μετάθεσης διαμεσολαβούμενης από *ISEcp1* καθώς το τμήμα που παρεμβάλλεται μεταξύ του κωδικονίου έναρξης των γονιδίων και του IRR του μεταθετού στοιχείου είναι ποικίλου μήκους (42-266 bp) γεγονός που αντανακλά διαφορετικά σημεία εισδοχής και απόσπασης του χρωμοσώματος της *Kluyvera*. Το *ISEcp1* παρέχει υποκινητές για τη μεταγραφή των γονιδίων η ισχύς των οποίων είναι υψηλή και βακτήρια που φέρουν τις συγκεκριμένες δομές συνήθως υπερπαράγουν τα ένζυμα. Ένας δεύτερος μηχανισμός μετακίνησης των *bla*_{CTX-M} αφορά τη μετάθεση κυλιόμενου κύκλου διαμεσολαβούμενη από την υποθετική τραπεζοζώνη που κωδικοποιείται από το ORF513 και είσοδο του αποσπώμενου τμήματος στην 3'CS περιοχή ενός ιντεγκρονίου τάξης I που φέρει πολλαπλές κασσέτες γονιδίων αντοχής (έναντι τριμεθροπίμης, αμινογλυκοσιδών κ.α.). Το τμήμα του χρωμοσώματος των *Kluyvera* που αποσπάστηκε κατά τις παραπάνω μετακινήσεις εκτός από το γονίδιο της κεφοταξιμάσης φέρει και ένα γονίδιο άγνωστης λειτουργίας (ORF3) που βρίσκεται κατωμερώς του γονιδίου βΛτΑ. Το γεγονός ότι οι CTX-M είναι πλέον οι περισσότερες διαδεδομένες ΕΦΒΛ ίσως να οφείλεται στη

δυνατότητα μετακίνησής τους χωρίς να απαιτείται εξειδικευμένη αλληλουχία IRR ενώ η μεταφορά τους σε πλασμίδια τύπου IncF βοήθησε επίσης στην εξάπλωσή τους μεταξύ των Εντεροβακτηριακών. (Bonnet R., 2004; Poirel L. και συν., 2012)



Εικόνα 20: Γενετικοί τόποι των μεταφερόμενων κλινικά σημαντικών βΛτΑ. Δίνονται χαρακτηριστικές δομές. Τα γονίδια των TEM μεταφέρονται με παράγωγα του τρανσποζονίου *Tn3*, των SHV με σύνθετα τρανσποζόνια με IS26 στα άκρα τους ενώ οι CTX-M από μετάθεση ενός άκρου είτε μέσω *ISEcp1* είτε μέσω *ISCR1*. Στην τελευταία περίπτωση οι αντίστοιχοι τόποι έχουν εισέλθει στην 3' CS περιοχή ιντεγκρονίων τάξης I. Οι KPC μεταφέρονται μέσω παραγώγων του σύνθετου τρανσποζονίου *Tn4401* ενώ οι GES εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια τάξης I ως η πρώτη κασσέτα.

Οι καρβαπενεμάσες τύπου KPC-2 μετακινούνται μέσω του σύνθετου τρανσποζονίου *Tn4401* (τρανσποζόνιο τάξης II) που περιέχει τα *ISKpn7* και *ISKpn6* και των παραγώγων αυτού (Cuzon G. και συν., 2011; Paragiannitsis C. C. και συν., 2013). Η εξάπλωση των *bla_{KPC}* στα εντεροβακτηριακά οφείλεται στη μεταφορά του συγκεκριμένου γενετικού τόπου σε πλασμίδια τύπου IncFII, IncN και IncL/M. Τα γονίδια των GES β-λακταμασών συνήθως απαντούν ως η πρώτη κασσέτα σε ιντεγκρόνια τάξης I

ενώ έχουν αναφερθεί και κάποιες σπάνιες δομές που μεταφέρονται από μικρά πλασμίδια με διευρυμένο φάσμα ξενιστών τύπου IncQ. Τα ιντεγκρόνια που μεταφέρουν τα *bla*_{GES} συνήθως εντοπίζονται σε IncL/M πλασμίδια. Οι VEB β-λακταμάσες εκφράζονται και αυτές από ιντεγκρόνια τάξης I ενώ οι PER ΕΦΒΑ από σύνθετα τρανσποζόνια τύπου 1 που δομούνται από δύο συγγενικά IS (*ISPa12* και *ISPa13*). (Poirel L. και συν., 2012)

ii. Φαινότυποι και βιοχημικές ιδιότητες

Οι βΛτΑ τύπου TEM-1 και SHV-1 όταν είναι οι μόνες β-λακταμάσες που παράγονται σε εντεροβακτηριακά στελέχη προσδίδουν αντοχή σε άμινο-, κάρβοξυ- και ουρεδεδίνο-πενικιλίνες και μειωμένη ευαισθησία στις παλαιότερες κεφαλοσπορίνες (Πίνακας 2). Συνήθως τα αντίστοιχα στελέχη είναι ευαίσθητα στους συνδυασμούς πενικιλινών με τους αναστολείς αυτοκτονίας. Όταν τα ένζυμα υπερπαράγονται όμως στον περιπλασμικό χώρο των βακτηρίων, είτε λόγω του υψηλού αριθμού αντιγράφων των πλασμιδίων που τα φέρουν είτε εξαιτίας της ενεργοποίησης της μεταγραφής τους από υποκινητές παρεχόμενους από τα τρανσποζόνια που εντοπίζονται, μπορεί να παρατηρηθεί μειωμένη ευαισθησία ή και αντοχή στους παραπάνω συνδυασμούς. Η υπερπαραγωγή των ενζύμων έχει επιπτώσεις και στις ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής (MIC) των κεφαλοσπορινών πρώτης και δεύτερης γενιάς οι οποίες σε κάποια στελέχη ενδέχεται να είναι αυξημένες. Υπάρχουν επίσης αναφορές για μειωμένη ευαισθησία σε κάποια οξυίμινο υποστρώματα (κυρίως κεφταζιδίμη) σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* που υπερπαράγουν την SHV-1 κάτι το οποίο δεν παρατηρείται για την TEM-1. Πέρα από τις κεφαλοσπορίνες των νεώτερων γενιών και της αζτρεονάμης τα στελέχη αυτά είναι επίσης ευαίσθητα στις κεφαμυκίνες και στις καρβαπενέμες. Υπαραπαραγωγή όμως της TEM-1 σε συνδυασμό με μειωμένη διαπερατότητα του τοιχώματος εξαιτίας της έλλειψης ή τροποποίησης κάποιας πορίνης της εξωτερικής μεμβράνης ενδέχεται να μειώσει την ευαισθησία στην κεφοξιτίνη. (Sirot D., 1995; Tzouveleki L. S. και Bonomo R. A., 1999)

Τα ένζυμα με ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος τύπου TEM και SHV διατηρούν την αντοχή έναντι των πενικιλινών αλλά τα βακτήρια που τα παράγουν συνήθως είναι πιο ευαίσθητα έναντι των συνδυασμών πενικιλινών-αναστολέων. Προσδίδουν αντοχή

στις παλαιότερες κεφαλοσπορίνες αλλά και σε αυτές της τρίτης γενιάς όπως και στην αζτρεονάμη. Η ευαισθησία στην κεφταζιδίμη είναι αυτή που επηρεάζεται περισσότερο και λιγότερο αυτή έναντι της κεφοταξίμης (Πίνακας 2). Τα βακτήρια που παράγουν TEM ή SHV ΕΦΒΑ στην πλειοψηφία τους εξακολουθούν να είναι ευαίσθητα στις κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενιάς όπως η κεφεπίμη με τις όποιες περιπτώσεις μειωμένης ευαισθησίας να οφείλονται στην υπερπαραγωγή των ενζύμων σε συνδυασμό με μειωμένη διαπερατότητα του τοιχώματος. Η ευαισθησία έναντι των κεφαμυκινών και καρβαπενεμών δεν επηρεάζεται. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε ένζυμα που είναι ανθεκτικά στους αναστολείς αυτοκτονίας συνήθως επάγουν μεγάλες αλλαγές στα MIC έναντι των αντίστοιχων συνδυασμών με πενικιλίνες που ενδέχεται να αντιστοιχούν σε πάνω από 100 φορές αύξηση. Τα αντίστοιχα στελέχη είναι υπερευαίσθητα στις νεώτερες κεφαλοσπορίνες και στην αζτρεονάμη διατηρώντας κάποια ανοχή στα παλαιότερα αντιβιοτικά της κατηγορίας. Τα ένζυμα τύπου TEM με σύνθετες ιδιότητες εμφανίζουν υψηλές τιμές MIC στους συνδυασμούς πενικιλινών-αναστολέων χωρίς να προσδίδουν ιδιαίτερα αυξημένη αντοχή σε οξυμίμο αντιβιοτικά. (Sirot D., 1995; Tzouveleki L. S. και Bonomo R. A., 1999; Bonomo R. A. και Rice L. B., 1999; Chaibi E. B. και συν., 1999; Turner P. J., 2005; Canton R. και συν., 2008)

Οι ΕΦΒΑ τύπου CTX-M προσδίδουν αντοχή στις πενικιλίνες, στις κεφαλοσπορίνες πρώτης και δεύτερης γενιάς και στην κεφοταξίμη (Πίνακας 2). Τα περισσότερα εντεροβακτηριακά στα οποία η παραγωγή των συγκεκριμένων ενζύμων αποτελεί το μοναδικό μηχανισμό αντοχής σε β-λακτάμες είναι ευαίσθητα στους συνδυασμούς-πενικιλινών με αναστολείς ενώ και σε αυτή την περίπτωση υπερπαραγωγή ενδέχεται να οδηγήσει σε φαινότυπο αντοχής. Η ευαισθησία στις κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενιάς επίσης ποικίλει και ενδέχεται να φτάσει σε επίπεδα υψηλότερα από το κλινικό όριο αντοχής. Η αντοχή στην αζτρεονάμη είναι συνήθως αυξημένη εν αντιθέσει με την κεφταζιδίμη η οποία διατηρεί την ικανότητά της στο να αναστέλλει τα συγκεκριμένα βακτήρια. Εξαιρεση αποτελούν τα στελέχη που παράγουν μεταλλάκτες των ενζύμων που έχουν αυξημένη ενεργότητα υδρόλυσης έναντι του συγκεκριμένου υποστρώματος (π.χ. CTX-M-15, CTX-M-16 και CTX-M-27). Όπως και οι βΛτΑ των τύπων TEM και SHV δεν τροποποιούν σημαντικά τα επίπεδα ευαισθησίας έναντι των κεφαμυκινών και των καρβαπενεμών. Στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν

τα συγκεκριμένα ένζυμα όμως ενδέχεται να εμφανίσουν ανοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε ορισμένες καρβαπενέμες (π.χ. ερταπενέμη) όταν η παραγωγή και ικανότητα λειτουργίας συγκεκριμένων πορινών τους (π.χ. OmpK36) έχει μειωθεί (Garcia-Fernandez A. και συν, 2010). Τα ένζυμα αυτά συνήθως υπερπαράγονται εξαιτίας του ελέγχου που ασκεί στη μεταγραφή τους ο ισχυρός υποκινητής που παρέχεται από το *ISEcp1* που όπως αναφέρθηκε αποτελεί το κύριο γενετικό όχημα των γονιδίων τους. (Bonnet R., 2004)

Παραγωγή καρβαπενεμάσων τύπου KPC-2 από εντεροβακτήρια συνεπάγεται υψηλή ανοχή έναντι των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενεάς όπως και έναντι της αζτρεονάμης. Τα συγκεκριμένα βακτήρια συνήθως δεν αναστέλλονται ικανοποιητικά από του συνδυασμούς πενικιλινών-αναστολέων ενώ εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στην κεφεπίμη. Οι KPC-2 σε αντίθεση με τις παραπάνω επίκτητες βλτΑ έχουν την δυνατότητα να προσδίδουν ανοχή έναντι των κεφαμυκινών και των καρβαπενεμών, αυξάνοντας την MIC αρκετές φορές πάνω από το κλινικό όριο ευαισθησίας (Πίνακας 2). Στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν το ένζυμο δεν αναστέλλονται από την μεροπενέμη ακόμα και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 64 µg/ml (Tzouveleakis και συν., 2012). Η επίδραση στα επίπεδα ευαισθησίας των υπόλοιπων εντεροβακτηριακών για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά δεν είναι τόσο έντονη. Στελέχη *E. coli* για παράδειγμα που παράγουν KPC-2 τύπου καρβαπενεμάσες συνήθως εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία έναντι των καρβαπενεμών από ότι τα αντίστοιχα στελέχη *K. pneumoniae* (Mavroidi A. και συν., 2012).

Οι υπόλοιπες κλινικά σημαντικές πλασμιδιακές ΕΦΒΛ εκφράζουν φαινοτύπους ανοχής παρόμοιους με τα αντίστοιχα ένζυμα που αναφέρονται παραπάνω επηρεάζοντας περισσότερο τα επίπεδα ευαισθησίας της κεφταζιδίμης παρά της κεφοταξίμης (συνηθίζεται να αποκαλούνται και κεφταζιδιμάσες) (Naas T. και συν., 2008). Οι μεταλλάκτες των ενζύμων τύπου GES που έχουν τη δυνατότητα υδρόλυσης καρβαπενεμών συνήθως αυξάνουν τα επίπεδα ανοχής έναντι των κεφαμυκινών και των καρβαπενεμών αλλά παράλληλα χάνουν τη δυνατότητα για αναστολή της δράσης των οξυμίμο αντιβιοτικών. Τα βακτήρια που παράγουν τα συγκεκριμένα ένζυμα εμφανίζουν διάφορα επίπεδα ευαισθησίας έναντι των συνδυασμών πενικιλινών-αναστολέων με την GES-5 και τα παράγωγα αυτής να είναι περισσότερο ανθεκτικά σε αναστολή (Frase H.

και συν., 2011). Οι καρβαπενεμάσες τύπου GES έχουν βρεθεί κυρίως σε *E. coli*, *P. aeruginosa* και *A. baumannii*.

Όπως φαίνεται από την παραπάνω παρουσίαση των φαινοτύπων των κύριων τύπων επίκτητων βΛτΑ η ποσότητα των ενζύμων που εκκρίνεται στον περιπλασμικό χώρο των βακτηρίων ενδέχεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη δράση των αντιβιοτικών ακόμα και αυτών που δεν υδρολύονται αποδοτικά από αυτές. Ποσοτικά αυτό αναδεικνύεται από την εξίσωση 5 της ενότητας 3.Α όπου ισχύει στην περίπτωση όπου η ποσότητα του υποστρώματος είναι πολύ μικρότερη από την σταθερά *Michaelis* μία συνθήκη που ισχύει πάντα για τις β-λακταμάσες στον περιπλασμικό χώρο των βακτηρίων. Από αυτή λοιπόν προκύπτει ότι ένζυμο που έχουν πολύ μικρή απόδοση υδρόλυσης (εκφραζόμενη μέσω της σταθεράς k_{cat}/K_m) για κάποια αντιβιοτικά μπορούν να τα υδρολύσουν με υψηλή ταχύτητα όταν η ποσότητά τους αυξηθεί σημαντικά, ενώ ισχύει και το αντίστροφο δηλαδή για τα αντιβιοτικά όπου η απόδοση της κατάλυσης είναι πολύ υψηλή μικρές μόνο ποσότητες ελεύθερου ενζύμου αρκούν για να επιτευχθεί γρήγορη απενεργοποίησή τους στον περιπλασμικό χώρο. Η μετακίνηση των γονιδίων των β-λακταμασών σε πλασμίδια μέσω τρανσποζονίων και ιντεγκρονίων πέρα από την διασπορά τους φαίνεται να εξυπηρετεί και την υπερπαραγωγή τους.

Ένας άλλος τρόπος αύξησης των επιπέδων των εκκρινόμενων β-λακταμασών είναι μέσω επαγωγής της έκφρασης χρωμοσωμικών γονιδίων βΛ η οποία είναι χαμηλού επιπέδου και κάποια στελέχη διαθέτουν συστήματα ενεργοποίησης παρουσία β-λακταμικών. Δύο συστήματα επαγωγής βΛτΑ είναι σήμερα γνωστά. Το ένα απαντά στα Gram θετικά *Staphylococcus* και *Bacillus* και το άλλο σε Gram αρνητικά. Το πρώτο σύστημα περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες *BlaI* και *MecI* που έχουν ανασταλτική δράση στην έκφραση των γονιδίων β-λακταμασών ενώ παρουσία β-λακταμικών οι μεμβρανικές *BlaR* και *MecR* δεσμεύουν τα αντιβιοτικά μεταφέρουν το σήμα στην κυτταροπλασματική τους επικράτεια η οποία πιθανότατα υδρολύει τον αμιδικό δεσμό μεταξύ μουραμικού οξέος και L-Ala στα μουροτριπεπίδια που συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας της διαταραχής της ισορροπίας αποικοδόμησης-βιοσύνθεσης της μουρεΐνης λόγω της αναστολής των τρανσπεπτιδασών από τα αντιβιοτικά. Τα παραγόμενα τριπεπίδια (D-Glu-m-DAP-D-Ala) δεσμεύονται στους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες και μέσω αλλοστερείας δεν τους

Πίνακας 2: Φαινότυποι ευαισθησίας πλασμιδιακών βΛτΑ όταν εκφράζονται σε εργαστηριακά στελέχη *E. coli*^α.

β-λακταμάση	MIC (µg/ml)													Αναφορά
	AMX	AM/CL	PIP	PP/TZ	CEF	CXM	CAZ	CZ/CL	CTX	FEP	ATM	FOX	IMP	
<i>E. coli</i> ECOFF/CB ^β	8/8	ΔΕ/ΔΕ ^γ	8/16	8/16	32/ΔΕ	8/8	0,5/4	0,5/ΔΕ	0,125/2	0,125/4	0,25/4	8/ΔΕ	0,5/8	http://mic.eucast.org/Eucast2/
TEM-1	>2048	16	512	2	4	4	0,12	0,12	0,06	0,06	0,12	4	0,25	Robin, F. και συν., 2005
SHV-1	2048	8	64	≤16	16	4	≤0,5	≤0,5	0,06	ΔΕ	≤0,5	ΔΕ	≤0,5	Ramdani-Bouguessa N. και συν., 2011
TEM-6 (ESBL)	>2048	32	256	2	16	8	256	2	0,5	1	64	4	0,25	Robin, F. και συν., 2005
TEM-33 (IRT)	>2048	512	512	4	4	4	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06	4	0,25	Robin, F. και συν., 2005
TEM-109 (CMT)	>2048	512	512	4	8	16	256	8	0,5	1	64	4	0,25	Robin, F. και συν., 2005
SHV-5 (ESBL)	>128	2	64	2	>128	ΔΕ	64	ΔΕ	4	ΔΕ	64	ΔΕ	ΔΕ	Prinarakis E. E. και συν., 1997
SHV-10 (IR)	>128	64	128	64	0,5	ΔΕ	0,5	ΔΕ	0,12	ΔΕ	0,12	ΔΕ	ΔΕ	Prinarakis E. E. και συν., 1997
SCO-1	>256	8	32	2	8	1	<0,12	ΔΕ	<0,12	<0,12	<0,12	2	<0,12	Papagiannitsis C. C. και συν., 2007
RTG-4	>256	32	>256	ΔΕ	64	2	1	ΔΕ	0,25	4	ΔΕ	ΔΕ	0,12	Potron A. και συν., 2009
CTX-M-3	>512	128	512	2	>512	>512	128	2	32	128	128	2	0,25	Poirel L. και συν., 2002
CTX-M-14	>512	8	256	2	512	512	1	ΔΕ	512	0,5	4	ΔΕ	ΔΕ	Bonnet R. και συν., 2003
CTX-M-8	>512	16	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	>512	1	0,06	16	4	8	4	0,125	Bonnet R. και συν., 2000
CTX-M-4	>512	8	256	2	ΔΕ	512	2	ΔΕ	512	ΔΕ	32	ΔΕ	ΔΕ	Gazouli M. και συν., 1998
VEB-1	>512	8	16	2	128	128	256	0,25	2	1	32	4	0,25	Poirel L. και συν., 1999
PER-1	>512	2	8	1	128	32	256	0,12	4	ΔΕ	128	8	<0,03	Nordmann P. και συν., 1993
BEL-1	>512	512	16	8	512	256	16	2	1	0,25	16	8	0,12	Poirel L. και συν., 2005
SFO-1	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	>100	1,56	ΔΕ	6,25	ΔΕ	6,25	ΔΕ	0,39	Matsumoto Y. και Inoue M., 1999
GES-1	>512	64	16	2	32	32	8	1	0,5	0,25	0,25	8	0,25	Poirel L. και συν., 2000
GES-5	ΔΕ	ΔΕ	64	16	ΔΕ	ΔΕ	16	2	0,5	ΔΕ	0,5	ΔΕ	1	Vourli S. και συν., 2004
KPC-2	>32	16	128	4	ΔΕ	ΔΕ	>32	ΔΕ	64	64	>64	32	16	Yigit H. και συν., 2003

^α Μετασχηματισμένα με φυσικά πλασμίδια ή με ανασυνδυασμένα πλασμιδιακά οχήματα

^β ECOFF: βιολογικό όριο ευαισθησίας, CB: Κλινικό όριο αντοχής

^γ ΔΕ: Δεν εκτιμήθηκε

AMX: αμοξικιλίνη, AM/CL: αμοξικιλίνη+κλαβουλανικό οξύ, PIP: πιπερακιλλίνη, PP/TZ: πιπερακιλλίνη+ταζοβακτάμη, CEF: κεφαλοθίνη, CXM: κεφουροξίμη, CAZ: κεφταζιδίμη, CZ/CL: κεφταζιδίμη+κλαβουλανικό οξύ, CTX: κεφοταξίμη, FEP: κεφεπίμη, ATM: αζτρεονάμη, FOX: κεφοξιτίνη, IMP: ιμιπενέμη

επιτρέπουν να δεσμευθούν στους υποκινητές των γονιδίων βΛτΑ και να ασκήσουν την ανασταλτική τους δράση (Johnson J. W. και συν., 2013). Ανάλογα συστήματα επαγωγής των χρωμοσωμικών γονιδίων βΛτΑ διαθέτουν και κάποια Gram αρνητικά με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα *E. cloacae* NOR-1 (NMC-A καρβαπενεμάση; Naas T. και Nordmann P., 1994), *S. fonticola* και το πλασμιδιακό ένζυμο που προέκυψε από αυτή (SFO-1 ΕΦΒΛ; Matsumoto Y. και συν., 1999) και *Stenotrophomonas maltophilia* (L2 ΕΦΒΛ; Lin C. W. και συν., 2009). Εδώ την ανασταλτική δράση επί της έκφρασης των γονιδίων την παρέχει ο μεταγραφικός παράγοντας AmpR (οικογένεια LysR) το γονίδιο του οποίου βρίσκεται δίπλα και σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτό της βΛτΑ. Ο AmpR συνήθως έχει την δυνατότητα να αναστέλλει το γονίδιο της βΛτΑ και να ενεργοποιεί την έκφραση του δικού του μέσω δέσμευσης των UDP-MurNac-πενταπεπτιδίων, πρόδρομων μορίων στη βιοσύνθεση του τοιχώματος. Παρουσία β-λακταμικών το σήμα για την διακοπή της αρνητικής δράσης του μεταγραφικού παράγοντα είναι τα MurNac-πενταπεπτιδία ή τριπεπτιδία, που συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα από τη δράση των υδρολασών μουρεΐνης και την αναστολή των PBPs, και τα οποία ανταγωνίζονται τον ενεργοποιητή του AmpR ως προς τη δέσμευση στην αλλοστερική θέση. Η αμιδάση του δεσμού MurNac-L-Ala, AmpD, απουσία β-λακταμικών κρατά σε χαμηλά επίπεδα τα αντίστοιχα προϊόντα ανακύκλωσης της πεπτιδογλυκάνης με αποτέλεσμα η έκφραση των γονιδίων βΛτΑ να αναστέλλεται (Johnson J. W. και συν., 2013). Αντίστοιχα συστήματα επαγωγής ρυθμίζουν την έκφραση χρωμοσωμικών βΛτC κάποιων Gram αρνητικών και μάλιστα μεταλλάξεις στο γονίδιο ampD που διακόπτουν την λειτουργία αμιδάσης οδηγούν σε υπερέκφραση των γονιδίων κεφαλοσπορινασών που αναστέλλονται από τον AmpR και σε φαινοτύπους μειωμένης ευαισθησίας.

Τα περισσότερα ένζυμα τάξης A παρουσιάζουν υψηλή καταλυτική απόδοση έναντι των πενικιλινών και άρα μπορούν ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις να οδηγήσουν σε φαινοτύπους αντοχής. Οι σταθερές k_{cat}/K_m έναντι των υποστρωμάτων αυτών είναι συνήθως της τάξης $10^7 - 10^8 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ πολύ κοντά δηλαδή στο όριο της διάχυσης (Πίνακας 3) (Hardy L. W. και Kirsch J. F., 1984; Christensen H. και συν., 1990). Η καταλυτική τελειότητα ως προς την υδρόλυση των πενικιλινών φαίνεται να χάνεται όταν τα ένζυμα έχουν την δυνατότητα να υδρολύουν οξυμίμο υποστρώματα με

τις GES, PER, BEL και VEB ΕΦΒΑ να εμφανίζουν μειωμένες αποδόσεις κυρίως μέσω μείωσης της ταχύτητας κατάλυσης k_{cat} . Όλες οι πλασμιδιακές βΛτΑ έχουν υψηλή υδρολυτική απόδοση κατά την αλληλεπίδρασή τους με τις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς η οποία εν σύγκριση με την πενικιλινάση PC1 του *S. aureus* οφείλεται σε αύξηση των ταχυτήτων ακυλίωσης και απακυλίωσης όπως αποτυπώνονται στην αλματώδη αύξηση της k_{cat} . Οι κεφοταξιμάσες τύπου CTX-M εμφανίζουν τις υψηλότερες ταχύτητες υδρόλυσης των συγκεκριμένων υποστρωμάτων (Πίνακας 3). Τα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος τύπου TEM και SHV σε σχέση με τα ένζυμα από τα οποία προκύπτουν με μεταλλάξεις τις περισσότερες φορές εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές K_m (άρα μεγαλύτερη φαινόμενη συγγένεια) κατά την υδρόλυση οξυίμινο υποστρωμάτων η οποία ενδέχεται να συνοδεύεται και από περιορισμένη αύξηση της k_{cat} (Πίνακας 3). Οι παραπάνω αλλαγές δηλώνουν ότι η καταλυτική απόδοση αυξάνεται κυρίως λόγω αύξησης της ταχύτητας ακυλίωσης (k_2) και της ταχύτητας σχηματισμού του συμπλόκου *Michaelis* (k_1) (Page M. G., 2008). Πράγματι πειράματα γρήγορης κινητικής έχουν δείξει ότι το περιοριστικό στάδιο κατά την υδρόλυση οξυίμινο υποστρωμάτων από βΛτΑ είναι η ακυλίωση της καταλυτικής σερίνης (Levitt P. S. και συν., 2012). Μεταλλάξεις που αυξάνουν την καταλυτική απόδοση μπορούν να προκαλέσουν τέτοιου βαθμού αύξηση στην ταχύτητα παραπάνω σταδίου ώστε πλέον η απακυλίωση να είναι το περιοριστικό στάδιο (Vakulenko S. B. και συν., 1999; Levitt P. S. και συν., 2012).

Οι οξυίμινο κεφαλοσπορίνες και ιδιαίτερα η κεφοταξιμή ακυλιώνουν αποδοτικά τα ενεργά κέντρα και των υπόλοιπων πλασμιδιακών ΕΦΒΑ όπως και των καρβαπενεμασών τάξης A εκτός από τις β-λακταμάσες τύπου GES-5 (Ser170). Η κεφταζιδίμη φαίνεται να εμφανίζει σχετικά υψηλές τιμές K_m που αντανάκλα την αδυναμία εισόδου του σχετικά ογκώδους μορίου της στο ενεργό κέντρο και την ακατάλληλη τοποθέτησή της ώστε να ξεκινήσει η ακυλίωση. Σε αρκετές περιπτώσεις έχουν υπολογιστεί πολύ υψηλά K_m για το υπόστρωμα αυτό με τα μετρούμενα k_{cat}/K_m να μην αντανάκλουν τους παρατηρούμενους φαινότυπους που ίσως υποδεικνύει αδυναμία επίτευξης της καταστάσεως ισορροπίας στα συγκεκριμένα πειράματα. Παρ' όλα αυτά η ταχύτητα υδρόλυσης για κάποια ένζυμα είναι υψηλή και συμβαδίζει με τους φαινότυπους κεφταζιδιμάσης. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και η κεφεπίμη κατά την υδρόλυσή της κυρίως από ένζυμα τύπου CTX-M. Η υδρόλυση της αζτρεονάμης συνήθως

παρουσιάζει επίσης υψηλές τιμές K_m αλλά όχι στα επίπεδα της κεφατιζιδίμης. Οι κεφαμυκίνες και οι καρβαπενέμες αντίθετα φαίνεται ότι ακυλιώνουν πολύ γρήγορα τα ενεργά κέντρα των περισσότερων βΛτΑ με τα παραγόμενα ακυλένζυμα να είναι πολύ σταθερά στην υδρόλυση. Συμπεριφέρονται δηλαδή ως μόρια αυτοκτονίας με τις μετρούμενες σταθερές αναστολής να είναι στο επίπεδο μερικών δεκάδων nM (Πίνακας 3). Οι καρβαπενεμάσες τάξης A μπορούν να υδρολύσουν τα παραπάνω υποστρώματα και μάλιστα με ιδιαίτερα υψηλές καταλυτικές αποδόσεις. Η δυνατότητα αυτή να οφείλεται κυρίως στην ικανότητα διάσπασης του εστερικού δεσμού στο στάδιο του ακυλενζύμου. Το γεγονός ότι και οι δύο παραπάνω κατηγορίες β-λακταμικών φέρουν αντίστοιχες ογκώδεις υποκαταστάσεις (7α-μέθοξυ και 6α-ύδροξυ-αιθύλ αντίστοιχα) υποδεικνύει ότι η ενεργότητα καρβαπενεμάσης στις βΛτΑ σχετίζεται με την τοποθέτηση αυτών των ομάδων.

Οι πλέον ισχυροί αναστολείς των βΛτΑ είναι το κλαβουλανικό οξύ και η ταζοβακτάμη. Η σουλβακτάμη εμφανίζει τις μικρότερες ταχύτητες αναστολής, τη μικρότερη συγγένεια και τους μεγαλύτερους αριθμούς ανακύκλωσης σε σχέση με τα υπόλοιπα μόρια (Πίνακας 4). Αυτό έχει υποτεθεί ότι συμβαίνει επειδή η σουλφονο-ομάδα της είναι η λιγότερο ικανή αποχωρούσα ομάδα στην αντίδραση δημιουργίας μίνης σε σχέση με τις αντίστοιχες των άλλων δύο αναστολέων (Drawz S M. και Bonomo R. A., 2010). Οι ανθεκτικές σε αναστολή TEM παρουσιάζουν συνήθως αργή αλληλεπίδραση με τα παραπάνω β-λακταμικά (μικρές τιμές k_{inact}) και μειωμένη φαινόμενη συγγένεια. Αντίθετα τα αντίστοιχα μόρια τύπου SHV αναστέλλονται με την ίδια ταχύτητα σε σχέση με τα πατρικά τους ένζυμα αλλά παρουσιάζουν αυξημένες τιμές στις σταθερές αναστολής τους και στις IC_{50} . Γενικά οι IR TEM και SHV εμφανίζουν μειωμένη ταχύτητα υδρόλυσης των β-λακταμικών υποστρωμάτων και η δυνατότητα αντοχής στους αναστολείς πιθανότατα σχετίζεται με τη μειωμένη ταχύτητα ακυλίωσής τους από όλα τα β-λακταμικά (Πίνακας 4) (Drawz S M. και Bonomo R. A., 2010). Οι ΕΦΒΛ γενικά εμφανίζουν υπέρ-ευαισθησία στην απενεργοποίηση από τους κλινικά διαθέσιμους αναστολείς η οποία αποτυπώνεται ευκρινώς στις τιμές IC_{50} (Πίνακας 4) (Bonnet R., 2004). Οι καρβαπενεμάσες τάξης A αν και παρουσιάζουν υψηλές ταχύτητες ακυλίωσης από τα συγκεκριμένα μόρια και σχετικά υψηλή συγγένεια ως προς αυτά, δεν αναστέλλονται ισχυρά επειδή το ένζυμο δεν παγιδεύεται στο στάδιο του ακυλ-ενζύμου

Πίνακας 3: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης β-λακταμικών υποστρωμάτων από β-λακταμάσες τάξης A^α.

βΛτΑ	Πενικιλίνη G			Κεφαλοθίνη			Κεφοταξίμη			Κεφαζιδίμη			Κεφεπίμη			Αζτρεονάμη			Κεφοξίτινη			Ιμιπενέμη		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
PC1	65	3,4	19·10 ⁶	0,14	110	1,3·10 ³	ΔE ^β	-	-	3,5·10 ⁻⁴	29	12	2·10 ⁻³	61	33	ΔE ^β	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-
TEM-1	1600	19	84·10 ⁶	160	246	0,65·10 ⁶	9	6000	15·10 ²	0,3	4300	70	ΔE	-	-	1	1430	7·10 ²	ΔE	-	-	ΔE	-	-
TEM-6^{ESBL}	134	10	13·10 ⁶	74	247	0,3·10 ⁶	9	71	0,1·10 ⁶	105	247	0,3·10 ⁶	ΔE	-	-	22	51	0,4·10 ⁶	ΔE	-	-	ΔE	-	-
TEM-33^{IRT}	150	15	15·10 ⁶	5	317	0,1·10 ⁵	<0,1	-	-	<0,1	-	-	ΔE	-	-	<0,1	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-
TEM-109^{CM}	171	20	8·10 ⁶	15	181	0,1·10 ⁶	21	330	0,1·10 ⁶	56	226	0,2·10 ⁶	ΔE	-	-	38	130	0,3·10 ⁶	ΔE	-	-	ΔE	-	-
SHV-1	2400	120	20·10 ⁶	48	25	0,5·10 ⁶	MM	>300	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-
SHV-2a^{ESBL}	30	10	3·10 ⁶	15	3,3	4,5·10 ⁶	11	18	0,6·10 ⁶	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-
CTX-M-3	270	2,5	108·10 ⁶	2800	96	29·10 ⁶	380	113	3,4·10 ⁶	<0,01	>3000	<3,3	0,2	170	10 ³	190	188	10 ⁶	ΔE	-	-	ΔE	-	-
CTX-M-14	290	20	14,5·10 ⁶	2700	175	15,4·10 ⁶	415	130	3,2·10 ⁶	3	610	4·10 ³	ΔE	-	-	10	200	5·10 ⁴	ΔE	-	-	ΔE	-	-
CTX-M-8	150	11	13,6·10 ⁶	1600	87	18,4·10 ⁶	72	74	10 ⁶	2	>500	<4·10 ³	144	990	0,14·10 ⁶	13	800	1,6·10 ⁴	ΔE	-	-	ΔE	-	-
CTX-M-5	230	50	4,6·10 ⁶	1500	350	4,3·10 ⁶	210	95	2,2·10 ⁶	7,4	440	1,6·10 ⁴	ΔE	-	-	21	730	2,8·10 ⁵	MM	-	-	ΔE	-	-
GES-1	2,8	40	7·10 ⁴	179	3400	5·10 ⁴	68	4600	1,4·10 ⁴	380	2000	1,9·10 ⁵	2,8	1800	1,6·10 ³	ΔE	-	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-
GES-2	0,4	4	10 ⁵	0,5	7,7	6·10 ⁴	2,2	890	2,5·10 ³	ΔE	>3000	-	1,1	1900	0,58·10 ³	ΔE	-	-	MM	-	-	0,004	0,45	0,9·10 ⁴
GES-4	317	370	0,86·10 ⁶	49,7	577	0,86·10 ⁵	2,9	341	8,6·10 ³	0,3	394	0,7·10 ³	ΔE	-	-	ΔE	-	-	9,6	650	1,5·10 ⁴	1,2	4,2	0,28·10 ⁶
VEB-1^δ	100	2,8	-	700	6,0	-	4300	38	-	8000	460	-	ΔE	-	-	400	500	-	ΔE	-	-	ΔE	-	-
PER-1^δ	100	2,5	-	473	7	-	1510	26	-	2470	148	-	ΔE	-	-	1	23	-	<0,5	0,012 ^γ	-	ΔE	-	-
BEL-1	3	20	0,15·10 ⁶	150	280	0,54·10 ⁶	30	250	0,12·10 ⁶	>1,5	>70	ΔE	1	150	7·10 ³	10	100	0,1·10 ⁶	<0,01	ΔE	-	<0,01	ΔE	-
KPC-2	51	27	1,9·10 ⁶	69	82	0,84·10 ⁶	22	220	0,1·10 ⁶	≤0,12	ΔE	-	ΔE	-	-	30	360	8,3·10 ⁴	0,31	180	1,7·10 ³	15	51	0,3·10 ⁶
NMC-A	260	28	9,3·10 ⁶	2820	185	15,2·10 ⁶	286	956	0,3·10 ⁶	4,7	90	5,2·10 ⁵	ΔE	-	-	707	125	5,6·10 ⁶	5	93	6,2·10 ⁵	1040	92	11,3·10 ⁶

^α Από τα Queenan A. M. και συν., 2007 (PC1); Raquet X. και συν., 1994 (TEM-1); Robin, F. και συν., 2005 (TEM-6, TEM-33, TEM-109); Lee K. Y. και συν., 1991 (SHV-1, SHV-2a); Poirel L. και συν., 2002 (CTX-M-3); Bonnet R. και συν., 2003 (CTX-M-14); Bonnet R. και συν., 2000 (CTX-M-8); Bradford P. A. και συν., 1998 (CTX-M-5); Poirel L. και συν., 2000 (GES-1); Poirel L. και συν., 2001 (GES-2); Wachino J. και συν., 2005 (GES-4); Poirel L. και συν., 1999 (VEB-1); Nordmann P. και συν., 1993 (PER-1); Poirel L. και συν., 2005 (BEL-1); Yigit H. και συν., 2003 (KPC-2); Mariotte-Boyer S. και συν., 1996 (NMC-A)

^β Δεν εκτιμήθηκε κυρίως λόγω χαμηλής ταχύτητας υδρόλυσης

^γ Μετρημένη ως σταθερά αναστολής

^δ Σχετική ταχύτητα ως προς την υδρόλυση πενικιλίνης μερικώς κεκκαθαυμένων πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων

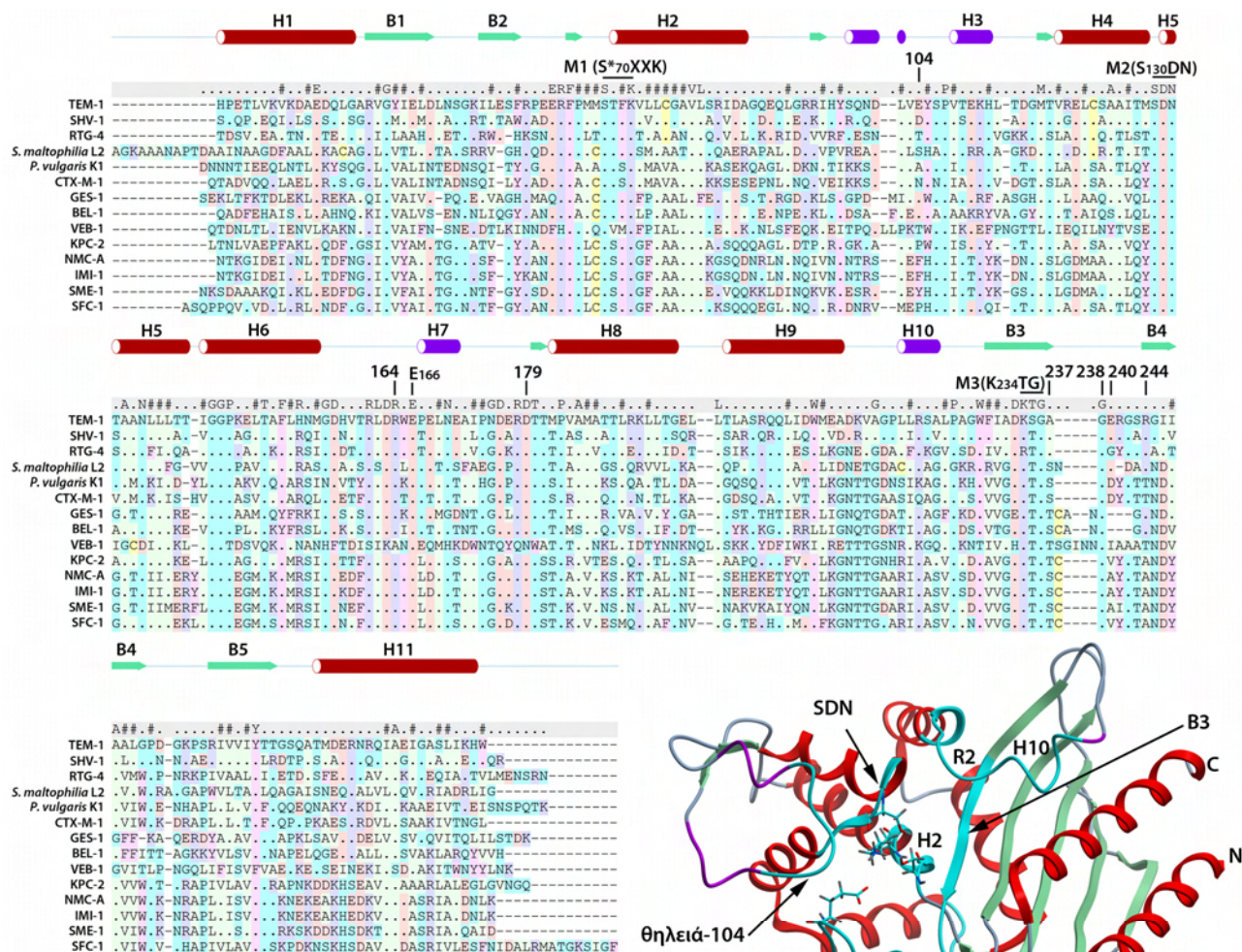
Πίνακας 4: Αλληλεπίδραση β-λακταμασών τάξης A με αναστολείς αυτοκτονίας^a

βΛατΑ	Κλαβουλανικό οξύ				Σουλβακτάμη				Ταζοβακτάμη			
	K_i (μM)	k_{inact} (s^{-1})	t_n	IC_{50} (μM)	K_i (μM)	k_{inact} (s^{-1})	t_n	IC_{50} (μM)	K_i (μM)	k_{inact} (s^{-1})	t_n	IC_{50} (μM)
TEM-1	0,1	0,02	160	0,08	1,6	0,002	10000	6,1	0,01	>0,02	140	0,1
TEM-33 (IRT-5)	1,65	0,002	ΔE	4	22	0,0009	ΔE	36	0,2	0,004	ΔE	0,4
SHV-1	1	0,04	60	0,06	8,6	0,056	13000	3,1	0,07	0,1	5	0,14
SHV-5 (ESBL)	ΔE	ΔE	ΔE	0,02	ΔE	ΔE	ΔE	1,8	ΔE	ΔE	ΔE	0,08
SHV-10 (IR)	47	0,03	40	6,9	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	4,2	0,06	5	1,3
CTX-M-3	ΔE	ΔE	ΔE	0,012	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	0,006
CTX-M-14	ΔE	ΔE	ΔE	0,033	ΔE	ΔE	ΔE	3,4	0,1	0,03	ΔE	0,008
GES-1	49	0,023	300	5	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	2,5
GES-2	5	0,082	20	1	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	0,7	0,035	7500	0,5
GES-5	39	0,015	450	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE	ΔE
KPC-2	8,4	0,027/18 ^b	2500	1,5	135	0,16	1000	ΔE	78,5	0,2	500	0,18

^a Οι τιμές προέρχονται από τις εργασίες Chaibi E. B. και συν., 1998; Imtiaz U. και συν., 1994; Helfand M. S. και συν., 2003; Drawz S M. και Bonomo R. A., 2010; Frase H. και συν., 2011α; ; Frase H. και συν., 2011β; Chaibi E. B. και συν., 1999; Papp-Wallace K. M. και συν., 2010; Prinarakis E. E. και συν., 1997; Poirel L. και συν., 2002; Bonnet R. και συν., 2003; Poirel L. και συν., 2000; Poirel L. και συν., 2001

^b Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην ταχύτητα υδρόλυσης κλαβουλανικού οξέος που παρουσιάζει η KPC-2

και εμφανίζει μετρήσιμη υδρόλυση του εστερικού δεσμού (για παράδειγμα η KPC-2 υδρολύει το ακυλ-ένζυμο του κλαβουλανικού με ταχύτητα της τάξης 18 s^{-1} ; Papp-Wallace K. M. και συν., 2010).

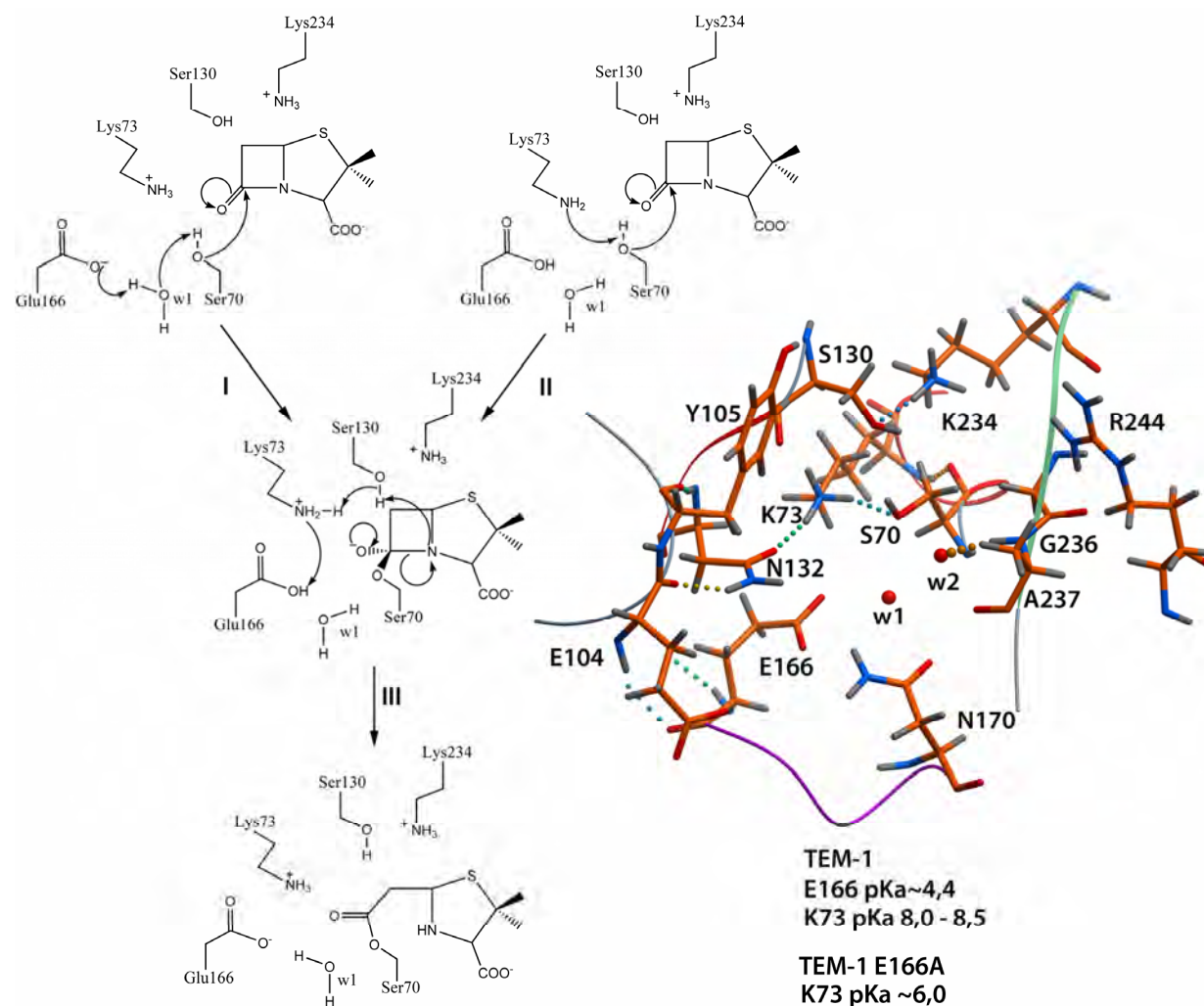


Εικόνα 21: Αντιστοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών ώριμων β-λακταμασών τάξης A. Δίνεται η δευτεροταγής δομή της TEM-1. Σημειώνονται τα καταλυτικά μοτίβα SXXK (M1), SDN (M2) και KT(S)G (M3). Επίσης δίνεται η θέση του καταλυτικού αμινοξέος Glu166 και αυτές που μεταλλάσσόμενες στα ένζυμα TEM και SHV οδηγούν σε διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων. Το ενεργό κέντρο εντοπίζεται μεταξύ των α/β και α επικρατειών και οριοθετείται από το B3 β-φύλλο, την θηλειά Ω την R2 θηλειά, τη θηλειά SDN και το αμινοτελικό άκρο της H2 α έλικας.

iii. Ενεργό κέντρο και μηχανισμός κατάλυσης

Το ενεργό κέντρο των βΛτΑ εντοπίζεται στην πτυχή που σχηματίζουν η α/β επικράτεια (B1-B5 β-αλυσίδες, H1 και H11 α-έλικες) και η α επικράτεια (εικόνες 21 και 22). Τα εξώτερα τοιχώματα σχηματίζονται από τη B3 αλυσίδα, τη θηλειά-Ω (αμινοξέα 159-182), τη θηλειά των θέσεων 104-105 (104-θηλειά), το τμήμα της H5 α έλικας που περιέχει το συντηρημένο μοτίβο S₁₃₀DN και από τη H10 α-έλικα σε συνδυασμό με τον βρόγχο που τη συνδέει με την H9. Στον πυθμένα του ενεργού κέντρου ξεπροβάλλει το αμινοτελικό άκρο της H2 α-έλικας που περιέχει τα αμινοξέα του μοτίβου S₇₀XXK με τις πλευρικές αλυσίδες της καταλυτικής σερίνης Ser70 και της Lys73 να είναι προσβάσιμα σε μόρια που εισέρχονται σε αυτό. Στο ίδιο επίπεδο με τα παραπάνω αμινοξέα βρίσκεται η πλευρική αλυσίδα του συντηρημένου αμινοξέος Glu166 το οποίο βρίσκεται στη θηλειά Ω. Το αμινοξύ αυτό μέσω του καρβοξυλίου του σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με ένα μόριο νερού, που δεσμεύεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο των βΛτΑ και απαντά πάντα στις κρυσταλλογραφικές δομές των ενζύμων (w1), και με την πλευρική αλυσίδα της Asn170 η οποία επίσης βρίσκεται στη θηλειά Ω και είναι πολύ συντηρημένη αλλά σε ορισμένα ένζυμα (π.χ. GES, VEB, PER) ενδέχεται να έχει αντικατασταθεί από άλλο αμινοξύ. Όταν υπάρχει η Asn170 σχηματίζει και αυτή δεσμούς υδρογόνου με το w1 (Εικόνα 22) (Matagne A. και Frere J M, 1995; Matagne A. και συν., 1998; Minasov G. και συν., 2001; ; Nukaga M. και συν., 2002; Wang, X. και συν., 2003).

Ακριβώς πάνω από τα Ser70 και Lys73 βρίσκεται η πλευρική αλυσίδα της Ser130 η οποία αλληλεπιδρά πάντα με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης του μοτίβου K₂₃₄T(S)G. Στις καρβενικιλινάσες η λυσίνη αυτή είναι αντικατεστημένη από αργινίνη. Από υπολογισμούς της pK_a της πλευρικής αλυσίδας της Lys234 στα βΛτΑ φαίνεται ότι αυτή σε ουδέτερο pH είναι πάντα πρωτονιωμένη (pK_a>8,8) ενώ αυτό υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι αργινίνη σε αυτή τη θέση δεν επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργία των ενζύμων (Matagne A. και Frere J M, 1995; Golemi-Kotra D. και συν., 2004). Στις εώς τώρα λυμμένες κρυσταλλογραφικές δομές. Το υδροξύλιο της Ser130 ενδέχεται να σχηματίζει επίσης δεσμούς υδρογόνου με τη Lys73, τη Ser70 ή με ένα μόριο νερού που βρίσκεται σε κάποιες δομές μεταξύ αυτής και της Ser70. (Matagne A. και συν., 1998)



Εικόνα 22: Ενεργό κέντρο και μηχανισμοί ακυλίωσης της καταλυτικής σερίνης στις βΛαΤ. Δίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα στο αποένζυμο της TEM-1 που αποτελούν την καταλυτική μηχανή και αυτά που αλληλεπιδρούν με τις ομάδες του εισερχόμενου β-λακταμικού καθώς και η θέση συντηρημένων μορίου νερού στο ενεργό κέντρο. Φαίνεται το οξυγόνο του νερού w1 που αλληλεπιδρά με το Glu166 και αντιστοιχεί στο υδρολυτικό νερό και του w2 που δεσμεύεται στην σπή οξυανιόντος.

Η αμίδη του πρωτεϊνικού σκελετού της Ser70 με την αντίστοιχη ομάδα του αμινοξέος 237 δεσμεύουν στα ελεύθερα ένζυμα ένα μόριο νερού (w2) και στο στάδιο του ακυλενζύμου το οξυγόνο της ακυλο-ομάδας του δεσμευμένου β-λακταμικού. Σχηματίζουν δηλαδή την οπή οξυανιόντος. Το ενδιαφέρον είναι ότι ενώ το αμινοξύ 237 που προσφέρει την αμίδη του για τη δημιουργία μίας λειτουργικής θέσης που είναι σημαντική για την κατάλυση δεν είναι συντηρημένο (συνήθως αυτή η θέση καταλαμβάνεται από αλανίνη, σερίνη ή θρεονίνη) αυτό της θέσης 236 που προσφέρει την ακυλομάδα του στον δεσμό 236-237 είναι πάντα γλυκίνη (Εικόνα 21). (Matagne A. και συν., 1998)

Τα παραπάνω αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση συνεπικουρούνται από άλλα που εντοπίζονται σε σχετικά περιφερειακές θέσεις. Η Asn132 του μοτίβου SDN εντοπίζεται πάνω από το Glu166 και συμμετέχει στην δέσμευση του υποστρώματος μέσω αλληλεπίδρασης με την ακυλομάδα των ακυλο-άμινο υποκαταστάσεων των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών ή με το υδροξύλιο της βα-ύδροξυ-αιθύλ υποκατάστασης των καρβαπενεμών. Στα ελεύθερα ένζυμα η Asn132 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα της Lys73 και με την ακυλομάδα του σκελετού του αμινοξέος στη θέση 104 (Εικόνα 22). Το αμινοξύ που καταλαμβάνει αυτή τη θέση δεν είναι συντηρημένο (Εικόνα 21) και σε κάποια ένζυμα (π.χ. τύπου SHV-1, TEM-1, GES-1 και VEB-1) φέρει πλευρική αλυσίδα αρνητικά φορτισμένη η οποία τοποθετείται προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου. Το αμέσως επόμενο αμινοξύ της θέσης επίσης δεν είναι συντηρημένο αλλά πάντα φέρει πλευρική αλυσίδα με δακτύλιο (Εικόνα 21) και πιθανότατα συμμετέχει σε π-π αλληλεπιδράσεις με τους δακτύλιους των εισερχόμενων β-λακταμικών (Doucet N. και συν., 2005; Papp-Wallace K. M. και συν., 2010β). Το απέναντι τοίχωμα του ενεργού κέντρου που σχηματίζεται από τη B3 β-αλυσίδα συμμετέχει επίσης στη δέσμευση των υποστρωμάτων και στην διάχυση της τοπικά εμφανιζόμενης ενέργειας στο σύμπλοκο *Michaelis*. Η ακυλομάδα του σκελετού του αμινοξέος στη θέση 237 ή η υδροξυλομάδα της πλευρικής του αλυσίδας όταν αυτή καταλαμβάνεται από αντίστοιχα αμινοξέα συμμετέχει στην δέσμευση της αμινομάδας των άμινο-άκυλο υποκαταστάσεων των πενικιλινών και κεφαλοσπορινών. Το υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος στη θέση 235

(συνήθως θρεονίνη αλλά στα ένζυμα τύπου TEM σερίνη) συμμετέχει στην δέσμευση του C3/C4 καρβοξυλίου των β-λακταμικών το οποίο κατά την πορεία της αντίδρασης αλληλεπιδρά με την πλευρική αλυσίδα της Ser130. Η αρχική δέσμευση του καρβοξυλίου αυτού διαμεσολαβείται από την πλευρική αλυσίδα της αργινίνης στη θέση 244 η οποία αν και ανήκει σε δευτεροταγή δομή μακριά από το ενεργό κέντρο η θετική ομάδα γουανιδίου της τοποθετείται πολύ κοντά σε αυτό (Matagne A. και συν., 1998). Σε κρυσταλλογραφικές δομές ελευθέρων βΛτΑ το αμινοξύ αυτό συμμετέχει σε ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με μόρια νερού το οποίο καταλήγει στην Ser130 του ενεργού κέντρου (Page M. G., 2008). Η αργινίνη στη θέση 244 δεν είναι συντηρημένη αλλά όταν απουσιάζει αντίστοιχα θετικά αμινοξέα που εντοπίζονται στις θέσεις 220 ή 276 τοποθετούν τις πλευρικές τους αλυσίδες σε ανάλογη θέση (Matagne A. και συν., 1998). Το χείλος που σχηματίζεται από την H10 έλικα και τη θηλειά που τη συνδέει με την H9 δεν είναι συντηρημένο και στα ένζυμα τύπου SHV και TEM έχει μεγάλο ποσοστό υδρόφοβων αμινοξέων ενώ στις ΕΦΒΛ και στις καρβαπενεμάσες τα αμινοξέα που το σχηματίζουν είναι περισσότερο πολικά (Εικόνα 21). Στη δομή αυτή (R2 θηλειά) δεσμεύονται οι R2 πλευρικές αλυσίδες των κεφαλοσπορινών. Το αντιδιαμετρικό χείλος, δηλαδή αυτό που σχηματίζεται από την θηλειά Ω, συμμετέχει στη δέσμευση των R1 πλευρικών αλυσιδών των κεφαλοσπορινών.

Τα αμινοξέα που συμμετέχουν απευθείας στις αντιδράσεις ακυλίωσης και απακυλίωσης της Ser70 από τα β-λακταμικά έχουν ταυτοποιηθεί μέσω πειραμάτων μεταλλαξογένεσης και αυτά είναι τα Lys73, Ser130, Glu166 και Lys234 (Matagne A. και Frere J M, 1995). Το πώς ακριβώς όμως επιτυγχάνεται η αναμετάδοση φορτίου και οι μεταφορές πρωτονίων δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί κυρίως όσον αφορά το στάδιο της ακυλίωσης. Το κύριο ερώτημα που διχάζει είναι ο τρόπος απόσπασης του πρωτονίου από την καταλυτική σερίνη. Δύο δρόμοι έχουν προταθεί με τον πρώτο να προκρίνει την απόσπαση του πρωτονίου από το μόριο νερού w1 το οποίο προσφέρει ένα υδρογονοκατιόν στην πλευρική αλυσίδα του Glu166 που είναι αποπρωτονιωμένη στο στάδιο του συμπλόκου *Michaelis* με την Lys73 να είναι πρωτονιωμένη (Εικόνα 22). Στο δεύτερο μονοπάτι απόσπασης προτείνεται η ενεργοποίηση του πυρηνόφιλου της καταλυτικής σερίνης από την αποπρωτονιωμένη πλευρική αλυσίδα της Lys73 με την πλευρική αλυσίδα του Glu166 σε αυτή την περίπτωση να μην είναι φορτισμένη (Εικόνα

22) (Matagne A. και συν., 1998; Meroueh S. O. και συν., 2005). Τα ενεργειακά φράγματα που χαρακτηρίζουν τις δύο παραπάνω πορείες δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους με την πρώτη περίπτωση να είναι περισσότερο ευνοημένη (Meroueh S. O. και συν., 2005). Πράγματι σε μερικά ένζυμα η πρώτη περίπτωση υποστηρίζεται και από πειραματικούς και θεωρητικούς υπολογισμούς των σταθερών διάστασης οξέος των αμινοξέων Lys73 και Glu166. Οι τιμές pKa που έχουν υπολογιστεί για τα αμινοξέα αυτά στο ενεργό κέντρο της TEM-1 είναι 8,0-8,5 και ~4,4 αντίστοιχα γεγονός που δηλώνει ότι σε ουδέτερο pH η κατάσταση πρωτονίωσης των δύο αμινοξέων θα είναι αυτή της πρώτης περίπτωσης. Η κατάσταση πρωτονίωσης της Lys73 φαίνεται ότι ρυθμίζεται κυρίως από το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργεί το φορτισμένο Glu166 (του οποίου η υπολογισμένη pKa για την TEM-1 δεν διαφέρει πολύ από την αντίστοιχη που έχει σε υδατικό διάλυμα [4,07-4,3]) καθώς στον Glu166Ala μεταλλάκτη του ενζύμου η pKa της Lys73 μειώνεται περίπου στο 6 (την κύρια επίδραση τώρα την ασκεί η φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys234). Ο παραπάνω μεταλλάκτης αν και χάνει σημαντικό βαθμό της ενεργότητάς του διατηρεί την ικανότητα για ακυλίωση της καταλυτικής σερίνης γεγονός που δηλώνει ότι και το δεύτερο μονοπάτι είναι λειτουργικό. Έτσι έχει προταθεί ότι και οι δύο τρόποι απόσπασης του πρωτονίου λειτουργούν στα ένζυμα τάξης A. Η εγγύτητα των καταλοίπων Lys73 και Glu166 η οποία διαφέρει στα διάφορα ένζυμα τάξης A καθώς και η επίδραση των ομάδων του εισερχόμενου β-λακταμικού ενδέχεται να ευνοούν διαφορετικούς δρόμους απόσπασης με επιπτώσεις στην απόδοση της αντίδρασης. (Meroueh S. O. και συν., 2005)

Τόσο η έμμεση δράση του Glu166 όσο και η άμεση της Lys73 οδηγούν στην ίδια κατάσταση μετάπτωσης στην οποία έχει σχηματιστεί το τετραεδρικό ενδιάμεσο οξυανιόντος με τα Lys73 και Glu166 να είναι πρωτονιωμένα (Εικόνα 22). Η πρωτονίωση του αζώτου του β-λακταμικού δακτυλίου που οδηγεί στην κατάρρευση της ρίζας αυτής και στον σχηματισμό της πυθμενικής κατάστασης του ακυλενζύμου διαμεσολαβείται από την Ser130. Το υδροξύλιο του καταλοίπου αυτού προσφέρει το υδρογόνο του στο άζωτο μέσω δεσμού υδρογόνου και δέχεται αυτό της πλευρικής αλυσίδας της Lys73 η οποία με την σειρά της πρωτονιώνεται από το κατάλοιπο Glu166. Ο όξινος χαρακτήρας του υδροξυλίου της Ser130 ενισχύεται μέσω της αλληλεπίδρασής του με τη Lys234 (Εικόνα 22). Έχει προταθεί ότι το συντηρημένο κρυσταλλογραφικό νερό που εντοπίζεται κοντά

στην Ser130 παρεμβάλλεται ως ενδιάμεσο στην πρωτονίωση της αποχωρούσας αμινομάδας. Ο Ser130Gly μεταλλάκτης της SHV-5 (SHV-10) αν και έχει μειωμένη ενεργότητα διατηρεί την ικανότητα για ακυλίωση γεγονός που έχει αποδοθεί στην αντικατάσταση του ρόλου της σερίνης από αυτό το νερό το οποίο ενεργοποιείται από τα θετικά αμινοξέα που προβάλλουν στην περιοχή. (Matagne A. και συν., 1998)

Η υδρόλυση του ακυλενζύμου αντίθετα με τις άλλες β-λακταμάσες σερίνης και τις PBP's συμβαίνει από το α-επίπεδο του εστερικού δεσμού και διαμεσολαβείται από το Glu166 το οποίο λειτουργώντας ως βάση ενεργοποιεί το υδρολυτικό μόριο νερού w1 αποσπώντας ένα πρωτόνιο. Το τετραεδρικό οξυανιόν που δημιουργείται από την προσβολή του ανιόντος υδροξειδίου στον άνθρακα του εστερικού δεσμού καταρρέει μέσω της πρωτονίωσης της αποχωρούσας καταλυτικής σερίνης από την Glu166 η οποία τώρα λειτουργεί ως συζυγές οξύ. (Matagne A. και συν., 1998) Η ύπαρξη του συντηρημένου αμινοξέος Glu166 στις βΛτΑ είναι το εξελικτικό βήμα που οδήγησε στην διαφοροποίησή τους από πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες σε β-λακταμάσες καθώς τους έδωσε τη δυνατότητα να υδρολύουν αποδοτικά τα ακυλ-ένζυμα των β-λακταμικών. Το αμινοξύ αυτό συμμετέχει και στην ακυλίωση της καταλυτικής σερίνης ενώ ο εναλλακτικός δρόμος απόσπασης του πρωτονίου της Ser70 από τη Lys73 είναι εξελικτικό κατάλοιπο του μηχανισμού κατάλυσης των D,D-πεπτιδασών το οποίο φαίνεται να έχει ακόμη λειτουργία στις βΛτΑ.

iv. Τροποποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων και μελέτες δομής-λειτουργίας

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι βΛτΑ τύπου TEM και SHV διευρύνουν το φάσμα υποστρωμάτων τους περιλαμβάνοντας οξυμίμο υποστρώματα και αποκτούν ανθεκτικότητα σε αναστολή μέσω μεταλλάξεων αποτέλεσε αντικείμενο πολλών μελετών δομής-λειτουργίας εξαιτίας της κλινικής σημασίας των συγκεκριμένων ενζύμων. Οι διάφορες ποικιλίες TEM και SHV φέρουν αμινοξικές υποκαταστάσεις σε περίπου 87 θέσεις χωρίς όμως να έχουν όλες επίδραση στην καταλυτική ικανότητα των ενζύμων. Μεταλλάξεις στην H1-B1 περιοχή, στη θηλειά Ω, στις B3-B4 β-αλυσίδες αλλά και στη B5 αλυσίδα σχετίζονται με αυξημένη αντοχή των εντεροβακτηρίων σε νεώτερες κεφαλοσπορίνες και στους συνδυασμούς-πενικιλινών με τους αναστολείς αυτοκτονίας

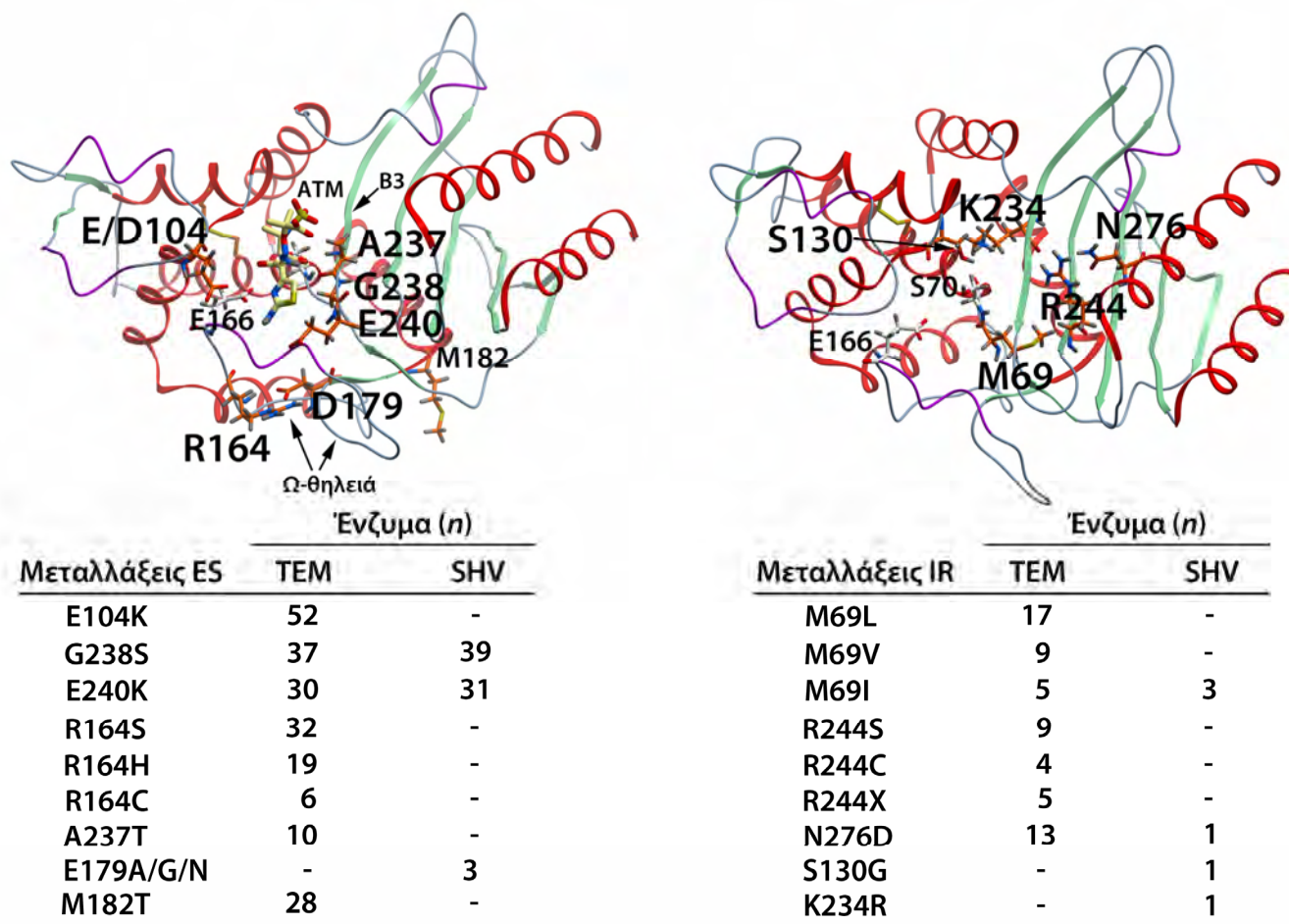
(Εικόνα 23). Επιπλέον θέσεις όπως η 69, η 104 και η 182 σχετίζονται επίσης με την τροποποίηση των βιοχημικών ιδιοτήτων των ενζύμων. Τα διάφορα ένζυμα με ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος συνήθως συσσωρεύουν πολλές μεταλλάξεις και είναι δύσκολο να αποδωθούν σαφείς ρόλοι σε κάθε μία από αυτές καθώς τα αποτελέσματα ενδέχεται να είναι συνεργιστικά. (Page M. G., 2008)

Υποκαταστάσεις στην περιοχή H1-B1 συμβαίνουν κυρίως στις θέσεις 21 (π.χ. TEM-4 και παράγωγα αυτής, TEM-67), 35 (SHV-2A και παράγωγα αυτής, TEM-130), 39 (TEM-2 και παράγωγα αυτής) και 43 (SHV-7 και παράγωγα αυτής). Καμία από τις παραπάνω μεταλλάξεις δεν έχει βρεθεί να έχει σημαντική επίδραση στις κινητικές σταθερές υδρόλυσης και πιθανότατα οι όποιες διαφορές παρατηρούνται στα επίπεδα ευαισθησίας ενδέχεται να οφείλονται σε αλλαγές στην έκκριση των ενζύμων (ειδικά των μεταλλαγών που βρίσκονται κοντά στο σημείο απόσπασης του πεπτιδίου οδηγητή), στην κινητική αναδίπλωσης και στην σταθερότητα του ενζύμου (Page M. G., 2008). Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η TEM-2 που προκύπτει από την TEM-1 μέσω της Gln39Lys υποκατάστασης και έχει τις ίδιες καταλυτικές ιδιότητες με αυτή εμφανίζει υψηλότερη θερμική σταθερότητα (Raquet X. και συν., 1995).

Υποκαταστάσεις που επηρεάζουν το βαθμό απενεργοποίησης των ενζύμων από τους αναστολείς αυτοκτονίας αφορούν κυρίως τις θέσεις 69 και 244 και πιο σπάνια τη θέση 276 (Εικόνα 23). Οι μεταλλαγές αυτές είναι πιο συχνές στα ένζυμα τύπου TEM ενώ στα SHV αλλαγές στα καταλυτικά αμινοξέα Ser130 και Lys234 σε γλυκίνη και αργινίνη αντίστοιχα οδηγούν επίσης σε μειωμένη αναστολή (Prinarakis E. E. και συν., 1997; Dubois V. και συν., 2008). Η μεθειονίνη της θέσης 69 (η οποία απαντά μόνο στις πενικιλινάσες) όταν αντικαθίσταται από κάποιο υδρόφοβο αμινοξύ (λευκίνη, βαλίνη ή ισολευκίνη) προκαλεί μείωση στον ρυθμό κατάλυσης και στην απόδοση αυτής για όλα τα β-λακταμικά υποστρώματα (π.χ. TEM-33 Met69Leu ποικιλία της TEM-1, Πίνακας 3) (Page M. G., 2008). Αυτή η μείωση της αντιδραστικότητας του ενεργού κέντρου οδηγεί παράλληλα στην επιβράδυνση της αλληλεπίδρασης με τους αναστολείς αυτοκτονίας τροποποιώντας την ισορροπία μεταξύ ακυλίωσης, ακυλ-ενζύμων που μπορούν να υδρολυθούν και μόνιμα απενεργοποιημένων ριζών λόγω των δευτερογενών αντιδράσεων. Μελέτες κρυσταλλογραφίας έχουν δείξει ότι το παραπάνω οφείλεται σε τροποποίηση της σχετικής θέσης των Ser70 και Ser130 η οποία δεν επιτρέπει την

αποδοτική μεταφορά πρωτονίων κατά την πορεία της αντίδρασης (Wang X. και συν., 2002). Ανάλογη αρνητική επίδραση στην λειτουργία του ενζύμου έχουν και υποκαταστάσεις της θετικής αλυσίδας της Arg244 με κάποια μη φορτισμένη (συνήθως σερίνη ή κυστεΐνη). Όπως αναφέρθηκε το αμινοξύ αυτό συμμετέχει στην αρχική δέσμευση του C3/C4 καρβοξυλίου των β-λακταμικών το οποίο είναι πολύ σημαντικό στάδιο για την αντίδραση καθώς η απόσπαση της συγκεκριμένης όξινης ομάδας ($pK_a \sim 1,7-2,8$; Hou J. P. και Poole J. W., 1971; Yamana T. και Tsuji A., 1976) από το κέλυφος νερού που την περιβάλλει είναι το πρώτο ενεργειακό φράγμα που πρέπει να υπερκεραστεί για να ξεκινήσει η κατάλυση (Tripathi R. και Nair N. N., 2013). Οι υποκαταστάσεις αυτές μειώνουν σημαντικά το ρυθμό ανακύκλωσης και τη συγγένεια για όλα τα β-λακταμικά. Η υποκατάσταση Asn276Asp ενδέχεται να επηρεάζει επίσης την αρχική δέσμευση του καρβοξυλίου των β-λακταμικών μέσω αλληλεπίδρασης με την πλευρική αλυσίδα της Arg244 (Bonomo R. A. και συν., 1995). Οι υποκαταστάσεις στη θέση 69 σε περιορισμένο αριθμό ενζύμων συνδυάζονται με μεταλλαγές που οδηγούν σε αυξημένη ταχύτητα υδρόλυσης των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος. Αν και επιδρούν αρνητικά στον χαρακτήρα εκτεταμένου φάσματος αυτός διατηρείται και συνδυάζεται με περιορισμένη ανοχή σε αναστολή (Page M. G., 2008).

Μία μετάλλαξη που εμφανίζει υψηλή συσχέτιση ως προς την αυξημένη υδρόλυση οξυμίμο υποστρωμάτων είναι η Glu104Lys που παρατηρείται πολύ συχνά σε ένζυμα τύπου TEM (Εικόνα 23). Απαντά σπάνια ως μόνη μετάλλαξη και συνήθως συνδυάζεται με αλλαγές στις θέσεις 164, 240 και 182 (Page M. G., 2008). Εργαστηριακός μεταλλάκτης της TEM-1 που φέρει την συγκεκριμένη υποκατάσταση εμφανίζει μειωμένη καταλυτική απόδοση έναντι των υποστρωμάτων που συνήθως υδρολύονται γρήγορα από τα ένζυμα της κατηγορίας (βενζυλπενικιλίνη και κεφαλοθίνη). Αντίθετα η υδρόλυση των οξυμίμο υποστρωμάτων κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη και αζτρεονάμη είναι αυξημένη κυρίως λόγω αύξησης της k_{cat} . Στην υψηλή καταλυτική απόδοση συμβάλλει και η μειωμένη K_m η οποία επηρεάζεται σημαντικά κατά την αλληλεπίδραση με την κεφταζιδίμη (Πίνακας 5). Έχει υποτεθεί ότι η παραπάνω αύξηση της φαινόμενης συγγένειας οφείλεται στην αλληλεπίδραση της αρνητικά φορτισμένης αλυσίδας της κεφταζιδίμης με το θετικό αμινοξύ που καταλαμβάνει τώρα αυτή την θέση (Matagne A. και συν., 1998). Εν μέρει αυτό φαίνεται να ισχύει αλλά το γεγονός ότι η συγγένεια ως



Εικόνα 23: Μεταλλάξεις που οδηγούν σε διεύρυνση φάσματος (ES) και αντοχή σε αναστολή (IR) στα ένζυμα τύπου TEM και SHV και η θέση αυτών στην τριτοταγή δομή των ενζύμων. Η τριτοταγής δομή που δίνεται η θέση των μεταλλάξεων ES είναι αυτή της TEM-1 (PDB ID: 1M40) στην οποία έχει μοντελοποιηθεί η αζτρεονάμη (ATM) με την διαμόρφωση που έχει στο ακύλ-ένζυμο του μεταλλάκτη της ΕΦΒΑ ΤΟΗΟ-1 E166A/R274N/R276N (PDB ID: 2ZQC). Τα δεδομένα των μεταλλαγμένων ενζύμων προέρχονται από τη βάση δεδομένων για τις β-λακταμάσες της κλινικής Lahey την οποία διαχειρίζονται ο Jacoby G. και η Bush K. (<http://www.lahey.org/Studies/>)

προς την αζτρεονάμη δεν βελτιώνεται στον ίδιο βαθμό δηλώνει ότι επιπλέον παράγοντες ενδέχεται να συμμετέχουν στην αύξηση των παραπάνω σταθερών. Η μετάλλαξη σύμφωνα με τις παρατηρούμενες κινητικές σταθερές αυξάνει τόσο την ταχύτητα δημιουργίας του συμπλόκου *Michaelis* όσο και τις ταχύτητες ακυλίωσης και απακυλίωσης (Page, M. G., 2008). Η συγκεκριμένη υποκατάσταση δεν απαντά σε ένζυμα τύπου SHV αλλά εργαστηριακός μεταλλάκτης όπου το αντίστοιχο αρνητικό αμινοξύ (Asp) έχει αντικατασταθεί από λυσίνη φαίνεται επίσης να έχει ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος ενώ τώρα η υδρόλυση των υποστρωμάτων που υδρολύονται γρήγορα από τις βΛτΑ δεν επηρεάζεται σημαντικά (Bethel C. R. και συν., 2006). Ένας φυσικός μεταλλάκτης της SHV που φέρει την Asp104Gly υποκατάσταση (SHV-99) παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης μόνο για την αζτρεονάμη ενώ αυτή έναντι της κεφοταξίμης και της κεφταζιδίμης δεν επηρεάζεται (Ramdani-Bouguessa N. και συν., 2011). Οι παραπάνω επιδράσεις στις σταθερές υδρόλυσης υποδεικνύουν ότι τα ένζυμα που φέρουν την E104K υποκατάσταση ίσως χαρακτηρίζονται από περισσότερο διευρυμένο ενεργό κέντρο καθώς έτσι θα βελτιώνεται ο προσανατολισμός της ογκώδους πλευρικής αλυσίδας των οξυμίμο υποστρωμάτων ώστε η ακυλίωση να είναι περισσότερο αποτελεσματική με την διαμόρφωση αυτή να επιτρέπει επίσης την πιο αποτελεσματική απακυλίωση. Μελέτες κρυσταλλογραφίας έδειξαν ότι η υποκατάσταση προκαλεί κάποια αλλαγή στο εύρος της καταλυτικής κοιλότητας αλλά αυτή δεν είναι τόσο εκτεταμένη και πιθανότατα οφείλεται σε επιπλέον μεταλλάξεις που φέρουν τα ένζυμα (Εικόνα 24Α; Orençia M. C. και συν., 2001). Η αρνητική πλευρική αλυσίδα στην θέση 104 εξαιτίας της τοποθέτησής της θα μπορούσε να παρεμποδίζει την δέσμευση των οξυμίμο υποστρωμάτων μέσω απώθησης του οξυγόνου της οξυμίμο αλυσίδας ή/και του καρβοξυλίου στην περίπτωση της κεφταξιδίμης και της αζτρεονάμης (Knox J. R., 1995). Πράγματι τα ένζυμα που έχουν ιδιότητες ΕΦΒΛ συνήθως σε αυτή τη θέση δε φέρουν αρνητικό αμινοξύ (με τις GES και BEL να αποτελούν εξαίρεση, Εικόνα 21). Η ύπαρξη λυσίνης στη θέση 104 επίσης έχει υποτεθεί ότι τροποποιεί την ακριβή τοποθέτηση των καταλυτικών αμινοξέων του μοτίβου SDN (Petit A. και συν., 1995) και αυτό τουλάχιστον για την περίπτωση της Asn132 φαίνεται να ισχύει από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες (Εικόνα 24Α). Ο ακριβής μηχανισμός διεύρυνσης του φάσματος από την συγκεκριμένη μετάλλαξη παραμένει ασαφής.

Πίνακας 5: Διεύρυνση φάσματος στις βλτα TEM και SHV τύπου.

E104K (Petit A. και συν., 1995)						
β-λακτάμη	TEM-1 (Glu104)			μεταλλάκτης TEM-1 (Lys104)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	1100	24	45·10 ⁶	840	21	40·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	150	260	0.6·10 ⁶	150	240	0.62·10 ⁶
Κεφοταξίμη	2	1100	1.8·10 ³	25	1000	25·10 ³
Κεφταζιδίμη	0,02	300	66	0,3	80	3,7·10 ³
Αζτρεονάμη	0.2	200	10 ³	2,5	160	16·10 ³
D104K (Bethel C. R. και συν., 2006)						
	SHV-1 (Asp104)			μεταλλάκτης SHV-1 (Lys104)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	2400	120	20·10 ⁶	2000	135	15·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	25	48	0,5·10 ⁶	7,4	20	0,4·10 ⁶
Κεφοταξίμη	MM			1,7	198	10 ⁴
R164S (Raquet X. και συν., 1994)						
	TEM-1 (Arg164)			TEM-7 (Ser164)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	1600	19	84·10 ⁶	40	3,1	13·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	160	246	0,65·10 ⁶	20	80	0,25·10 ⁶
Κεφοταξίμη	9	6000	1,5·10 ³	1,5	100	15·10 ³
Κεφταζιδίμη	0,3	4300	70	9	1000	9·10 ³
Αζτρεονάμη	1	1430	0,7·10 ³	4	1333	3·10 ³
A237T (Chanal-Claris C. και συν., 1997)						
	TEM-46 (39K, E104K, R164S, E240K)			TEM-24 (39K, E104K, R164S, Ala237Thr, E240K)		
	* V_{max}	K_m (μM)	* V_{max}/K_m	* V_{max}	K_m (μM)	* V_{max}/K_m
Πενικιλίνη G	1	-	1	1	-	1
Κεφαλοθίνη	0,46	100	0,02	2,8	43	0,36
Κεφοταξίμη	0,13	50	0,01	1,3	50	0,14
Κεφταζιδίμη	0,19	159	0,06	14	380	0,21
Αζτρεονάμη	0,35	12	0,09	1,2	42	0,17
G238S (Lee K. Y. και συν., 1991)						
	SHV-1 (Gly238)			SHV-2A (Ser238)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	250	40	6,3·10 ⁶	150	13,5	11·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	19	42	0,5·10 ⁶	29	8	3,6·10 ⁶
Κεφοταξίμη	MM	>300	-	15	11,4	1,3·10 ⁶
E240K (Queenan A. M. και συν., 2004)						
	TEM-12 (R164S)			TEM-10 (R164S, Glu240Lys)		
	* V_{max}	K_m (μM)	* V_{max}/K_m	* V_{max}	K_m (μM)	* V_{max}/K_m
Πενικιλίνη G	1,8	20	90	1,7	5,8	293
Κεφαλοριδίνη	1	-	1	1	-	1
Κεφοταξίμη	0,04	94	0,43	0,09	46	2
Κεφταζιδίμη	0,07	130	0,54	2	150	13
Αζτρεονάμη	0,11	870	0,13	0,32	28	11

* Σχετικές τιμές ως προς την υδρόλυση πενικιλίνης ή κεφαλοριδίνης

Πίνακας 6: Υδρόλυση *δεσ-* *syn-* και *anti-* οξυμίμο κεφαλοσπορινών από την TEM-2 (Laurent G. και συν., 1984)

Κεφαλοσπορίνη	TEM-2		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
<i>δεσ-</i> οξυμίμο (RU23345)	8,3	0,2	36·10 ³
<i>syn-</i> (κεφοταξίμη)	6,2	7,1	1,1·10 ³
<i>anti-</i> (RU25238)	26	0,32	81·10 ³

Οι συχνότερες υποκαταστάσεις που οδηγούν σε διέγερση του φάσματος υποστρωμάτων στις TEM βΛτΑ είναι αυτές που αφορούν την Arg164 στη θηλειά Ω. Αντικατάσταση του αμινοξέος αυτού συνήθως από σερίνη, ιστιδίνη και κυστεΐνη αυξάνει την ταχύτητα υδρόλυσης των οξυίμινο υποστρωμάτων. Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως συνδυάζονται με τη Glu104Lys, αλλά και υποκαταστάσεις στις θέσεις 237, 238 και 240. Η Arg164Ser μειώνει τη ταχύτητα υδρόλυσης έναντι πενικιλινών και παλαιότερων κεφαλοσπορινών μέσω σημαντικής μείωσης του ρυθμού ανακύκλωσης η οποία αντισταθμίζεται ως ένα βαθμό από ταυτόχρονη μείωση της K_m (Πίνακας 5; Matagne A. και συν., 1998). Η καταλυτική απόδοση έναντι των οξυίμινο κεφαλοσπορινών είναι αυξημένη στη μεν κεφοταξίμη λόγω αύξησης της φαινόμενης συγγένειας και στην κεφαζιδίμη και αζτρεονάμη λόγω παράλληλης αύξησης της σταθεράς κατάλυσης. Η Arg164 είναι σχετικά συντηρημένο αμινοξύ στις βΛτΑ και συμμετέχει σε γέφυρες άλατος με τα επίσης συντηρημένα Glu171 και Asp179 που εντοπίζονται στη θηλειά Ω διατηρώντας τη χαρακτηριστική διαμόρφωση αυτού του δομικού στοιχείου (Herzberg O. και συν., 1991). Η σταθερότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα υδρόλυσης των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος καθώς η απομάκρυνση του αρνητικού αμινοξέος από την θέση 179 στις SHV (στις οποίες δεν έχουν βρεθεί φυσικά ένζυμα με αλλαγές στην 164) επίσης αυξάνει την υδρόλυση αυτών των υποστρωμάτων (Sampson J. M. και συν., 2011). Κρυσταλλογραφικές μελέτες στα ένζυμα τύπου TEM που φέρουν αλλαγές στη θέση 164 έχουν δείξει ότι το δίκτυο δεσμών υδρογόνου στην κοιλότητα δέσμευσης των αμινό-άκυλο πλευρικών αλυσίδων τροποποιείται σημαντικά στα ένζυμα αυτά γεγονός που συνάδει με την διαφορετική συμπεριφορά των ενζύμων έναντι υποστρωμάτων που διαφέρουν σε αυτές τις πλευρικές αλυσίδες (Page M. G., 2008). Ανάλυση της δομής των εργαστηριακών μεταλλακτών της SHV-1 Arg164His και Arg164Ser έδειξε ότι ενώ η θηλειά Ω στα ελεύθερα ένζυμα είναι στέρα δομημένη όταν δεσμεύονται β-λακταμικά υποστρώματα αποδιοργανώνεται. Το γεγονός υποδηλώνει ότι οι αυξημένοι βαθμοί ελευθερίας της συγκεκριμένης δομής λόγω της εξασθένησης των ιοντικών αλληλεπιδράσεων ίσως επιτρέπουν την δέσμευση υποστρωμάτων με μεγαλύτερες άκυλο-άμινο πλευρικές αλυσίδες (Sampson J. M. και συν., 2011).

Υποκαταστάσεις στη Β3 β-αλυσίδα σχετίζονται επίσης με αυξημένη υδρόλυση. Μεταλλάξεις στις θέσεις κατά Ambler 237, 238 και 240 οδηγούν σε διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων με τις δύο τελευταίες να είναι οι πιο συχνές. Υποκατάσταση της Ala237 κυρίως με θρεονίνη και σπάνια με γλυκίνη (έχει βρεθεί μόνο μία φορά) στις TEM β-λακταμάσες αυξάνει την υδρόλυση τόσο έναντι των παλαιότερων κεφαλοσπορινών όσο και των οξυμίμο β-λακταμικών με ταυτόχρονη αύξηση της μέγιστης ταχύτητας υδρόλυσης και μείωση της K_m (Πίνακας 5). Η θέση αυτή εμπλέκεται άμεσα στο μηχανισμό κατάλυσης δομώντας με την αμιδομάδα του σκελετού την οπή οξιανιόντος ενώ μέσω της ακυλομάδας της σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα των άκυλο-άμινο υποκαταστάσεων (Lamotte-Brasseur J. και συν., 1991; Strynadka N. C. και συν., 1992). Έχει υποτεθεί ότι οι οξυμίμο κεφαλοσπορίνες λόγω του μεγέθους αυτής της αλυσίδας δεν μπορούν να σχηματίσουν αυτόν τον τελευταίο δεσμό και ότι η ύπαρξη του υδροξυλίου της θρεονίνης στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα ένζυμα θα μπορούσε να διαμεσολαβεί τη δέσμευση της αμινομάδας των R1 πλευρικών αλυσιδών αυτών των υποστρωμάτων (Matagne A. και συν., 1998). Εξετάζοντας τις αμινοξικές αλληλουχίες των υπόλοιπων ΕΦΒΑ παρατηρούμε ότι όλες στη θέση αυτή φέρουν κατάλοιπο με υδροξυλιωμένη πλευρική αλυσίδα (Εικόνα 21).

Η υποκατάσταση Gly238Ser απαντά πολύ συχνά τόσο σε ένζυμα τύπου TEM όσο και σε SHV. Σπάνια έχουν βρεθεί και άλλα αμινοξέα στη θέση αυτή όπως ασπαρτικό οξύ στις TEM και αλανίνη στις SHV. Η σερίνη αντί γλυκίνης στη θέση 238 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σταθεράς κατάλυσης για τα υποστρώματα με μικρές πλευρικές αλυσίδες η οποία όμως δεν επηρεάζει την καταλυτική απόδοση καθώς η φαινόμενη συγγένεια αυξάνεται επίσης (Πίνακας 5). Η υδρόλυση των οξυμίμο υποστρωμάτων αυξάνεται σημαντικά μέσω μεγάλης αύξησης της k_{cat} και εκτεταμένης μείωσης της K_m (Page M. G., 2008). Η επίδραση της συγκεκριμένης υποκατάστασης στη δομή των ενζύμων αφορά τη μετατόπιση της Β3 β-αλυσίδας έτσι ώστε να διευρύνεται η κοιλότητα του ενεργού κέντρου που δεσμεύει τις R1 πλευρικές αλυσίδες (Εικόνα 24Α; Nukaga M. και συν., 2003). Η μετακίνηση αυτή της Β3 εκτός από την παραπάνω επίδραση αλλάζει και την τοποθέτηση της πλευρικής αλυσίδας της Glu240 η οποία στα ένζυμα αγρίου τύπου προβάλλει προς στο ενεργό κέντρο απέναντι από την πλευρική αλυσίδα του Glu/Asp104 και θεωρείται ότι επίσης εμποδίζει τη δέσμευση των αρνητικών

πλευρικών αλυσίδων των οξυμίμο-υποστρωμάτων (Nukaga M. και συν., 2003). Η θέση 238 σε αρκετά ένζυμα τάξης A που υδρολύουν αποτελεσματικά αυτά τα β-λακταμικά δεν καταλαμβάνεται από γλυκίνη. Συχνά και ειδικά στις καρβαπενεμάσες τάξης A στη θέση αυτή βρίσκεται κυστεΐνη η οποία σχηματίζει γέφυρα θείου με την κυστεΐνη της θέσης 69 (Sougakoff W. και συν., 2002) ενώ σε άλλες ΕΦΒΛ έχει βρεθεί αλανίνη, σερίνη και ασπαραγίνη. Η επίδραση του αμινοξέος 238 στις καταλυτικές ιδιότητες των βΛτΑ πιθανότατα σχετίζεται με αλλαγές στις κινήσεις της Β3 και της θηλειάς Ω καθώς εντοπίζεται στο σημείο επαφής των δομών αυτών (Page M. G., 2008).

Η αρνητική αλυσίδα του Glu240 έχει επίσης αντικατασταθεί σε πολλά ένζυμα των δύο παραπάνω ομάδων κυρίως με τη θετική πλευρική αλυσίδα λυσίνης. Η συγκεκριμένη υποκατάσταση αυξάνει την καταλυτική απόδοση κυρίως μέσω αύξησης της φαινόμενης συγγένειας και δευτερευόντως μέσω αύξησης του ρυθμού ανακύκλωσης. Η πλευρική αλυσίδα της λυσίνης ενδέχεται να διευκολύνει τη δέσμευση των ηλεκτραρνητικών πλευρικών αλυσίδων όπως στην περίπτωση της θέσης 104. Προεκβολή όμως της ογκώδους αυτής αλυσίδας προς το ενεργό κέντρο ενδέχεται να προκαλεί στερεοχημική παρεμπόδιση στη δέσμευση των υποστρωμάτων (Matagne A. και συν., 1998). Αυτό φαίνεται να αντισταθμίζεται με συνδυασμό της μετάλλαξης Glu240Lys με υποκαταστάσεις στις θέσεις 164 και 238 οι οποίες όπως αναφέρθηκε αυξάνουν την ευκινησία της πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο σημείο (Page M. G., 2008). Οι υπόλοιπες ΕΦΒΛ δε διαθέτουν αρνητικό αμινοξύ στη συγκεκριμένη θέση (με εξαίρεση τις CTX-M και των συγγενικών της ενζύμων, Εικόνα 21). Η σχέση του βαθμού ευελιξίας της συγκεκριμένης περιοχής η οποία αντιστοιχεί στη στροφή που ενώνει τις Β3 και Β4 β-αλυσίδες με τις καταλυτικές ιδιότητες αποτυπώνεται και στο ότι κάποιες ΕΦΒΛ διαθέτουν περισσότερο επιμηκείς βρόγχους σύνδεσης των δύο δευτεροταγών δομών (π.χ VEB ΕΦΒΛ, Εικόνα 21).

Η αυξημένη ευελιξία που προσδίδουν οι παραπάνω υποκαταστάσεις ειδικά όταν συνδυάζονται στα ένζυμα τύπου TEM ενδέχεται να αποσταθεροποιούν σημαντικά το μόριο της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να μην αναδιπλώνεται σωστά ή να αποδιατάσσεται εύκολα. Αυτή η αρνητική επίδραση στην σταθερότητα φαίνεται να αντισταθμίζεται από τη μετάλλαξη Met182Thr η οποία απάντά σε αρκετές TEM ΕΦΒΛ που συνδυάζουν πολλές μεταλλάξεις (Wang X. και συν., 2002). Όταν απαντά μόνη της δεν έχει κάποια

επίδραση στις καταλυτικές ιδιότητες καθώς η TEM-135 που προκύπτει από την TEM-1 έχει παρόμοιες υδρολυτικές ικανότητες με το πατρικό ένζυμο (Pasquali F. και συν., 2005), ενώ η μετάλλαξη παρουσία των υποκαταστάσεων ΕΦ δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην καταλυτική απόδοση (<5 φορές) (Sideraki V. και συν., 2000; Wang X. και συν., 2002). Έχει βρεθεί ότι η Met182Thr επηρεάζει τη δυναμική της αναδίπλωσης και τη θερμική σταθερότητα της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (Huang W. και Palzkill T., 1997; Wang X. και συν., 2002).

Οι μελέτες δομής-λειτουργίας στις TEM και SHV ΕΦΒΛ έχουν δείξει τη διεύρυνση της κοιλότητας του ενεργού κέντρου που δεσμεύει τις ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες των οξυμίμο υποστρωμάτων μέσω μετατόπισης της B3 αλυσίδας και αύξησης της ευελιξίας της θηλειάς Ω είναι η πιθανότερη αιτία για την αύξηση της καταλυτικής ενεργότητας έναντι των συγκεκριμένων υποστρωμάτων (Page M. G., 2008). Αν και η απλή αυτή εξήγηση φαίνεται βάσιμη δεν μπορεί να ερμηνεύσει πλήρως τη διεύρυνση του φάσματος. Το γεγονός ότι τα ένζυμα αγρίου τύπου δεν υδρολύουν τα οξυμίμο υποστρώματα πιθανότατα δεν οφείλεται στο ότι αυτά έχουν πολύ μεγάλες αλυσίδες και δεν μπορούν να δεσμευθούν αλλά στο ποια είναι η διαμόρφωση αυτών των αλυσιδών. Έχει βρεθεί ότι η οξυμίμο-ομάδα στις ογκώδεις αμινοθειαζωλ-οξυμίμο αλυσίδες είναι αυτή που εμποδίζει την υδρόλυση και μάλιστα όταν έχει διαμόρφωση *syn*-. Όταν αυτή απουσιάζει ή έχει διαμόρφωση *anti*- τα αντίστοιχα υποστρώματα υδρολύονται με σχετικά υψηλούς ρυθμούς από την TEM-2 πενικιλινάση και εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια με το ενεργό κέντρο αυτής (Πίνακας 6; Laurent G. και συν., 1984). Άρα η τοποθέτηση του ηλεκτρικού πεδίου του οξυγόνου που συνδέεται στην ιμίνη είναι ο παράγοντας που εμποδίζει την υδρόλυση και οι μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν παραπάνω πιθανότατα αυξάνουν την συμπληρωματικότητα ως προς την ομάδα αυτή ή επιδρούν στην όποια παρεμπόδιση αυτής επί της καταλυτικής μηχανής.

Οι CTX-M ΕΦΒΛ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ένζυμα των ομάδων TEM και SHV χαρακτηρίζονται από λιγότερο διευρυμένες κοιλότητες στο τμήμα του ενεργού κέντρου που δεσμεύει τις R1 πλευρικές αλυσίδες (Chen, Y. και συν., 2005α, Chen, Y. και συν., 2005β). Παρ' όλα αυτά έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν πολύ αποδοτικά την κεφοταξίμη. Η υδρόλυση της κεφοταξιδίμης από τις CTX-M είναι περιορισμένη ενώ η αζτρεονάμη φαίνεται να αντιδρά περισσότερο αποδοτικά με αυτά. Ο χαρακτήρας

εκτεταμένου φάσματος όπως έχει προκύψει από κρυσταλλογραφικές μελέτες συμπλόκων που φέρουν αναλογίες με τα διάφορα στάδια της αντίδρασης και από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής οφείλεται πιθανώς στην υψηλή ευελιξία του μορίου τους που τους επιτρέπει να προσαρμόζουν το ενεργό κέντρο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης στις διάφορες διαμορφώσεις των υποστρωμάτων (Chen, Y. και συν., 2005α, Chen, Y. και συν., 2005β; Delmas J. και συν., 2007; Delmas J. και συν., 2010). Οι θέσεις 104 και 237 εδώ καταλαμβάνονται από αμινοξέα που ενδέχεται να ευνοούν τη δέσμευση των οξυίμινο πλευρικών αλυσιδών (ασπαραγίνη και σερίνη αντίστοιχα). Αντίθετα η θέση 240 καταλαμβάνεται όπως και στις πενικιλινάσες από αρνητικό κατάλοιπο το οποίο όμως έχει μικρότερη πλευρική αλυσίδα (ασπαραγινικό οξύ έναντι γλουταμικού οξέος στις TEM και SHV). Αντικατάσταση του Asp240 από γλυκίνη έχει βρεθεί ότι αυξάνει την ικανότητα υδρόλυσης έναντι της κεφταζιδίμης. Τα ένζυμα αυτά (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27 και τα παράγωγα τους) συνήθως εμφανίζουν υψηλή ταχύτητα υδρόλυσης και αυξημένη φαινόμενη συγγένεια έναντι της κεφταζιδίμης σε σχέση με τα πατρικά τους (Πίνακας 7). Η υδρόλυση της κεφοταξίμης και της αζτρεονάμης επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό με ταυτόχρονη μείωση του ρυθμού ανακύκλωσης και αύξηση της φαινόμενης συγγένειας με αποτέλεσμα οι αλλαγές στην απόδοση να μην είναι εκτεταμένες (Πίνακας 7). Το ίδιο ισχύει και για τις παλαιότερες κεφαλοσπορίνες και πενικιλίνες. (Bonnet R., 2004) Οι παρατηρούμενες καταλυτικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί στην αύξηση της ευελιξίας της B3 αλυσίδας εξαιτίας της συγκεκριμένης μετάλλαξης όπως προέκυψε από κρυσταλλογραφικές μελέτες των CTX-M-14, CTX-M-9, CTX-M-16 και CTX-M-27 (Chen, Y. και συν., 2005α).

Η υποκατάσταση Pro167Ser στις CTX-M έχει επίσης θεωρηθεί ότι διευρύνει το φάσμα υποστρωμάτων αυξάνοντας την υδρόλυση της κεφταζιδίμης (Poirel και συν., 2001). Εργαστηριακοί κλώνοι *E. coli* που παράγουν τα ένζυμα CTX-M-18 (Pro167) και CTX-M-19 (Ser167) υπό ισογονικές συνθήκες έδειξαν ότι το ένζυμο με σερίνη στη θέση 167 προσδίδει μεγαλύτερη αντοχή στην κεφταζιδίμη σε σχέση με το πατρικό του (64 φορές αύξηση στην MIC) (Poirel και συν., 2001; Kimura S. και συν., 2004). Εκτίμηση

Πίνακας 7: Διεύρυνση φάσματος στις βΛτΑ CTX-M τύπου.**D240G (Poirel L. και συν., 2002)**

β-λακτάμη	CTX-M-3 (Asp240)			CTX-M-15 (Gly240)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	270	2.5	108·10 ⁶	40	10	4·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	2800	96	29·10 ⁶	35	43	0.8·10 ⁶
Κεφοταξίμη	380	113	3,4·10 ⁶	150	54	2,8·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	<0,01	>3000	-	2	1760	10 ³
Κεφεπίμη	0,2	170	1,1·10 ³	10	1075	9·10 ³
Αζτρεονάμη	190	188	10 ⁶	1,5	11	0.13·10 ⁶

D240G (Bonnet R. και συν., 2001)

β-λακτάμη	CTX-M-9 (Asp240)			CTX-M-16 (Gly240)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	295	25	12·10 ⁶	65	6	11·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	3000	150	20·10 ⁶	2800	83	34·10 ⁶
Κεφοταξίμη	450	120	3,8·10 ⁶	1400	150	9·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	2	600	3·10 ³	15	350	4·10 ⁴
Αζτρεονάμη	10	220	5·10 ⁴	3	17	1,8·10 ⁵

D240G (Bonnet R. και συν., 2003)

β-λακτάμη	CTX-M-14 (Asp240)			CTX-M-27 (Gly240)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	290	20	14,5·10 ⁶	11	6	1,8·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	2700	175	15,3·10 ⁶	232	83	2,8·10 ⁶
Κεφοταξίμη	415	130	3,2·10 ⁶	113	150	0,8·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	3	610	5·10 ³	3	330	9·10 ³
Αζτρεονάμη	10	200	5·10 ⁴	0,4	17	2,4·10 ⁴

P167S (A: Kimura S. και συν., 2004; B: Poirel L. και συν., 2001)

β-λακτάμη	CTX-M-18 (Pro167)			CTX-M-19 (Ser167)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
A						
Πενικιλίνη G	37	29	45·10 ⁶	22	25	40·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	1190	51	0.6·10 ⁶	882	55	0.62·10 ⁶
Κεφοταξίμη	74,5	1,7	1,8·10 ³	84,8	58	25·10 ³
Κεφταζιδίμη	ΔΕ	5610	-	ΔΕ	2720	-
B						
Πενικιλίνη G	30	29	10 ⁶	5	15	0,33·10 ⁶
Κεφαλοριδίνη	7	216	3·10 ⁴	30	123	2,4·10 ⁵
Κεφοταξίμη	20	54	4·10 ⁵	30	60	5·10 ⁵
Κεφταζιδίμη	<0,001	-	-	0,2	25	8·10 ³
Κεφεπίμη	20	525	4·10 ⁴	<0,001	-	-
Αζτρεονάμη	2	286	7·10 ³	<0,001	-	-

Πίνακας 8: Ποικιλίες ενζύμων τύπου GES (τροποποιημένος από Smith C. A. και συν., 2007)

Ένζυμο	Κεφταζιδίμη		Ιμιπενέμη		Μεταλλάξεις		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	62	104	170
GES-1	380	2000	0,003	45	Met	Glu	Gly
GES-2	ΔΕ	>3000	0,004	0,45	-	-	Asn
GES-3	23	990	ΔΕ	-	Thr	Lys	-
GES-4	2,5	1500	0,38	4,7	Thr	Lys	Ser
GES-5	0,3	394	1,2	4,2	-	-	Ser
GES-6	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	-	Lys	Ser
GES-7	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	-	Lys	-

των κινητικών σταθερών των παραπάνω ενζύμων από δύο διαφορετικά εργαστήρια δείχνουν ότι ίσως η παραπάνω αύξηση στα επίπεδα αντοχής να μην οφείλεται σε σημαντική αύξηση της υδρόλυσης καθώς η απόδοση της κατάλυσης που προσδιόρισε το ένα εργαστήριο είναι στα επίπεδα των υπόλοιπων CTX-M ενώ το άλλο δεν κατάφερε να μετρήσει υδρόλυση παρά μόνο τη φαινόμενη συγγένεια η οποία ήταν πολύ χαμηλή (Πίνακας 7). Η όποια μικρή αύξηση στην υδρόλυση της κεφταζιδίμης εξαιτίας της Pro167Ser υποκατάστασης δεν μπορεί να οδηγήσει στα επίπεδα αντοχής που προσδιορίστηκαν. Είναι πολύ πιθανό ότι το ένζυμο με σερίνη στην θέση 167 απαντά σε μεγαλύτερες ποσότητες στον περιπλαστικό χώρο λόγω της αποδοτικότερης αναδίπλωσής του. Έχει βρεθεί ότι ο ισομερισμός *trans-cis* του πεπτιδικού δεσμού 166-167 στις βΛτΑ είναι το περιοριστικό στάδιο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών αυτών και αντικατάσταση της προλίνης με σερίνη ενδέχεται να έχει επιπτώσεις στην απόδοση της διαδικασίας και άρα στην έκκριση λειτουργικής πρωτεΐνης (Vanhove M. και συν., 1996).

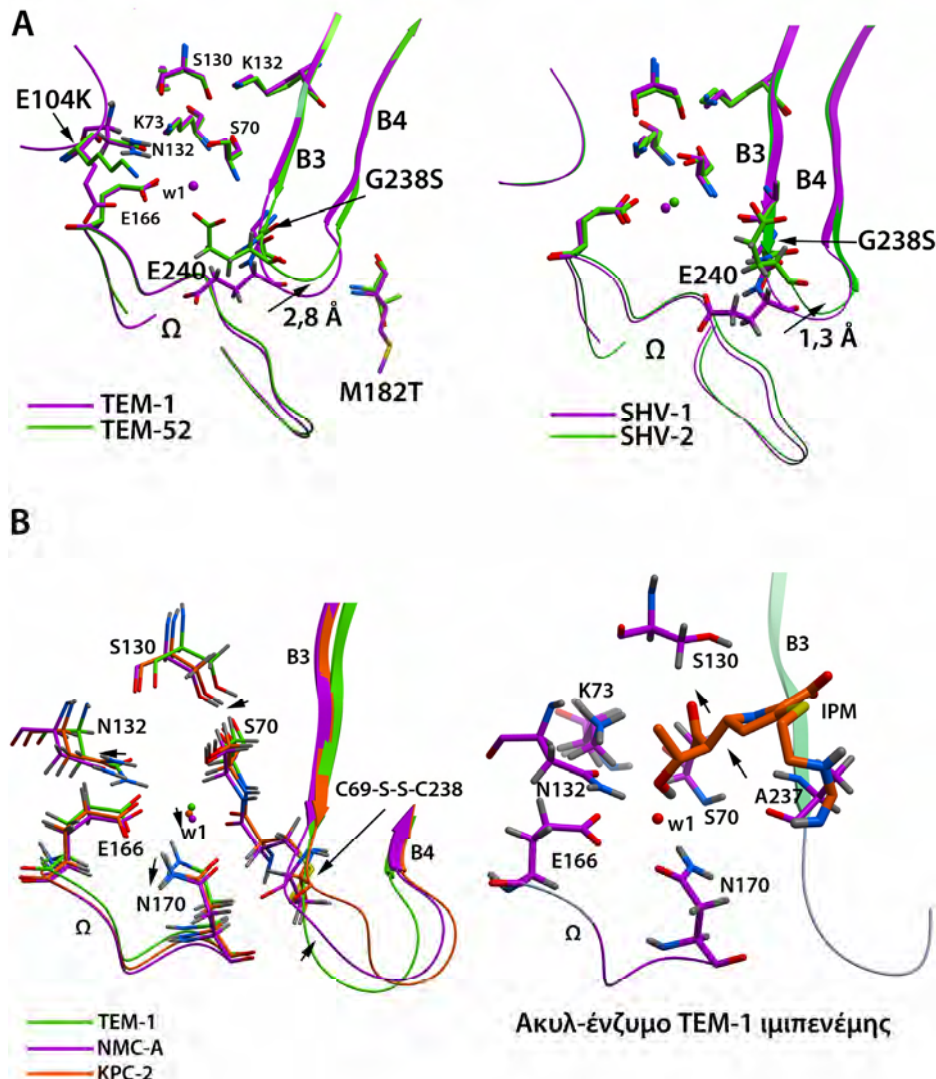
Διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων μέσω μεταλλάξεων παρουσιάζουν και οι ΕΦΒΑ τύπου GES. Υποκαταστάσεις σε δύο θέσεις φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων της κατηγορίας. Η πρώτη είναι η θέση 104 που καταλαμβάνεται είτε από γλουταμικό οξύ είτε από λυσίνη (Mavroidi A. και συν., Wachino J. και συν., 2004) και η δεύτερη είναι η θέση 170 που στα διάφορα ένζυμα της κατηγορίας φέρει γλυκίνη, ασπαραγίνη ή σερίνη (Πίνακας 8) (Smith C. A. και συν., 2007). Η Glu104Lys υποκατάσταση φαίνεται να έχει θετική επίδραση στην υδρόλυση οξυμίμο υποστρωμάτων και σε αυτή την κατηγορία ενζύμων αν και δεν έχουν μετρηθεί οι κινητικές σταθερές για όλα τα ένζυμα που έχουν προκύψει από τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Οι υποκαταστάσεις Gly170Asn και Gly170Ser σχετίζονται με αυξημένη ικανότητα για υδρόλυση ιμιπενέμης με τα ένζυμα που φέρουν σερίνη να υδρολύουν πιο αποδοτικά την καρβαπενέμη αυτή (Poirel L. και συν., 2001; Vourli S. και συν., 2004; Bae I. K. και συν., 2007). Τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 παράλληλα απενεργοποιούν και τις κεφαμυκίνες (Wachino J. και συν., 2004; Bae I. K. και συν., 2007). Αυτή η κατηγορία ενζύμων δεν έχει μελετηθεί αρκετά αν και θα μπορούσε να αποκαλύψει αρκετές πτυχές της λειτουργίας των βΛτΑ ως προς την υδρόλυση κεφαλοσπορινών νέας γενεάς και καρβαπενεμών. Τα ένζυμα τύπου GES είναι τα μοναδικά πέρα από αυτά της ομάδας TEM που εμφανίζεται η Glu104Lys μετάλλαξη και

η μελέτη των δομικών και λειτουργικών αλλαγών που προκαλούνται από αυτή σε πολύ διαφορετικό υπόβαθρο πρωτοταγούς δομής ίσως αποκαλύψει τον ακριβή μηχανισμό που οδηγεί στη διεύρυνση του φάσματος. Επιπλέον τα ένζυμα αυτά είναι τα μοναδικά της κατηγορίας που μέσω μεταλλάξεων μπορούν να υδρολύσουν καρβαπενέμες και κεφαμυκίνες και άρα μπορούν να αποκαλύψουν ποια είναι τα δομικά εκείνα στοιχεία που ευθύνονται για τις υψηλές ενεργότητες που εμφανίζουν οι καρβαπενεμάσες τάξης A έναντι των αντιβιοτικών αυτών.

Οι βΛτΑ με φυσική ικανότητα υδρόλυσης καρβαπενεμών ομαδοποιούνται σε μία κοινή φυλογενετική γραμμή εντός της ευρύτερης ομάδας ΕΦΒΛ με την οποία είναι συγγενικές. Η ομολογία αυτή εντός της λειτουργικής ομάδας των καρβαπενεμασών δεν έχει ακόμα αποκαλύψει ποια είναι τα αμινοξέα εκείνα που απαντούν σε αυτές και απουσιάζουν από τις υπόλοιπες βΛτΑ και σχετίζονται με την υψηλή υδρόλυση καρβαπενεμών. Η κυστεΐνη στη θέση 238 και η γέφυρα θείου που σχηματίζει με την αντίστοιχη της θέσης 69 είναι ένα δομικό στοιχείο που εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με τη λειτουργία των ενζύμων αυτών (Swaren P. και συν., 1999; Sougakoff W. και συν., 2002; Ke W. και συν., 2007; Petrella S. και συν., 2008; Fonseca F. και συν., 2012). Το γεγονός ότι η γέφυρα C69-C238 απαντά και στα ένζυμα τύπου GES που επίσης μπορούν μέσω υποκαταστάσεων να υδρολύσουν καρβαπενέμες ενισχύει αυτή την υπόθεση (Smith C. A. και συν., 2007). Όμως εντοπίζεται και σε άλλα ένζυμα όπως οι BEL ΕΦΒΛ που δεν έχουν την ικανότητα υδρόλυσης καρβαπενεμών (Εικόνα 21). Διάρρηξη της γέφυρας αυτής μέσω μεταλλαξογένεσης στις θέσεις 69 και 238 στη SME-1 καρβαπενεμάση έδειξε ότι μειώνει την ικανότητα υδρόλυσης για όλα τα β-λακταμικά και όχι ειδικά αυτή των καρβαπενεμών (Majiduddin F. K. και Palzkill T., 2003). Το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο έχει πιθανότητα σταθεροποιητικό ρόλο στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης η οποία κατά τα φαινόμενα εμφανίζει αυξημένη αστάθεια. Η μετάλλαξη Gly238Cys βρέθηκε και σε ένα ένζυμο τύπου CTX-M (CTX-M-71) αλλά η υδρόλυση των καρβαπενεμών δεν επηρεάστηκε σε σχέση με το πατρικό ένζυμο (Schneider I. και συν., 2009). Σάρωση της πρωτοταγούς δομής της SME-1 μέσω τεχνικής τυχαίας μεταλλαξογένεσης θέσης δεν αποκάλυψε κάποιο αμινοξύ που να έχει σημαντική επίδραση ειδικά στην υδρόλυση καρβαπενεμών (Majiduddin F. K. και Palzkill T., 2005). Τα παραπάνω δηλώνουν ότι συνδυασμός συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων ή τμημάτων της πρωτεΐνης

ευθύνονται για τη λειτουργία καρβαπενεμάσης στα συγκεκριμένα ένζυμα (Queenan A. M. και Bush K., 2007).

Οι διαφορές στην τριτοταγή δομή των καρβαπενεμασών τάξης A με τις βΛτΑ που δεν υδρολύουν καρβαπενέμες, όσον αφορά το ενεργό κέντρο, συνίστανται κυρίως στη μετατόπιση της πλευρικής αλυσίδας της Asn132 ώστε να τοποθετείται περισσότερο απομακρυσμένα από το ενεργό κέντρο καθώς και σε αλλαγές στις θέσεις των πλευρικών αλυσίδων των Ser130 και Glu166 όπως και του υδρολυτικού νερού w1 (Εικόνα 24B; Ke W. και συν., 2007). Το τμήμα που συνδέει τις B3 και B4 είναι μετατοπισμένο αρκετά στις καρβαπενεμάσες σε σχέση με τις υπόλοιπες βΛτΑ (Εικόνα 24B). Το πώς όμως αυτές οι αλλαγές επιτρέπουν την υδρόλυση του ακυλ-ενζύμου των καρβαπενεμών δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της TEM-1 ακυλιωμένης από μιπενέμη έχουν δείξει ότι το υδροξύλιο της 6α-(1R)-ύδροξυ-αιθύλ υποκατάστασης δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το υδρολυτικό νερό (w1) και με την πλευρική αλυσίδα της Asn132 (Εικόνα 24B; Maveyraud L. και συν., 1998). Η ακυλομάδα του εστερικού δεσμού μεταξύ Ser70 και μιπενέμης στη δομή αυτή βρίσκεται τοποθετημένη εκτός της οπής οξυανιόντος και άρα είναι αδύνατο να προχωρήσει η απακλίωση (Εικόνα 24B; Maveyraud L. και συν., 1998). Η κρυσταλλογραφική δομή της SHV-1 με την μεροπενέμη αποκάλυψε ότι και σε αυτή την περίπτωση η ακυλομάδα του εστερικού δεσμού τοποθετείται εκτός της οπής αλλά ταυτόχρονα ανιχνεύεται και πληθυσμός συμπλόκων όπου εντοπίζεται εντός (Nukaga M. και συν., 2008). Η παραπάνω μελέτη συνδυάστηκε και με φασματοσκοπία Raman και αποκαλύφθηκε ότι η διαμόρφωση στην οποία η ακυλομάδα βρίσκεται εκτός της οπής οξυανιόντος δεν υδρολύεται και ότι αντιστοιχεί στο ισομερές του ακυλενζύμου που περιέχει δακτύλιο Δ^1 -πυρρολίνης ενώ αυτή στην οποία βρίσκεται εντός υδρολύεται και αντιστοιχεί στη ρίζα ακυλενζύμου με δακτύλιο Δ^2 -πυρρολίνης (Kalp M. και Carey P. R., 2008). Κατά την αλληλεπίδραση της SHV-1 με μεροπενέμη σε διάλυμα η διαμόρφωση Δ^1 -πυρρολίνης είναι η κύρια ρίζα ακυλενζύμου ενώ στον κρύσταλλο εξαιτίας της μειωμένης ταχύτητας της αντίδρασης ισομερισμού που ακολουθεί την πρωτονίωση του αζώτου έπειτα από την ακλίωση απαντούν και οι δύο (Kalp M. και Carey P. R., 2008). Στην κρυσταλλογραφική αυτή δομή εντοπίστηκε και ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα του Glu166 που την καθιστά ανενεργή (Nukaga M. και συν., 2008).



Εικόνα 24: Α) Αριστερά. Σύγκριση των τριτοταγών δομών της TEM-1 (PDB ID: 1M40) και TEM-52 (PDB ID: 1HTZ) ΕΦΒΛ η οποία φέρει τις μεταλλάξεις Glu104Lys, Gly238Ser και Met182Thr. Σε σχέση με το πατρικό ένζυμο η ΕΦΒΛ χαρακτηρίζεται από διαφορετική τοποθέτηση του Glu240 λόγω μετατόπισης του B3 β-φύλλου και τις στροφές που ενώνει τα B3 B4 πιθανώς υπό την δράση της Gly238Ser υποκατάστασης. Η ίδια μετατόπιση παρατηρείται από την συγκεκριμένη μετάλλαξη στην SHV-1 που δίνει την SHV-2 (δεξιά, PDB IDs 1SHV και 1N9B αντίστοιχα). Η αντικατάσταση Glu104Lys στην TEM-52 τοποθετεί την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου όπου μπορεί να αλληλεπιδράσει με αρνητικές ομάδες των δεσμευμένων β-λακταμικών ενώ παράλληλα τροποποιεί τη θέση της Asn132. Β) Αριστερά. Σύγκριση των αποενζύμων της TEM-1 και των καρβαπενεμασών τάξης A KPC-2 (PDB ID: 3C5A) και NMC-A (PDB ID: 1BUE). Τα βέλη δηλώνουν τις κύριες διαφορές που παρατηρούνται στις καρβαπενεμάσες ως προς τη θέση σημαντικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου. Παρατηρείται η αλλαγή της θέσης της στροφής μεταξύ B3-B4 στις καρβαπενεμάσες η οποία πιθανώς προκαλείται από τη γέφυρα θείου Cys69-S-S-Cys238 που απαντά σε αυτές. Τα ένζυμα τύπου GES που επίσης φέρουν την αντίστοιχη γέφυρα θείου δεν εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά στο σημείο αυτό. Δεξιά. Δομή του ακυλενζύμου της TEM-1 με την ιμπενεύμη (PDB ID: 1BT5). Το υδροξύλιο της βα-ύδροξυαιθύλ υποκατάστασης αλληλεπιδρά με το υδρολυτικό νερό w1 και με την Asn132. Το καρβονύλιο του εστερικού δεσμού εντοπίζεται εκτός της σπής οξυανιόντος. Φασματοσκοπία Raman στο σύμπλοκο SHV-1 με τη μεροπενέμη έδειξε ότι οι ρίζες που παρουσιάζουν αυτή την συμπεριφορά και δεν υδρολύονται αντιστοιχούν στη Δ¹-πυρρολίνη.

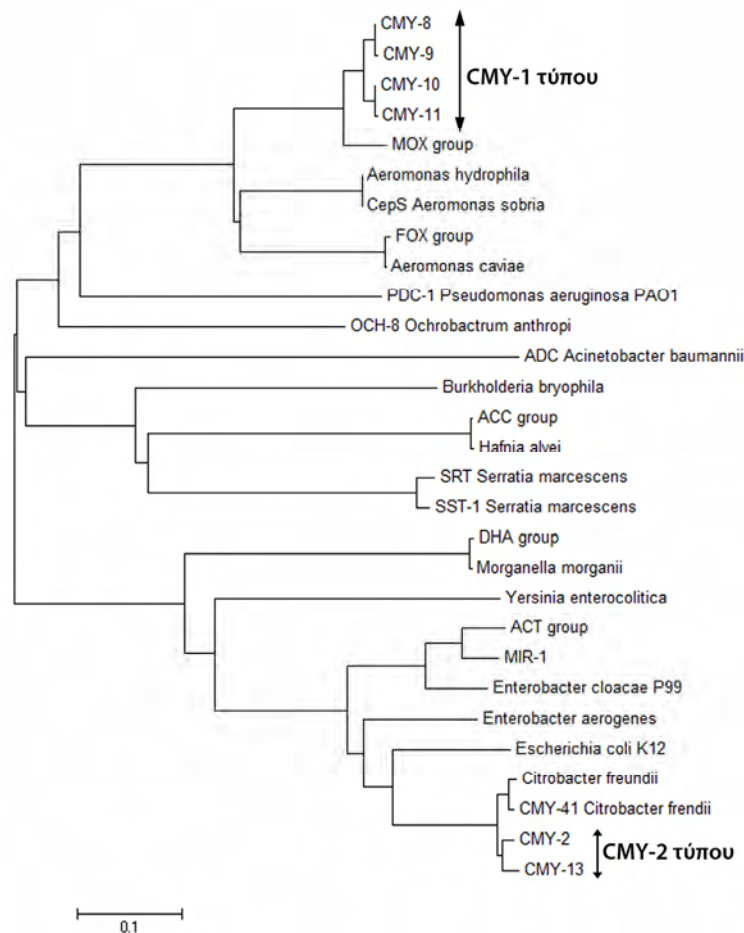
Πιθανώς δηλαδή το υδροξύλιο της βα υποκατάστασης να παρεμποδίζει την απακυλίωση αποδίδοντας ένα επιπλέον υδρογόνο στο σύστημα Glu166-w1. Στις καρβαπενεμάσες τάξης A θεωρείται ότι το υδροξύλιο αυτό έχει μεγαλύτερους βαθμούς ελευθερίας λόγω της μετατόπισης της Asn132 (Fonseca F. και συν., 2012) αν και αυτό δεν έχει αποδειχθεί πειραματικά. Η λειτουργία των καρβαπενεμασών τάξης A εξακολουθεί να είναι αινιγματική. Τα όσα αποτελέσματα έχουν συσσωρευθεί ως τώρα δείχνουν ότι η δυναμική του ενζύμου στο σύνολό του είναι αυτή που προσδίδει τις παρατηρούμενες καταλυτικές ιδιότητες και όχι κάποια συγκεκριμένη θέση και αυτό πιθανώς ισχύει για όλα τα ένζυμα τάξης A τα οποία κατά τη διάρκεια της κατάλυσης τροποποιούν την διαμόρφωσή τους ώστε να αφομοιώσουν τις αλλαγές που υφίστανται τα δεσμευμένα υποστρώματα.

Γ. β-λακταμάσες μοριακής τάξης C

i. Τύποι, γενετική εντόπιση και κινητοποίηση

Οι β-λακταμάσες τάξης C αρχικά ανακαλύφθηκαν κατά τα πειράματα χαρακτηρισμού γενετικών τόπων στο χρωμόσωμα του *E. coli* που προσδίδουν αντοχή στην αμπικιλίνη. Από τους τρεις ευαίσθητους μεταλλάκτες που αναγνωρίστηκαν (ampA, ampB και ampC) ο ampC δεν παρήγαγε β-λακταμάση και ο αντίστοιχος γενετικός τόπος ταυτοποιήθηκε ως το γονίδιο αυτής (Burman L. G. και συν., 1973). Έτσι τα συγκεκριμένα ένζυμα έχει καθιερωθεί να αποκαλούνται και AmpC. Τα αντίστοιχα γονίδια απαντούν φυσικά στα χρωμοσώματα κυρίως Gram αρνητικών του υπερφύλου των Πρωτεοβακτηρίων (Jacoby G. A., 2009) ενώ σπάνια έχουν αναφερθεί και σε Gram θετικά που ανήκουν στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων (π.χ. *Mycobacterium smegmatis*; Flores A. R. και συν., 2005). Η ομολογία που έχουν διάφορα χρωμοσωμικά γονίδια με αυτά των AmpC δεν είναι αρκετή για τα χαρακτηρίσει ως γονίδια β-λακταμάσης καθώς όπως αναφέρθηκε τα συγκεκριμένα ένζυμα εμφανίζουν υψηλό βαθμό συγγένειας με τις LMMB πενικιλινοδεσμευτικές και απαιτείται λειτουργικός χαρακτηρισμός. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της PBP AmpH του *E. coli* (Henderson T. A. και συν., 1997).

Κλινικά σημαντικά βακτήρια που φέρουν χρωμοσωμικά γονίδια βΛατC είναι τα *E. coli* και συνήθως τα συγγενικά τους *Shigellae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *C. brakii*, *Morganella morgannii*, *S. marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa* και *A. baumannii* (Πίνακας 1). Αρκετά εντεροβακτηριακά δε φέρουν χρωμοσωμικό γονίδιο *ampC* μεταξύ των οποίων και τα *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* και *Salmonella* sp. και κάποια είδη *Citrobacter* (Jacoby G. A., 2009). Ωστόσο η μετακίνηση των χρωμοσωμικών γονιδίων των *Aeromonas* spp. (ένζυμα τύπου CMY-1, FOX-1 και MOX-1), στελεχών *Enterobacter* (ACT-1 και MIR-1), *Hafnia alvei* (ACC-1), *M. morgannii* (DHA-1) και *C. freundii* (τύπου CMY-2) σε πλασμίδια οδήγησε σε διασπορά τους και στα παραπάνω βακτηριακά στελέχη αλλά και σε στελέχη που έφεραν ήδη χρωμοσωμικό γονίδιο (π.χ. *E. coli* και *Enterobacter* sp.) (Philippon A. και συν., 2002).



Εικόνα 25: Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πλασμιδιακών β-λακταμασών τάξης C (τύποι CMY-1, MOX, FOX, ACC, DHA, ACR, MIR και CMY-2) και κάποιων χρωμοσωμικών. Διακρίνεται η προέλευση των επίκτητων *AmpC* από τα χρωμοσώματα συγκεκριμένων Gram αρνητικών οργανισμών.

Η κλινική σημασία των β-λακταμασών τάξης C αρχικά αφορούσε την αντοχή σε β-λακταμικά που οφείλονταν στην υπερπαραγωγή των ενζύμων από νοσοκομειακά στελέχη λόγω υπερέκφρασης του αντίστοιχου χρωμοσωμικού γονιδίου τους (Chow J. W. και συν., 1991). Η αύξηση της έκφρασης στα παραπάνω στελέχη επιτυγχάνεται είτε μέσω επαγωγής παρουσία συγκεκριμένων β-λακταμικών αντιβιοτικών είτε μέσω απορύθμισης του συστήματος επαγωγής λόγω μεταλλάξεων ώστε η μεταγραφή να είναι συνεχόμενη και σε υψηλά επίπεδα αλλά και μέσω μεταλλαγών στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων όταν απουσιάζει το σύστημα επαγωγής (Jacoby G. A., 2009). Η έκφραση των χρωμοσωμικών γονιδίων βΛτC στα περισσότερα Gram αρνητικά ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα AmpR με χαρακτηριστικές εξαιρέσεις τα *E. coli*, *A. baumannii* και *Aeromonas* spp. μεταξύ άλλων. Η επαγωγή που προκαλούν διάφορα β-λακταμικά στο παραπάνω σύστημα (αναφέρθηκε ακροθιγώς στην ενότητα 3.B.ii) έχει μελετηθεί ενδελεχώς όσον αφορά την έκφραση των *ampC* αλλά συγκεκριμένα ερωτήματα παραμένουν. Το γονίδιο *ampR* εντοπίζεται δίπλα στο *ampC* και σε αντίθετη κατεύθυνση με τους υποκινητές τους να επικαλύπτονται. Απουσία β-λακταμικών τα UDP-MurNAc-πενταπεπτίδια (έχει προταθεί επίσης ότι αυτή την δράση έχει το λιπίδιο II) που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα κατά τα πρόδρομα στάδια βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης δεσμεύονται στον AmpR ο οποίος καταστέλλει τη μεταγραφή του *ampC*. Παρουσία β-λακταμικών αντιβιοτικών η αναστολή συγκεκριμένων PBPs έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση στο κυτταρόπλασμα διαφόρων ενδιάμεσων συστατικών της πεπτιδογλυκάνης που παράγονται από τις υδρολάσες μουρεΐνης κατά τη φυσιολογική ανακύκλωση του τοιχώματος. Η δομική μονάδα της πεπτιδογλυκάνης GlcNAc-MurNAc-πενταπεπτίδιο επανεισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από τον περιπλασμικό χώρο μέσω της δράσης της περμεάσης AmpG. Η γλυκοζιδάση NagZ υδρολύει τον δεσμό μεταξύ GlcNAc-MurNAc και τα παραγόμενα MurNAc-πενταπεπτίδια ανταγωνίζονται τα αντίστοιχα φορτισμένα με UDP ως προς την πρόσδεση στον AmpR (έχει προταθεί επίσης ότι αυτό συμβαίνει από MurNAc-τριπεπτίδια). Η δέσμευση των MurNAc-πενταπεπτιδίων θεωρείται ότι προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του AmpR που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής του AmpC. (Jacobs C. και συν., 1994; Hanson N. D. και Sanders C. C., 1999; Jacoby G. A., 2009; Johnson J. W. και συν., 2013)

Απορύθμιση του παραπάνω συστήματος και συνεχής παραγωγή των μεταγράφων απουσία β-λακταμικών λόγω μεταλλάξεων στον AmpR έχουν αναφερθεί σπάνια (Hanson N. D. και Sanders C. C., 1999; Kuga A. και συν., 2000). Περισσότερο συχνές είναι μεταλλάξεις στη κυτταροπλασματική αμιδάση του δεσμού MurNAc-L-Ala (AmpD) η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες διατηρεί τα MurNAc-πενταπεπτίδια που παράγονται από την συνεχή ανακύκλωση της μουρείνης σε χαμηλά επίπεδα (Schmidtke A. J. και Hanson N. D., 2006). Μειωμένη λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του ενεργοποιητή της έκφρασης του ampC ακόμα και απουσία β-λακταμικών. Σπάνιες είναι επίσης οι μεταλλάξεις στην περμεάση AmpG οι οποίες οδηγούν σε συνεχή έκφραση των ampC (Jacoby G. A., 2009). Η *P. aeruginosa* έχει τρία γονίδια ampD και η αντοχή που οφείλεται στην υπερέκφραση του γονιδίου της βΛτC συνήθως αναπτύσσεται σταδιακά (Juan C. και συν., 2006). Στο βακτήριο αυτό ο AmpR ελέγχει την έκφραση και άλλων γονιδίων, όπως του ampE το οποίο κωδικοποιεί για μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος και εμπλέκεται στη έκφραση του ampC ως συστατικό του οπερονίου ampDE (Juan C. και συν., 2005). Άλλοι τόποι φαίνεται ότι εμπλέκονται επίσης στην υπερπαραγωγή της AmpC στην *P. aeruginosa* όπως το σύστημα creBCD και το γονίδιο dacB το οποίο κωδικοποιεί για μία PBP μη απαραίτητη για την επιβίωση του βακτηρίου (Jacoby G. A., 2009).

Δεν έχουν όλα τα β-λακταμικά την ίδια δυνατότητα για επαγωγή των χρωμοσωμικών βΛτC. Η πενικιλίνη G, η αμπικιλίνη, η αμοξικιλίνη και κάποιες κεφαλοσπορίνες όπως η κεφαλοθίνη και η κεφαζολίνη είναι ισχυροί επαγωγείς ενώ εξαιτίας της αυξημένης υδρόλυσής τους από τα ένζυμα αυτά τα στελέχη με επαγωγίμη AmpC είναι ανθεκτικά στα παραπάνω αντιβιοτικά. Ισχυροί επαγωγείς είναι επίσης η κεφοξίτινη και η ιμιπενέμη αλλά τα β-λακταμικά αυτά είναι περισσότερο ανθεκτικά σε υδρόλυση. Αντιβιοτικά όπως η πιπερακιλλίνη, κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφαζιδίμη, η κεφεπίμη, κεφουροξίμη και η αζτρεονάμη δεν ασκούν επαγωγική δράση και αντοχή εμφανίζεται μόνο όταν τα ένζυμα υπερπαραγονται λόγω απορύθμισης του συστήματος. (Livermore D. M., 1987; Livermore D. M. και Yang Y. J., 1987; Jacoby G. A., 2009) Το κλαβουλανικό οξύ είναι επίσης ισχυρός επαγωγέας και αυτό μπορεί να προκαλέσει την απώλεια αντιψευδομοναδικής δράσης της τικαρκιλλίνης στον αντίστοιχο συνδυασμό με τον αναστολέα αυτό (Lister P. D. και συν., 1999).

Η έκφραση των *ampC* στα βακτήρια του γένους *Aeromonas* sp. ρυθμίζεται επίσης σε μεταγραφικό επίπεδο αλλά από το σύστημα δύο συστατικών BrlAB με τη BrlB να είναι η κινάση ιστιδίνης χωρίς όμως να έχει βρεθεί ακόμα το σήμα που αυτή αναγνωρίζει και προκαλεί την επαγωγή (Alksne L. E. και Rasmussen B. A., 1997). Ομόλογο σύστημα έχει βρεθεί και στο *E. coli* και έχει υποτεθεί ότι έχει παρόμοιο ρόλο και σε αυτό το βακτήριο (Hirakawa H. και συν., 2003). Η έκφραση του χρωμοσωμικού γονιδίου της βΛτC στο *E. coli* ρυθμίζεται από αλληλουχίες υποκινητή και εξασθενηστή της μεταγραφής και μεταλλάξεις εντός αυτής της περιοχής ενδέχεται να οδηγήσουν σε υπερπαραγωγή μεταγράφων και στην εμφάνιση αντοχής (Caroff N. και συν., 1999). Υπερέκφραση της χρωμοσωμικής β-λακταμάσης τάξης C στο *A. baumannii* διαμεσολαβείται από την είσοδο ανωμερώς του αντίστοιχου γονιδίου του μεταθετού στοιχείου IS*AbaI* το οποίο παρέχει ισχυρούς υποκινητές (Corvec S. και συν., 2003).

Η μετακίνηση χρωμοσωμικών γονιδίων βΛτC σε πλασμίδια έλαβε χώρα μέσω μετάθεσης από τις αλληλουχίες εισδοχής IS*CR1*, IS*Ecp1* και από σύνθετα τρανσποζόνια τύπου I με IS26 στα άκρα τους (Philippon A. και συν., 2002). Τα γονίδια των ενζύμων τύπου CMY-1 (CMY-1, CMY-8, CMY-9, CMY-10, CMY-11 και CMY-19) συνδέονται με την τρανσποζάση ORF513 και συνήθως εντοπίζονται σε σύνθετα ιντεγκρόνια τύπου I (Toleman M. A. και συν., 2006; Wachino J. και συν., 2006; Jacoby G. A., 2009). Σε παρόμοιες δομές ή θραύσματα αυτών εντοπίζονται και τα γονίδια των MOX (9 ποικιλίες) και των FOX (12 ποικιλίες) β-λακταμασών (Queenan A. M. και συν., 2001; Raskine L. και συν., 2002). Με το παραπάνω γενετικό στοιχείο συνδέονται και τα γονίδια τύπου *bla*_{DHA} (22 ποικιλίες) τα οποία μετακινήθηκαν από το χρωμόσωμα της *M. morgani* μαζί με το γονίδιο του AmpR και η έκφρασή τους εξακολουθεί να είναι επαγωγίμη (Barnaud G. και συν., 1998; Fortineau N. και συν., 2001; Toleman M. A. και συν., 2006; Lee C. H. και συν., 2011). Τα γονίδια των β-λακταμασών τύπου ACT-1 (34 ποικιλίες) επίσης μετακινήθηκαν από το χρωμόσωμα του προγονικού τους *Enterobacter* με το γονίδιο *ampR* ενώ και σε αυτή την περίπτωση το σύστημα επαγωγής εξακολουθεί να είναι λειτουργικό και επί του πλασμιδίου (Reisbig M. D. και Hanson N. D., 2002). Αντίθετα τα συγγενικά τους ένζυμα MIR (15 ποικιλίες) όταν εντοπίζονται σε πλασμίδια δεν γειτνιάζουν με το γονίδιο του AmpR αλλά η έκφρασή τους είναι συνεχής και σε υψηλά επίπεδα λόγω της δράσης υβριδικού υποκινητή (Reisbig M. D. και Hanson N. D., 2004).

Η μετακίνηση των γονιδίων τύπου ACC-1 (6 ποικιλίες) από το χρωμόσωμα στελέχους *H. alvei* έγινε πιθανότατα με μετάθεση ενός άκρου από το *ISEcp1* χωρίς επίσης να μετακινηθεί το γονίδιο *ampR* (Partridge S. R., 2007; Paragiannitsis C. C. και συν., 2011). Το παραπάνω γενετικό στοιχείο ευθύνεται κυρίως και για τη μετακίνηση των γονιδίων τύπου CMY-2 (120 ποικιλίες) από τα χρωμοσώματα στελεχών *C. freundii* μαζί με τα γονίδια *blc* (βακτηριακή λιποκαλίνη) και *sugE* (γονίδιο που προσδίδει αντοχή σε μικρά μόρια με τεταρτοταγές αμμώνιο) αλλά όχι με το γονίδιο του AmpR (Giles W. P. και συν., 2004; Jacoby G. A., 2009). Εξαιρεση αποτελούν δύο περιπτώσεις (CFE-1 και CMY-13) όπου τα χρωμοσωμικά γονίδια *C. freundii* μεταφέρθηκαν μέσω σύνθετων τρανσποζονίων που δομούνται από άκρα IS26 σε πλασμίδια μαζί με το *ampR* και τμήμα του οπερονίου μεταβολισμού του φουμαρικού οξέος (Nakano R. και συν., 2004; Miriagou V. και συν., 2004). Στην περίπτωση του *bla_{CMY-13}* η έκφρασή εξακολουθούσε να επάγεται από β-λακταμικά ενώ στην περίπτωση του *bla_{CFE-1}* το σύστημα επαγωγής δεν λειτουργούσε.

Τα παραπάνω γονίδια έχουν διασπαρεί σε εντεροβακτηριακά στελέχη κυρίως *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* και *S. enterica*. Οι πλασμιδιακές β-λακταμάσες τάξης C με τη μεγαλύτερη εξάπλωση είναι αυτές του CMY-2 τύπου (Jacoby G. A., 2009). Ο έλεγχος της έκφρασής τους από τον ισχυρό υποκινητή που παρέχεται από το *ISEcp1* οδηγεί σε υπερέκφρασή τους και υπεραγωγή των ενζύμων στον περιπλασμικό χώρο (Hossain A. και συν., 2004). Το παραπάνω γενετικό στοιχείο όπως και στα *bla_{CTX-M}* έχει συντελέσει στην εκτεταμένη διασπορά σε βακτηριακά στελέχη τόσο σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα όσο και σε άλλα ενδιαίτηματα με αποτέλεσμα η απομόνωσή βακτηρίων (κυρίως *E. coli* που προκαλούν ουρολοιμώξεις) από ασθενείς της κοινότητας και από ζώα να είναι αυξημένη (Wu T. L. και συν., 2007; Guo Y. F. και συν., 2014; Accogli M. και συν., 2013). Στην διασπορά των β-λακταμασών CMY-2 τύπου έχει συντελέσει και η μεταφορά τους σε πλασμίδια τύπου IncA/C τα οποία χαρακτηρίζονται από διευρυμένο φάσμα ξενιστών (Doublet B. και συν., 2012; Fernandez-Alarcon C. και συν., 2011; Carattoli A. και συν., 2012). Εντοπίζονται επίσης σε πλασμίδια τύπου IncI (Antunes P. και συν., 2010) και σε μη μεταφερόμενα μικρά πλασμίδια των εντεροβακτηριακών τύπου Col1E (Zioga A. και συν., 2009). Σε στέλεχη *P. mirabilis* οι γενετικοί τόποι που εκφράζουν τα *bla_{CMY-2}* έχουν ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του βακτηρίου (D'Andrea M. M. και συν., 2011). Θεωρείται ότι η μεταφορά των γονιδίων από τα *C. freundii* σε

πλασμίδια έγινε με δύο ανεξάρτητα γεγονότα μετάθεσης καθώς διακρίνονται δύο τύποι δομών που διαφέρουν ως προς την απόσταση του πρώτου κωδικονίου του γονιδίου της β-λακταμάσης και της αλληλουχίας IRR του *ISEcp1*. Στην πρώτη δομή η απόσταση αυτή είναι 116 bp και στη δεύτερη η οποία ως τώρα έχει βρεθεί σε χρωμοσώματα *P. mirabilis* και σε Col1E πλασμίδια είναι 110 bp (D'Andrea M. M. και συν., 2011). Από τις 120 ποικιλίες που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων της κλινικής Lahey αρκετές δεν έχουν πλασμιδιακή εντόπιση αλλά αντιστοιχούν σε χρωμοσωμικά γονίδια *C. freundii* τα οποία εσφαλμένα έχουν ονομαστεί CMY (τα πραγματικά πλασμιδιακά ένζυμα είναι περίπου 60). Η διαφοροποίηση της αμινοξικής αλληλουχίας εντός των πλασμιδιακών ενζύμων CMY-2 τύπου δεν είναι τόσο εκτεταμένη αλλά ορισμένες θέσεις φαίνεται να έχουν την τάση να συσσωρεύουν μεταλλάξεις (Εικόνα 26) η επίδραση των οποίων στην ενζυμική ενεργότητα εκτός ελάχιστων περιπτώσεων δεν έχει μελετηθεί καθώς η υπερπαραγωγή τους δεν επιτρέπει την εύκολη ανίχνευση ενδεχόμενων φαινοτυπικών αλλαγών.

ii. Βιοχημικές ιδιότητες και φαινότυποι

Οι AmpC υδρολύουν αποτελεσματικά τις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς εμφανίζοντας υψηλούς ρυθμούς κύκλων κατάλυσης και σχετικά υψηλή φαινόμενη συγγένεια (Πίνακας 9). Οι καταλυτικές αποδόσεις τους έναντι αυτών των αντιβιοτικών πλησιάζουν το όριο της διάχυσης και έχει βρεθεί ότι πράγματι η ταχύτητα υδρόλυσης εξαρτάται από τον ρυθμό παροχής τους από το διάλυμα και όχι από κάποιο καταλυτικό στάδιο (Bulychev A. και Mobashery S., 1999). Υψηλές υδρολυτικές ενεργότητες παρατηρούνται και έναντι των πενικιλινών αλλά τώρα η σταθερά k_{cat} είναι μικρότερου μεγέθους ενώ η αλληλεπίδρασή με τα υποστρώματα αυτά χαρακτηρίζεται επίσης από χαμηλότερες τιμές K_m (Πίνακας 9). Εξαιτίας της προτίμησης που δείχνουν τα ένζυμα αυτά ως προς την υδρόλυση κεφαλοσπορινών πρώτης γενεάς και κάποιων δεύτερης έχει καθιερωθεί να ονομάζονται και κεφαλοσπορινάσες. Τα περισσότερα ένζυμα (εκτός από τα ACC τύπου) εμφανίζουν ικανότητα απενεργοποίησης των κεφαμυκινών η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλές ταχύτητες υδρόλυσης και υψηλή φαινόμενη συγγένεια (τα ένζυμα CMY πήραν την ονομασία τους από αυτή την ιδιότητα-κεφαμυκινάσες).

Πίνακας 9: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης β-λακταμικών υποστρωμάτων από β-λακταμάσες τάξης C. (Bauvois C. και συν., 2007)

β/ΛτΑ	Πενικιλίνη G			Κεφαλοθίνη			Κεφοταξίμη			Κεφαζιδίμη			Κεφεπίμη			Αζτρεονάμη			Κεφοξιτίνη			Ιμιπενέμη		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m^a (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
CMY-2	14	0,4	35·10 ⁶	160	2,1	76·10 ⁶	0,004	0,0012	3,3·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	<0,006	<0,003 ^β	-	0,23	0,07	3,3·10 ⁶	0,033	ΔΕ	-
AmpC^{C. freundii}	31	0,4	75·10 ⁶	210	13	16·10 ⁶	0,016	0,006	3,4·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	3·10 ⁻⁴	0,0014	-	0,32	0,026	1,3·10 ⁶	0,017	ΔΕ	-
CMY-1	14	0,4	35·10 ⁶	480	30	16·10 ⁶	0,01	0,015	0,7·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	<0,008	<0,02	-	0,05	0,055	0,9·10 ⁶	0,0012	ΔΕ	-
CAV-1^{A. cavai}	5	8,7	0,6·10 ⁶	540	500	1,1·10 ⁶	0,2	0,1	2·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	0,5	0,4	1,3·10 ⁶	ΔΕ	-	-
ACT-1	55	2,1	26·10 ⁶	460	38	12·10 ⁶	0,05	0,07	0,7·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	0,0021	0,012	-	0,37	0,5	0,7·10 ⁶	0,011	0,38	3·10 ⁴
MIR-1	14	0,4	35·10 ⁶	160	2,1	76·10 ⁶	2,7	4	0,7·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	0,0016	0,008	-	0,64	0,75	0,9·10 ⁶	0,012	0,14	9·10 ⁴
p99^{E. cloacae}	55	2,1	26·10 ⁶	200	9	22·10 ⁶	0,015	0,01	1,5·10 ⁶	ΔΕ	-	-	ΔΕ	-	-	2·10 ⁻⁴	0,0012	-	0,06	0,024	2,5·10 ⁶	0,002	ΔΕ	-

^a Για $K_m < 10$ μM οι αντίστοιχες τιμές έχουν μετρηθεί ως σταθερές αναστολής

Πίνακας 10: Φαινότυποι ευαισθησίας στελεχών *E. coli* μετασχηματισμένων με πλασμίδια που φέρουν γονίδια β-λακταμασών τάξης C

	MIC (μg/ml)													Αναφορά
	AMX	AM/CL	PIP	PP/TZ	CEF	CXM	CAZ	CTX	FEP	ATM	FOX	CFN	IMP	
<i>E. coli</i> ECOFF/CB ^a	8/8	ΔΕ/ΔΕ	8/16	8/16	32/ΔΕ	8/8	0,5/4	0,125/2	0,125/4	0,25/4	8/ΔΕ		0,5/8	http://mic.eucast.org/Eucast2/
CMY-2	>256	>256	128	32	>256	>256	128	16	0,5	64	256	64	0,5	Bauernfeind A. και συν., 1996
ACC-1	>512	ΔΕ	64	32	>512	>512	32	8	0,12	0,5	4	1	0,12	Bauernfeind A. και συν., 1999
ACC-4	>512	ΔΕ	32	16	>512	>512	256	32	0,12	2	4	1	0,12	Papagiannitsis C. C. και συν., 2007
DHA-1	>512	>512	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	64	16	0,125	16	128	ΔΕ	ΔΕ	Gaillot O. και συν., 1997
ACT-1	ΔΕ	ΔΕ	32	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	4	≤2	≤0,06	4	>256	16	1	Bradford P. A. και συν., 1997
MIR-1	1000	≥256	ΔΕ	ΔΕ	64	ΔΕ	128	64	1	128	≥256	≥64	ΔΕ	Papanicolaou G. A. και συν., 1990
CMY-1	2048	128	128	32	>1028	ΔΕ	4	64	0,25	16	256	256	0,25	Bauernfeind A. και συν., 1996
CMY-10	>256	>256	ΔΕ	ΔΕ	>256	256	32	16	1	128	256	128	0,25	Lee S. H. και συν., 2003
FOX-1	>2048	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	128	ΔΕ	8	2	ΔΕ	1	128	32	ΔΕ	Gonzalez Leiza M. και συν., 1994
MOX-1	>512	>512	ΔΕ	ΔΕ	>512	ΔΕ	16	>512	ΔΕ	>512	ΔΕ	>512	0,5	Horii T. και συν., 1993

Παρόμοια είναι η συμπεριφορά των ενζύμων και έναντι των οξυμίμο κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς και της αζτρεονάμης. Τα υποστρώματα αυτά ακυλιώνουν πολύ γρήγορα την καταλυτική σερίνη των ενζύμων και το δημιουργούμενο ακυλ-ένζυμο υδρολύεται με πολύ χαμηλή ταχύτητα. Η σταθερά κατάλυσης k_{cat} εδώ εξαρτάται από την ταχύτητα απακυλίωσης k_3 ενώ η αρχική ταχύτητα υδρόλυσης όποτε είναι μετρήσιμη δεν αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος επειδή η σταθερά *Michaelis* είναι πολύ χαμηλή και δεν μπορεί να μετρηθεί. Τα υποστρώματα αυτά λειτουργούν ουσιαστικά ως αναστολείς αυτοκτονίας και ένα μέτρο της φαινόμενης συγγένειας (K_m) που εμφανίζουν οι κεφαλοσπορινάσες κατά την αλληλεπίδραση μαζί τους δίνεται από τον προσδιορισμό των σταθερών αναστολής (σε αυτή την περίπτωση η κινητική σταθερά αναστολής προσεγγίζει τη θερμοδυναμική σταθερά) οι οποίες είναι στα επίπεδα $<1 - 100$ nM. Τα υπολογιζόμενα k_{cat}/K_m εδώ είναι υψηλά καθώς δεν δηλώνουν την απόδοση της κατάλυσης παρά την απόδοση της δημιουργίας του συμπλόκου *Michaelis* και της αντίδρασης ακυλίωσης η οποία γίνεται πολύ γρήγορα και δεν αποτελεί περιοριστικό στάδιο της αντίδρασης. (Galleni M. και Frere J. M., 1988; Galleni M. και συν., 1988) Οι κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενεάς κεφεπίμη και κεφπιρόμη επίσης δεν υδρολύονται αλλά σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται ότι υπάρχει επιπλέον και αδυναμία δημιουργίας του ακυλενζύμου καθώς όποτε έχουν υπολογιστεί K_m από διάφορα εργαστήρια αυτά είναι υψηλά (Alba J. και συν., 2003; Queenan A. M. και συν., 2007). Οι καρβαπενέμες δεν απενεργοποιούνται από τις AmpC αναστέλλοντας τα ένζυμα μέσω μόνιμης δημιουργίας ομοιοπολικού συμπλόκου (Beadle B. M. και Shoichet B. K., 2002). Οι αναστολείς αυτοκτονίας κλαβουλανικό οξύ, σουλβακτάμη και ταζοβακτάμη δεν μπορούν να απενεργοποιήσουν τα συγκεκριμένα ένζυμα με τις σταθερές αναστολής για το κλαβουλανικό οξύ να είναι στο επίπεδο mM και για τη σουλβακτάμη στο επίπεδο μερικών εκατοντάδων μ M για τα περισσότερα ένζυμα. Η ταζοβακτάμη φαίνεται να έχει κάποια ενεργότητα *in vitro* για κάποια ένζυμα (π.χ. τύπου CMY-2) με τις αντίστοιχες σταθερές να είναι από 1 - 100 μ M. Αντίθετα η κλοξακιλλίνη είναι ισχυρός αναστολέας των ενζύμων εμφανίζοντας δυνατότητα απενεργοποίησης για κάποια από αυτά σε νανομοριακές συγκεντρώσεις. (Philippon A. και συν., 2002) Η αζτρεονάμη έχει επίσης αυτήν την ιδιότητα καθώς χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη ταχύτητα απακυλίωσης και την υψηλότερη συγγένεια από όλα τα οξυμίμο υποστρώματα (στον πίνακα οι τιμές k_{cat}

που δίνονται έχουν μετρηθεί ως ταχύτητες απακυλίωσης k_3). (Galleni M. και συν., 1988; Bauvois C. και συν., 2007).

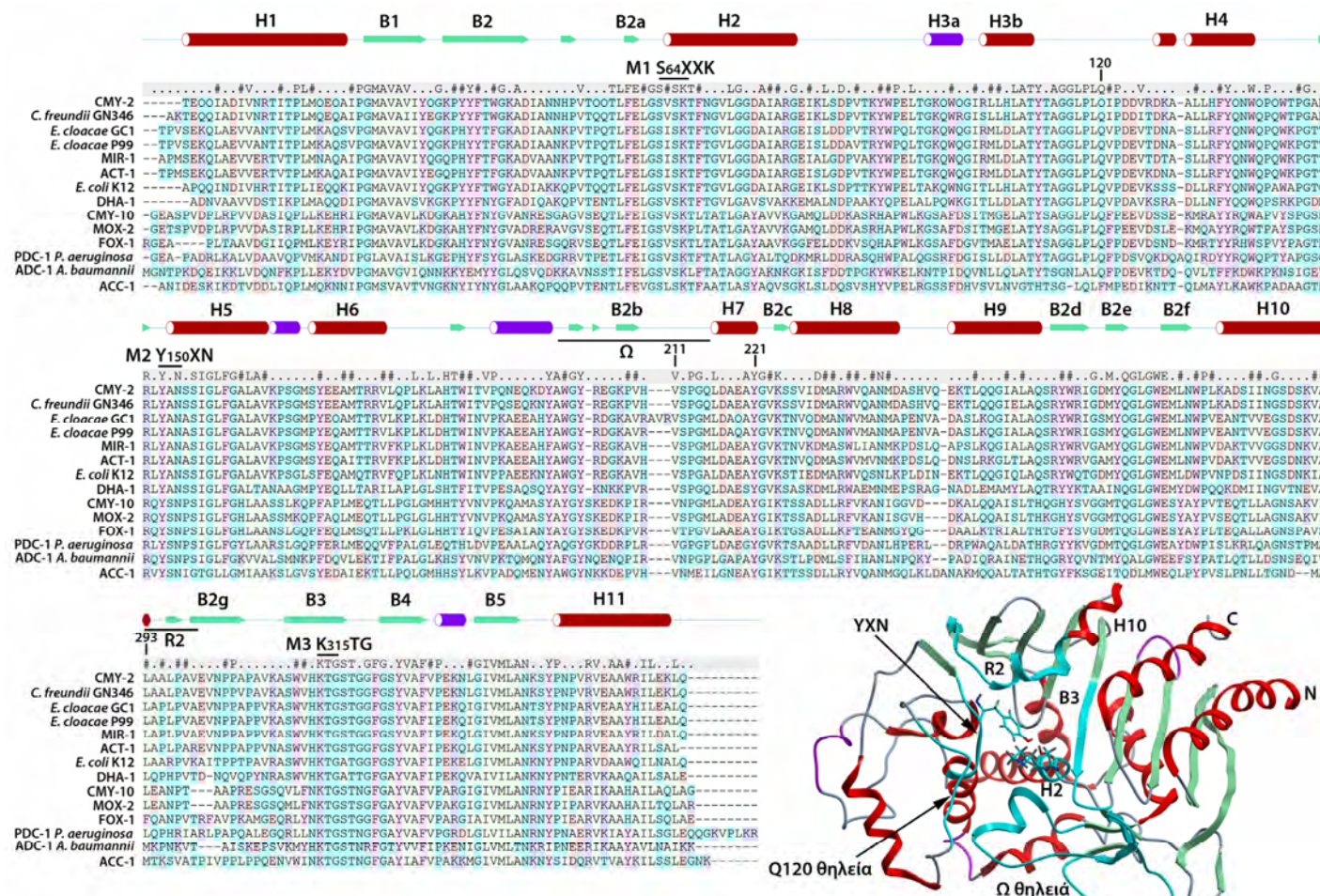
Οι φαινότυποι ευαισθησίας βακτηρίων με επαγωγήμη χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση χαρακτηρίζονται από αντοχή στις πενικιλίνες εκτός της πιπερακιλλίνης, στους συνδυασμούς τους με αναστολείς αυτοκτονίας και στις παλαιότερες κεφαλοσπορίνες και από μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στις κεφαμυκίνες. Υπερπαραγωγή των χρωμοσωμικών ενζύμων οδηγεί σε εμφάνιση αντοχής στις οξυμίμο κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς, στις κεφαμυκίνες και σε μερικές περιπτώσεις και στην αζτρεονάμη. Όταν η υπερπαραγωγή αυτή συνδυάζεται και με απώλεια λειτουργίας ποριών (π.χ. *Enterobacter* sp., *P. aeruginosa*) ή/και με παραγωγή αντλίας ενεργού έκκρισης (π.χ. *P. aeruginosa*) τότε παρατηρείται μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή και στις καρβαπενέμες. (Jacoby G. A., 2009) Αντίστοιχοι είναι οι φαινότυποι ευαισθησίας όσον αφορά και τα πλασμιδιακά ένζυμα με την υπερπαραγωγή λόγω της δράσης ισχυρών υποκινητών να οδηγεί σε αντοχή στις οξυμίμο κεφαλοσπορίνες εκτός από αυτές της τέταρτης γενεάς και σε μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή έναντι της αζτρεονάμης (Πίνακας 10). Στελέχη που παράγουν ένζυμα τύπου ACC είναι ευαίσθητα στις κεφαμυκίνες ενώ όλες οι υπόλοιπες πλασμιδιακές κεφαλοσπορινάσες προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά αυτά (Πίνακας 10). Μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες συνήθως εμφανίζεται λόγω ελάττωσης της λειτουργίας των ποριών της εξωτερικής μεμβράνης (Jacoby G. A., 2009). Έχει παρατηρηθεί λοιπόν ότι ακόμα και αυτή η ελάχιστη υδρόλυση που εμφανίζουν τα AmpC έναντι των οξυμίμο υποστρωμάτων είναι ικανή να οδηγήσει σε αντοχή όταν τα ένζυμα υπερπαραγονται στον περιπλασμικό χώρο εξαιτίας της υψηλής συγγένειας που εμφανίζουν με αυτά (Nikaido H. και συν., 1990).

iii. Ενεργό κέντρο και μηχανισμός κατάλυσης

Οι AmpC διαθέτουν ευρύτερο ενεργό κέντρο σε σχέση με τις βΛτΑ (Εικόνα 27) και σε αυτό αποδίδεται εν μέρει η δυνατότητά τους να δεσμεύουν ισχυρά τις οξυμίμο κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς και να ακυλώνονται γρήγορα από αυτές (Oefner C. και συν., 1990; Lobkovsky E. και συν., 1993). Όπως και στις υπόλοιπες β-λακταμάσες σερίνης η καταλυτική κοιλότητα εντοπίζεται στην αύλακα που σχηματίζουν η α/β και η α

επικράτεια οι οποίες ενώνονται από μία θηλειά Ω στην θέση δέσμευσης των R1 πλευρικών αλυσίδων των κεφαλοσπορινών και από την H10 α -έλικα και R2 θηλειά στο αντιδιαμετρικό άκρο του ενζύμου. Οι δύο παραπάνω δομές διατρέχουν το ενεργό κέντρο σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτή που έχουν οι αντίστοιχες στις βΛτΑ (Lobkovsky E. και συν., 1993). Η B3 β -αλυσίδα που περιέχει το μοτίβο $K_{315}TG$ σχηματίζει ένα από τα τοιχώματα του ενεργού κέντρου ενώ η θηλειά μεταξύ των H4 και H5 α -ελίκων που περιέχει το μοτίβο $Y_{150}XN$ σχηματίζει το αντιδιαμετρικό τοίχωμα. Το τμήμα του ενζύμου που περιέχει τα αμινοξέα 119-120 ολοκληρώνει την καταλυτική κοιλότητα και εντοπίζεται πάνω από την YXN θηλειά σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου με αυτή (μεταξύ της ακυλομάδας του σκελετού της θέσης 119 και της αμίδης του σκελετού της $Asn152$). (Oefner C. και συν., 1990; Lobkovsky E. και συν., 1993)

Στον πυθμένα του ενεργού κέντρου προβάλλει το αμινοτελικό άκρο της H2 α -έλικας που περιέχει το καταλυτικό μοτίβο $S_{64}XXK$. Τα δύο καταλυτικά αμινοξέα $Ser64$ και $Lys67$ τοποθετούν τις πλευρικές τους αλυσίδες στην επιφάνεια της κοιλότητας του ενεργού κέντρου με την λυσίνη να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου στα ελεύθερα ένζυμα με την πλευρική αλυσίδα της καταλυτικής σερίνης, της τυροσίνης του μοτίβου YXN και της ασπαραγίνης αυτού. Η πλευρική αλυσίδα της $Tyr150$ τοποθετείται επίσης κοντά στην καταλυτική σερίνη ενώ εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με αυτή της λυσίνης στη θέση 315. Η αμίδα του σκελετού της καταλυτικής $Ser64$ σχηματίζει την οπή οξυανιόντος με την αντίστοιχη της $Thr(Ala)318$ που εντοπίζεται στη B3 β -αλυσίδα όπου δεσμεύεται το καρβονύλιο του β -λακταμικού δακτυλίου και τα ανιόντα των κατάστασεων μετάπτωσης που δημιουργούνται κατά την πορεία της αντίδρασης (Εικόνα 28). Στα ανώτερα τοιχώματα του ενεργού κέντρου προβάλλουν οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων στις θέσεις 119 και 120 που είναι αρκετά συντηρημένες και συνήθως καταλαμβάνονται από λευκίνη και γλουταμίνη αντίστοιχα. Η $Gln120$ σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το καρβονύλιο των αμινοάκυλο υποκαταστάσεων των β -λακταμικών σε συνδυασμό με την πλευρική αλυσίδα της $Asn152$. Η $Leu119$ σχηματίζει μία υδρόφοβη επιφάνεια με το αμινοξύ της θέσης 293 στην H10/R2 θηλειά που συνήθως είναι λευκίνη όπου δεσμεύονται τα αντίστοιχα υδρόφοβα τμήματα των β -λακταμικών. (Patera A. και συν., 2000; Powers, R. A. και συν., 2001; Beadle B. M. και συν., 2002)



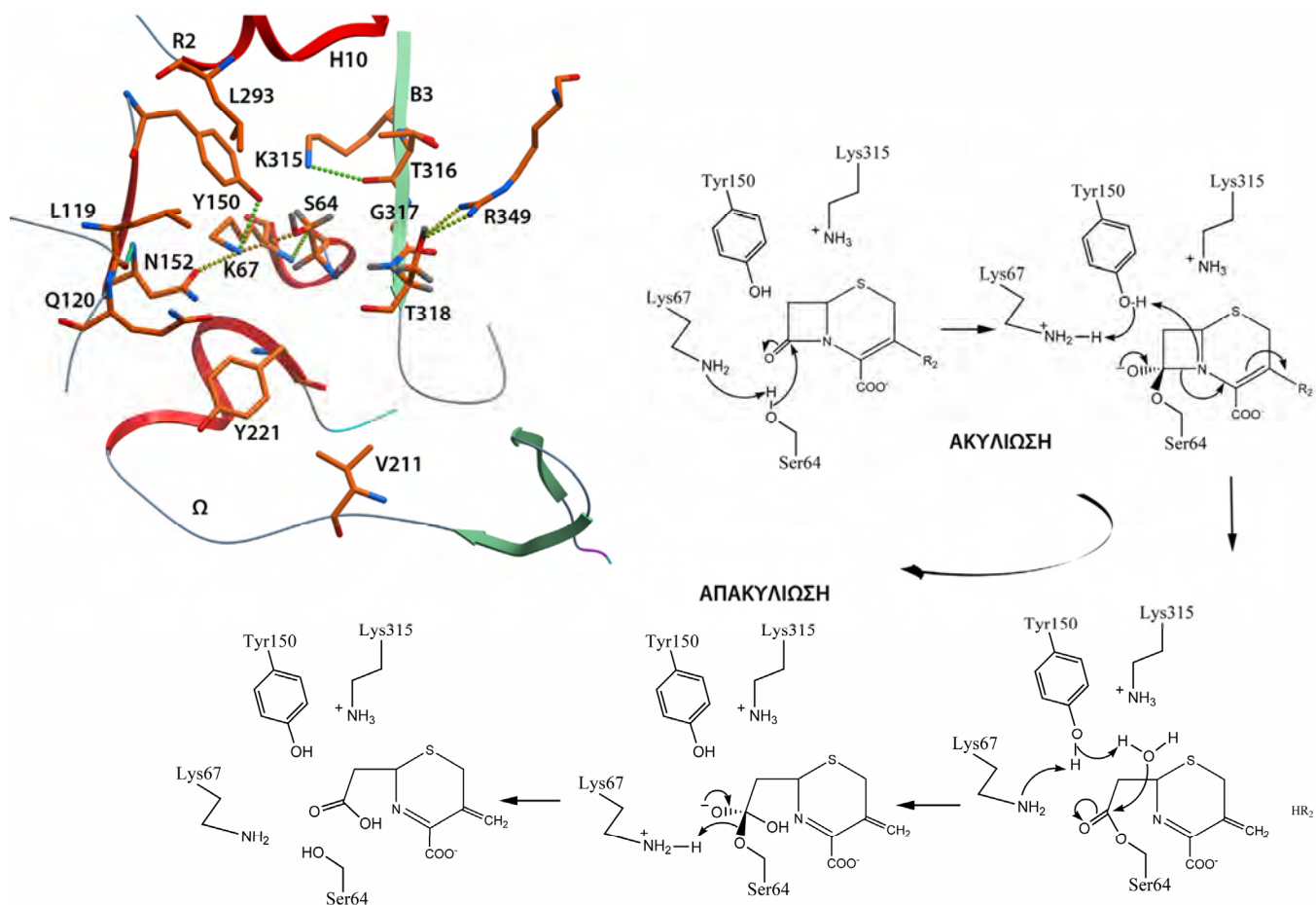
Εικόνα 27: Αντιστοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών μερικών ενζύμων τάξης C. Δίνεται η δευτεροταγής δομή της CMY-2 όπως προέκυψε από την κρυσταλλογραφική δομή της (1ZC2, κάτω δεξιά). Στον κρύσταλλο τα τρία πρώτα αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης (AlaAlaLys) έλλειπταν. Διακρίνεται η υψηλή συντηρικότητα της πρωτοταγούς δομής των ενζύμων εν αντιθέσει με τα ένζυμα τάξης A. Σημειώνονται τα τρία καταλυτικά μοτίβα και σημαντικές θέσεις εκτός των καταλυτικών αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με τα δεσμευμένα β-λακταμικά. Οι AmpC διαθέτουν μόριο μεγαλύτερης μοριακής μάζας σε σχέση με τις βΛαΤ (34-40 KDa) και ευρύτερη καταλυτική κοιλότητα η οποία δομείται από μία εκτεταμένη θηλεία Ω, το B3 φύλλο, την Q120 θηλεία, την περιοχή του καταλυτικού μοτίβου YXN, την H10 έλικα/R2 θηλεία και την H2 α-έλικα στον πυθμένα του ενεργού κέντρου.

Η ακυλομάδα της θέσης 318 αλληλεπιδρά με την αμινομάδα των πλευρικών αλυσίδων των πενικιλινών και κεφαλοσπορινών. Προς την κοιλότητα του ενεργού κέντρου προβάλλει και η πλευρική αλυσίδα της Arg349 η οποία έχει αντίστοιχο ρόλο με αυτόν της Arg244 των βΛτΑ ως προς την δέσμευση του C3/C4 καρβοξυλίου των υποστρωμάτων το οποίο στα διάφορα σύμπλοκα που δημιουργούνται κατά την πορεία της αντίδρασης αλληλεπιδρά επίσης με το υδροξύλιο της Thr316 του μοτίβου KTG. Οι πλευρικές αλυσίδες της Val211 στη θηλειά Ω και Tyr221 στην H7 έλικα, δύο πολύ συντηρημένων αμινοξέων, σχηματίζουν μία επιφάνεια στο τμήμα του ενζύμου που δεσμεύει τις R1 πλευρικές αλυσίδες των κεφαλοσπορινών (Εικόνα 28). (Lobkovsky E. και συν., 1993; Patera A. και συν., 2000; Powers, R. A. και συν., 2001)

Τα αμινοξέα που συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση είναι τα Ser64, Lys67 και Tyr150 ενώ έμμεσο ρόλο έχει και η Lys315 η οποία είναι πρωτονιωμένη και δημιουργεί το κατάλληλο ηλεκτροστατικό μικροπεριβάλλον ρυθμίζοντας τις καταστάσεις πρωτονίωσης των καταλυτικών αμινοξέων (Tsukamoto K. και συν., 1990; Dubus A. και συν., 1996). Η επίδραση της Lys315 στην πλευρική αλυσίδα της Lys67 έχει ως αποτέλεσμα αυτή να είναι αποπρωτονιωμένη στα ελεύθερα ένζυμα σε ουδέτερο pH εξαιτίας της χαμηλής pKa που εμφανίζει. Κατά τη δημιουργία του συμπλόκου *Michaelis* η ουδέτερη λυσίνη στη θέση 67 αποσπά ένα πρωτόνιο από την καταλυτική σερίνη με αποτέλεσμα αυτή να επιτίθεται στον άνθρακα του καρβονυλίου του β-λακταμικού (Εικόνα 28). Το τετραεδρικό οξυανιόν που δημιουργείται στην συνέχεια καταρρέει με διάσπαση του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού εξαιτίας της πρωτονίωσης του αζώτου από την πλευρική αλυσίδα της Tyr150 η οποία αντικαθιστά το πρωτόνιο που χάνει αποσπώντας αυτό της πρωτονιωμένης στη ρίζα μετάπτωσης Lys67 (Chen Y. και συν., 2009; Díaz N. και συν., 2006). Έχει υποτεθεί ότι η πρωτονίωση του αζώτου δεν γίνεται απευθείας από την Tyr150 αλλά ότι παρεμβάλλεται το C3/C4 καρβοξύλιο (Tripathi R. και Nair N. N., 2013). Το άζωτο της αποχωρούσας ομάδας στις κεφαλοσπορίνες δεν παραμένει πρωτονιωμένο στα ακυλένζυμα των βΛτC καθώς προσφέρει τα ηλεκτρόνια του δεσμού που σχηματίζει με το υδρογόνο στον δακτύλιο διυδροθειαζίνης με ταυτόχρονη απομάκρυνση της R2 πλευρικής αλυσίδας (όταν στο μεθύλιο που δεσμεύεται στον C3 υπάρχει αποχωρούσα ομάδα) (Chen Y. και συν., 2006). Ο παραπάνω

μηχανισμός ακυλίωσης που χρησιμοποιούν οι AmpC είναι ταυτόσημος με τον αντίστοιχο των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών με τις οποίες συγγενεύουν (Pratt R. F., 2002).

Στις βΛτC όμως τα ακυλένζυμα μπορούν να υδρολυθούν. Η αντίδραση απακυλίωσης διαμεσολαβείται πάλι από τα αμινοξέα Lys67 και Tyr150 τα οποία μόνα τους ή σε συνδυασμό ενεργοποιούν το καταλυτικό νερό που εντοπίζεται στην β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού (Εικόνα 28). Τρεις δρόμοι έχουν προταθεί για την αποπρωτονίωση του υδρολυτικού νερού. Ο πρώτος μηχανισμός προϋποθέτει ότι η Tyr150 είναι αποπρωτονιωμένη και η Lys67 θετικά φορτισμένη και η απόσπαση του υδρογόνου από το καταλυτικό νερό διαμεσολαβείται από το πρώτο αμινοξύ ενώ η πρωτονίωση της αποχωρούσας από τον εστερικό δεσμό Ser64 από το δεύτερο (Lobkovsky E. και συν., 1994). Στον δεύτερο μηχανισμό που έχει προταθεί η τυροσίνη είναι ουδέτερη και η λυσίνη είναι πρωτονιωμένη ενώ την απόσπαση του υδρογόνου από το πυρηνόφιλο την καταλύει το άζωτο του δακτυλίου διυδροθειαζίνης με την Lys67 να δρά πάλι ως οξύ και να πρωτονιώνει την Ser64 (Bulychev A. και συν., 1997). Το τελευταίο μοντέλο απακυλίωσης, το οποίο είναι περισσότερο πιθανό σύμφωνα με τις πειραματικά και θεωρητικά υπολογιζόμενες pKa των καταλυτικών αμινοξέων, αναφέρει ότι οι ουδέτερες πλευρικές αλυσίδες των Lys67 και Tyr150 στο στάδιο του ακυλενζύμου μοιράζονται ένα πρωτόνιο και παρουσία του υδρολυτικού νερού η τυροσίνη αποσπά ένα υδρογόνο από αυτό μεταφέροντας το στην λυσίνη η οποία με τη σειρά της πρωτονιώνει την υδροξυλομάδα της Ser64 κατά την κατάρρευση της τετραεδρικής ρίζας (Εικόνα 28) (Chen Y. και συν., 2006; Gherman B. F. και συν., 2004). Αν και ο τελευταίος μηχανισμός φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός απακυλίωσης των βΛτC δεν αποκλείεται κάποια ένζυμα στην αλληλεπίδρασή τους με συγκεκριμένα υποστρώματα να χρησιμοποιούν και τους άλλους δύο. (Chen Y. και συν., 2006)



Εικόνα 28: Δομή του ενεργού κέντρου των AmpC (δίνεται αυτό της CMY-2) όπου φαίνονται σημαντικά για την κατάλυση αμινοξέα καθώς και αυτά που αλληλεπιδρούν με τις ομάδες των δεσμευόμενων υποστρωμάτων. Μηχανισμοί ακυλίωσης και απακυλίωσης της καταλυτικής σερίνης υπό την δράση των Lys67 και Tyr150. Ο μηχανισμός ακυλίωσης είναι ίδιος με τον αντίστοιχο των πενικιλιοδεσμευτικών από τις οποίες έχουν προκύψει. Η απακυλίωση θεωρείται ότι συμβαίνει πιθανότατα επίσης μέσω παρόμοιου μηχανισμού ο οποίος δίνεται στο σχήμα και περιλαμβάνει τις ουδέτερες μορφές των Lys67 και Tyr150 αν και έχουν προταθεί επιπλέον μηχανισμοί για το στάδιο αυτό. Στο σχήμα δίνεται ο μηχανισμός υδρόλυσης κεφαλοσπορινών για τις οποίες τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν προτίμηση.

iv. Διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων και μελέτες δομής λειτουργίας

Τροποποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των AmpC μέσω μεταλλαγών εμφανίζεται σχετικά σπάνια και αφορά κυρίως χρωμοσωμικά ένζυμα. Οι υποκαταστάσεις αμινοξέων σε δύο κυρίως επικράτειες των ενζύμων, στη θηλειά Ω και στην H10 α-έλικα/R2 θηλειά, οδηγούν σε αύξηση της υδρόλυσης των οξυμίμο κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς και της αζτρεονάμης ενώ κάποιες επάγουν και την αυξημένη υδρόλυση μορίων τέταρτης γενεάς. Τα ένζυμα που έχουν τις παραπάνω ιδιότητες ονομάζονται συλλογικά και εκτεταμένου-φάσματος AmpC (ESAC) .

Το πρώτο ένζυμο με αυτές τις ιδιότητες παράγονταν από το χρωμοσωμικό γονίδιο του *E. cloacae* GC1 και σε σχέση με το προγονικό του ένζυμο, τη χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση του *E. cloacae* P99, διέφερε στην εισδοχή τριών αμινοξέων στη θηλειά Ω που είχε προκύψει από διπλασιασμό του τριπεπτιδίου Ala₂₀₈ValArg (Nukaga M. και συν., 1995). Φαινοτυπικές διαφορές αφορούσαν την αύξηση των MIC της κεφαταζιδίμης και της αζτρεονάμης ενώ προσδιορισμός των κινητικών σταθερών έδειξε ότι αυξάνεται ταυτόχρονα τόσο η ταχύτητα της υδρόλυσης όσο και η σταθερά K_m κατά την αλληλεπίδραση με την κεφοταξίμη, την κεφαταξίμη και την αζτρεονάμη (Πίνακας 11). Οι αλλαγές αυτές δηλώνουν ότι ουσιαστικά επηρεάζεται μόνο το στάδιο της απακυλίωσης και για τον λόγο αυτό δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες αλλαγές στην σταθερά ειδικότητας k_{cat}/K_m . Η αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα που υδρολύονται γρήγορα από τα συγκεκριμένα ένζυμα δεν επηρεάστηκε σε σημαντικό βαθμό με το ένζυμο εκτεταμένου φάσματος να παρουσιάζει χαμηλότερη φαινόμενη συγγένεια έναντι της κεφαλοθίνης (Πίνακας 11).

Η αυξημένη ταχύτητα υδρόλυσης του ακυλ-ενζύμου της GC1 με τα οξυμίμο υποστρώματα αρχικά αποδόθηκε στη μετατόπιση της B3 β-αλυσίδας η οποία προκαλούσε διεύρυνση της κοιλότητας δέσμευσης των R1 πλευρικών αλυσίδων των κεφαλοσπορινών όπως προέκυψε από την σύγκριση της κρυσταλλογραφικής δομής της P99 κεφαλοσπορινάσης με την GC1 (Εικόνα 29A; Crichtlow G. V. και συν., 1999). Στην κρυσταλλογραφική δομή της GC1 η περιοχή της θηλειάς Ω μετά την τριπλέτα εισδοχής, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα Val²¹⁴Ser, ήταν αποδιεταγμένη γεγονός που αποδόθηκε σε αυξημένο βαθμό ευελιξίας (Crichtlow G. V. και συν., 1999). Η κρυσταλλογραφική δομή

του συμπλόκου της GC1 με το φωσφονικό ανάλογο της κεφοταξίμης, που λειτουργεί ως αναστολέας προσομοιάζοντας την κατάσταση μετάπτωσης της απακυλίωσης, και σύγκριση με την αντίστοιχη δομή της κεφαλοσπορινάσης του *C. freundii* GN346 αποκάλυψε ότι τα μόρια με οξυίμινο πλευρικές αλυσίδες ενδέχεται να τοποθετούνται με διαφορετικό τρόπο στο ένζυμο εκτεταμένου φάσματος λόγω της παραπάνω αυξημένης ευελιξίας της θηλειάς Ω (Nukaga M. και συν., 2004). Σύγκριση της συμπλοκοποιημένης GC1 με το ελεύθερο ένζυμο αποκάλυψε ότι η πρόσδεση του οξυίμινο μορίου προκαλούσε σημαντική μετατόπιση της θηλειάς Ω ώστε η Tyr224 να μην εμποδίζει την τοποθέτηση της μέθοξυ-ίμινο ομάδας (Εικόνα 29Α; Nukaga M. και συν., 2004). Αντίθετα στο ένζυμο *C. freundii* GN346 το οξυίμινο φωσφονικό τοποθετεί την πλευρική αλυσίδα με τέτοιο τρόπο ώστε η μεθοξυίμινο ομάδα να είναι στραμμένη προς στο διάλυμα, ενώ η επιφάνεια που σχηματίζουν τα Val211 και Tyr221 δεν επιτρέπει τις όποιες μετακινήσεις της πλευρικής αλυσίδας μέσω των περιορισμών που ασκεί στον δακτύλιο αμινοθειαζώλης (Εικόνα 29Α). Η τοποθέτηση της πλευρικής αλυσίδας της κεφοταξίμης στο GC1, στο οποίο η παραπάνω επιφάνεια δεν υφίσταται, θεωρήθηκε ότι επιτρέπει την ανεμπόδιστη δημιουργία του τετραεδρικού ενδιάμεσου της απακυλίωσης. (Nukaga M. και συν., 2004)

Η αυξημένη υδρόλυση της κεφαταξιδίμης, η οποία έχει πιο ογκώδη οξυίμινο πλευρική αλυσίδα από την κεφοταξίμη, επίσης αποδόθηκε στην διάρρηξη της επιφάνειας Val211-Tyr221 στην GC1 και στην λιγότερο παρεμποδισμένη επίθεση του υδρολυτικού νερού. Σύγκριση της κρυσταλλογραφικής δομής του ακυλενζύμου κεφαταξιδίμης της AmpC του *E. coli* K12 με τη δομή ομοιοπολικού συμπλόκου του ενζύμου με ένα βορονικό οξύ που φέρει την R1 πλευρική αλυσίδα της κεφαταξιδίμης, το οποίο προσομοιάζει την κατάσταση μετάπτωσης της απακυλίωσης, έδειξε ότι το υδροξύλιο του βορονικού οξέος που αντιστοιχεί σε αυτό του υδρολυτικού νερού στην τετραεδρική ρίζα οξυανιόντος τοποθετείται πολύ κοντά στο άζωτο του δακτυλίου διυδροθειαζίνης (Powers R. A. και συν., 2001). Αυτή η τοποθέτηση της κεφαταξιδίμης δηλαδή παρεμποδίζει τη δημιουργία του τετραεδρικού ενδιάμεσου της απακυλίωσης. Μοντελοποίηση της κεφαταξιδίμης στο ακυλένζυμο της AmpC ώστε να αποκτήσει τη δομή της αντίστοιχης ρίζας της λορακαμπέφης που υδρολύεται από το ένζυμο έδειξε ότι η κατάλληλη για υδρόλυση τοποθέτηση του οξυίμινο υποστρώματος παρεμποδίζεται από την επιφάνεια

Val211-Tyr221. Αντίστοιχη μοντελοποίηση της κεφταζιδίμης στη GC1 έδειξε ότι η παραπάνω τοποθέτηση είναι εφικτή λόγω της διάρρηξης της επιφάνειας εξαιτίας της εισδοχής του τριπεπτιδίου (Powers R. A. και συν., 2001).

Πίνακας 11: Διεύρυνση φάσματος στις β-λακταμάσες τάξης C.

Εισδοχή τριπεπτιδίου στη θηλειά Ω (Nukaga M. και συν., 1995)

β-λακτάμη	AmpC ^{E. cloacae} P99			AmpC ^{E. cloacae} GC1 (Διπλασιασμός Ala ²⁰⁸ ValArg)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	10,1	3,1	3,3·10 ⁶	5,66	3,1	1,8·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	84,8	10	8,2·10 ⁶	74,8	31	2,4·10 ⁶
Κεφουροξίμη	0,024	0,07	0,33·10 ⁶	24,1	26	0,92·10 ⁶
Κεφοταξίμη	0,015	0,01	1,5·10 ⁶	62	8,1	7,7·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	MM	0,007	-	>0,90	>742	-
Αζτρεονάμη	<0,0002	0,52	-	0,011	1,1	10 ⁴

S220Y θηλειά Ω (Hidri N. και συν., 2005)

	AmpC ^{S. marcescens} (Ser220)			AmpC ^{S. marcescens} SMSA (Tyr220)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	50	5	10·10 ⁶	50	50	10 ⁶
Κεφαλοθίνη	2000	80	25·10 ⁶	780	1300	0,6·10 ⁶
Κεφοταξίμη	2	4	0,5·10 ⁶	800	980	0,8·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	<0,5	50	<10 ⁴	520	570	0,9·10 ⁶
Κεφεπίμη	<0,5	100	<10 ⁴	330	1000	0,33·10 ⁶

V211G θηλειά Ω (Papagiannitsis C. C. και συν., 2007)

	ACC-1 (Val211)			ACC-4 (Gly211)		
	*V _{max}	K_m (μM)	V _{max} /K _m	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	ΔΕ	-	-	0,59	3,8	3,2·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	ΔΕ	-	-	96	30	30·10 ⁶
Κεφοταξίμη	<0,01	-	0,43	2,7	9,4	0,29·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	<0,025	17	<0,01	1,5	15	0,1·10 ⁶
Κεφεπίμη	ΔΕ	-	-	0,14	73	2·10 ³
Κεφοξιτίνη	<0,002	-	-	<0,01	-	-

Έλλειψη τριπεπτιδίου στην H10 α-έλικα (Doi Y. και συν., 2004)

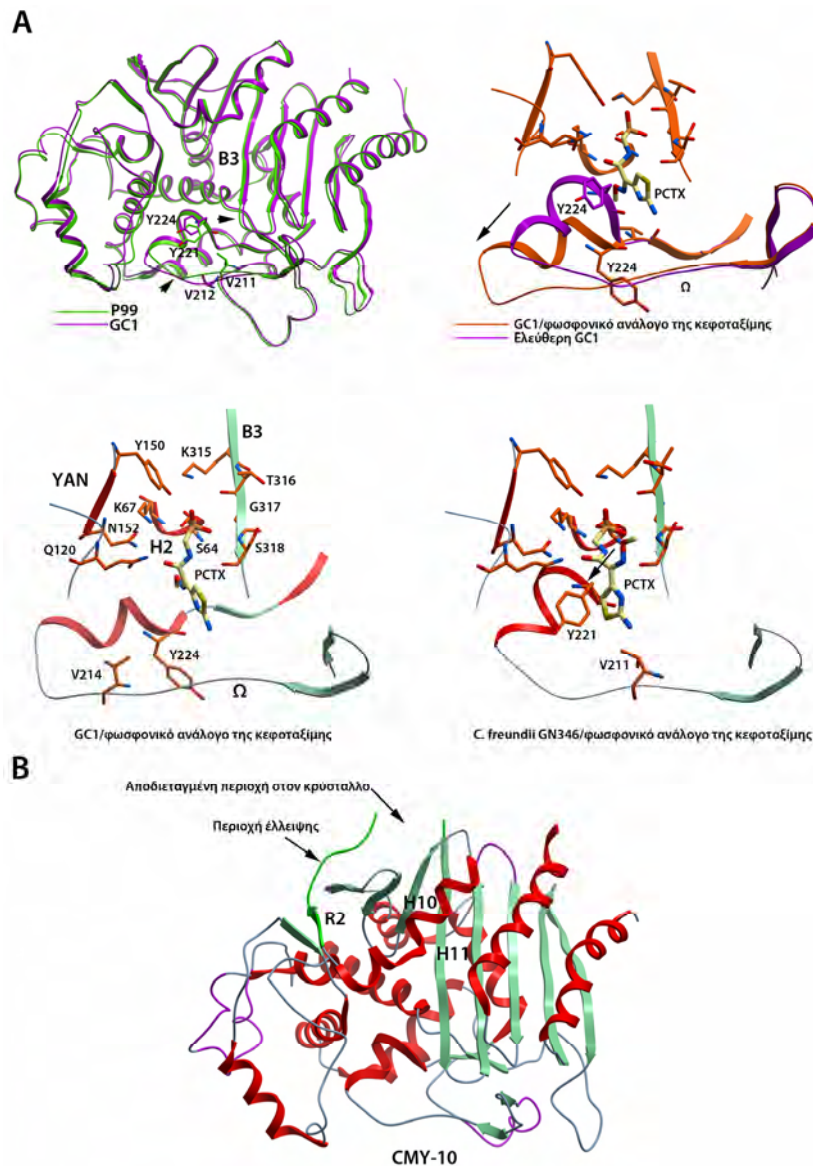
	AmpC ^{E. coli} K12			AmpC ^{E. coli} HKY28 (έλλειψη Gly ²⁸⁶ SerAsp)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Αμπικιλίνη	4	13	3,2·10 ⁵	0,43	6,2	7·10 ⁴
Κεφαλοριδίνη	300	780	3,9·10 ⁵	64	100	6,4·10 ⁵
Κεφοταξίμη	1,2	13	9,7·10 ⁴	0,37	31	1,2·10 ⁴
Κεφταζιδίμη	3,5	550	6,4·10 ³	0,084	5,7	1,2·10 ⁵
Κεφεπίμη	0,21	200	1,1·10 ³	1,0	49	2,1·10 ⁴
Κεφοξιτίνη	0,35	3,9	9,1·10 ⁴	0,043	1,2	3,8·10 ⁴

Έλλειψη τετραπεπτιδίου στην R2 θηλειά (Mammeri H. και συν., 2004)

	AmpC ^{S. marcescens} S3			AmpC ^{S. marcescens} HD (έλλειψη Met ²⁹³ AsnGlyThr)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	35	9	4·10 ⁶	50	10	5·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	1200	125	9,6·10 ⁶	95	2	48·10 ⁶
Κεφουροξίμη	2,5	7	0,35·10 ⁶	4,5	5	1·10 ⁶
Κεφοταξίμη	6	7	0,8·10 ⁶	5	2	2,3·10 ⁶
Κεφταζιδίμη	5	>1000	<5·10 ³	270	20	13·10 ⁶
Κεφεπίμη	80	>1000	<8·10 ⁴	50	6	8,4·10 ⁶
Αζτρεονάμη	<0,001	-	-	<0,001	-	-

L293P R2 θηλειά (Barnaud G. και συν., 2004)

	AmpC ^{E. aerogenes} Ear1 (Leu293)			AmpC ^{E. aerogenes} Ear2 (Pro293)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Πενικιλίνη G	10	4,5	2,2·10 ⁶	5	5,3	0,94·10 ⁶
Κεφαλοθίνη	190	36	5,2·10 ⁶	50	7	7,1·10 ⁶
Κεφοταξίμη	0,15	ΔΕ	ΔΕ	0,15	10	1,5·10 ⁴
Κεφταζιδίμη	ΔΕ	16	-	ΔΕ	9,8	-
Κεφεπίμη	0,4	126	3,3·10 ³	0,4	9,1	4,4·10 ⁴
Κεφοξιτίνη	ΔΕ	1,8	-	ΔΕ	4,2	-



Εικόνα 29: A) Δομικές βάσεις της διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων στην GC1 κεφαλοσπορινάση. Πάνω αριστερά. Το ένζυμο (PDB ID: 1GCE) διαφοροποιείται ελαφρά ως προς τη θέση της B3 β-αλυσίδας σε σχέση με το πατρικό του (P99: 1XX2) στο οποίο η δομή βρίσκεται κατά τι μετατοπισμένη προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου. Η μεγάλη διαφορά όμως παρατηρήθηκε στην περιοχή της GC1 μετά τον διπλασιασμό του τριπεπτιδίου AlaValArg με την περιοχή 214-215 της θηλειάς Ω να παρουσιάζει μεγάλη αστάθεια. Όταν το ένζυμο κρυσταλλώθηκε με φωσφονικό οξύ που έφερε την πλευρική αλυσίδα της κεφοταξίμης (αναστολέας κατάστασης μετάπτωσης της απακυλίωσης, PDB ID: 1RGZ) η περιοχή αυτή είχε σταθεροποιηθεί και σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο (πάνω δεξιά) έδειξε μεγάλη μετατόπιση της θηλειάς Ω και ειδικά της Tyr221 στην περίπτωση του συμπλόκου. Σύγκριση με την ανάλογη δομή της κεφαλοσπορινάσης του *C. freundii* GN346 (κάτω δεξιά, PDB ID: 1RGY) έδειξε ότι η πλευρική αλυσίδα της κεφοταξίμης τοποθετείται πολύ διαφορετικά στο ένζυμο εκτεταμένου φάσματος με την μεθοξυμίμο ομάδα στραμμένη προς τον πυθμένα του ενεργού κέντρου ενώ στην AmpC που δεν υδρολύει οξυζιμίμο υποστρώματα η τοποθέτηση αυτή εμποδίζονταν από τις πλευρικές αλυσίδες της Tyr221 και Val211. B) Δομή της CMY-10 (PDB ID: 1ZKJ) κεφαλοσπορινάσης η οποία σε σχέση με τα ένζυμα που πρόερχονται από χρωμοσώματα Εντεροβακτηρίων φέρει έλλειψη τριών αμινοξέων στην περιοχή δέσμησης των R2 πλευρικών αλυσίδων των κεφαλοσπορινών. Τμήμα της περιοχής αυτής είναι αποδεδειγμένο στον κρυστάλλο γεγονός που δηλώνει υψηλή αστάθεια.

Η παραπάνω ερμηνεία της λειτουργίας της GC1 φαίνεται να έχει βάση καθώς το ένζυμο ACC-4 που είναι μία Val211Gly ποικιλία της ACC-1 πλασμιδιακής AmpC βρέθηκε να έχει αυξημένη υδολυτική ικανότητα έναντι της κεφοταξίμης και της κεφταζιδίμης (Πίνακας 11; Paragiannitsis C. C. και συν., 2007) ενώ ο εργαστηριακός μεταλλάκτης Tyr221Gly της AmpC του *E. coli* K12 έχει επίσης ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος (Thomas V. L. και συν., 2010). Αλλά δεν εξηγεί όμως γιατί άλλες θέσεις στη θηλειά Ω που δεν διαρρηγνύουν απευθείας την επιφάνεια Val211-Tyr221 έχουν παρόμοια επίδραση στις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου. Για παράδειγμα μεταλλάκτες Ser220Tyr (Hidri N. και συν., 2005) και Glu219Lys (Matsumura N. και συν., 1998) στις χρωμοσωμικές κεφαλοσπορινάσες βακτηρίων *S. marcescens* αυξάνουν την ικανότητα υδρόλυσης οξυμίμο υποστρωμάτων κυρίως μέσω αύξησης της ταχύτητας απακυλίωσης (Πίνακας 11). Ενώ η Glu219Lys υποκατάσταση έχει παρόμοια επίδραση και στην κεφαλοσπορινάση του *C. freundii* GN346 η οποία μετάλλαξη όμως ανακτήθηκε τυχαία σε εργαστηριακά πειράματα ελέγχου του μηχανισμού κατάλυσης (Tsukamoto K. και συν., 1990).

Ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος προσδίδουν επίσης και αλλαγές στην επικράτεια πρόσδεσης των R2 πλευρικών αλυσίδων των κεφαλοσπορινών. Αυτές αφορούν κυρίως ελλείψεις και εισδοχές στην H10 α-έλικα και την R2 θηλειά, όπως για παράδειγμα η έλλειψη 6 αμινοξέων στην περιοχή 290-295 της κεφαλοσπορινάσης του *E. cloacae* CHE (Barnaud G. και συν., 2001), η έλλειψη τεσσάρων αμινοξέων που αντιστοιχούν στις θέσεις κατά Ambler 293-296 στην χρωμοσωμική AmpC της *S. marcescens* HD (Mammeri H. και συν., 2004) και η έλλειψη 3 αμινοξέων στην περιοχή της H10 α-έλικας 286-288 του ενζύμου που παράγει το *E. coli* HKY28 (Doi Y. και συν., 2004) (Πίνακας 11). Επίσης στην περιοχή αυτή αναφέρονται και σημειακές μεταλλάξεις όπως για παράδειγμα η Leu293Pro στην AmpC του *E. aerogenes* Ear2 (Barnaud G. και συν., 2004), η His296Pro στην κεφαλοσπορινάση του *E. coli* EC15 και η Ser287Cys στο *E. coli* EC16 (Mammeri H. και συν., 2006). Οι αλλαγές αυτές αυξάνουν την αντοχή έναντι της κεφταξιδίμης και της κεφεπίμης κυρίως όταν εκφράζονται σε ισογονικές συνθήκες με τα πατρικά τους ένζυμα ενώ η επίδραση που έχουν στην υδρόλυση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων αφορούν αύξηση της φαινόμενης συγγένειας ειδικά στην περίπτωση της κεφεπίμης (Πίνακας 11). Η πλασμιδιακή CMY-10 και συγγενικά με αυτή ένζυμα (π.χ.

MOX) στην περιοχή της R2 θηλειάς που απαντούν οι παραπάνω αλλαγές φέρουν επίσης μία έλλειψη τριών αμινοξέων, και όταν παράγονται ισογονικά με ένζυμα που δεν έχουν αντίστοιχες αλλαγές (π.χ. *E. cloacae* P99) φαίνεται ότι προσδίδουν αυξημένη αντοχή στα οξυίμινο υποστρώματα ενώ παρουσιάζουν και αυξημένη ταχύτητα υδρόλυσης (Kim J. Y. και συν., 2006). Κρυσταλλογραφία αυτού του ενζύμου σε ελεύθερη κατάσταση έδειξε ότι η σχετική τοποθέτηση της H10 α-έλικας με την H11 δημιουργούν μεγαλύτερη αύλακα για την πρόσδεση των R2 πλευρικών αλυσιδών σε σχέση με την P99 κεφαλοσπορινάση (Kim J. Y. και συν., 2006). Στην κρυσταλλογραφική δομή της CMY-10 η περιοχή μεταξύ της R2 θηλειάς και της B2g β-αλυσίδας είναι αποδιεταγμένη γεγονός που πιθανότατα δηλώνει αυξημένη ευελιξία και δυνατότητα για πολλές διαμορφώσεις της συγκεκριμένης επικράτειας (Εικόνα 29B). Φαίνεται δηλαδή ότι και σε αυτήν την περίπτωση η ευελιξία του μορίου έχει κάποιο ρόλο στη λειτουργία των ενζύμων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων κλινικά σημαντικές β-λακταμάσες των μοριακών τάξεων C και A διευρύνουν το φάσμα τους ώστε να υδρολύουν τα νεώτερα β-λακταμικά. Χαρακτηρίστηκαν οι σχέσεις δομής-λειτουργίας φυσικών ποικιλιών των ενζύμων τύπου CMY-2 και GES. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται παρακάτω.

Η ύπαρξη φυσικού ενζύμου πλασμιδιακής κεφαλοσπορινάσης CMY-2 που έφερε την υποκατάσταση Val211Gly (CMY-30, εικόνα 26, γενικό μέρος σελ. 142) το οποίο παράγονταν από κλινικό στέλεχος *E. coli* που απομονώθηκε στη Νέα Ζηλανδία το 2008 έδειξε ότι ενδεχομένως δυνατότητα για διεύρυνση φάσματος υπάρχει και σε αυτή τη διαδεδομένη κατηγορία επίκτητων AmpC. Όπως αναφέρθηκε (γενικό μέρος σελ. 155) η συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ένζυμο τύπου ACC-1 που έδωσε την ACC-4 (Paragiannitsis CC και συν., 2007) προκαλούσε αυξημένη υδρόλυση οξυίμινο υποστρωμάτων. Έτσι στο πρώτο σκέλος της παρούσας εργασίας εκτιμήθηκαν α) οι φαινοτυπικές αλλαγές που επάγονται από την συγκεκριμένη υποκατάσταση στη CMY-2 κλωνοποιώντας τα γονίδια των *bla*_{CMY-2} και *bla*_{CMY-30} σε πλασμιδιακά οχήματα με τέτοιο τρόπο ώστε να εκφράζονται υπό ισογονικές συνθήκες και εκτιμώντας τα επίπεδα αντοχής που παρουσιάζουν στελέχη που παρήγαγαν τις δύο κεφαλοσπορινάσες και β) ενδεχόμενες τροποποιήσεις στην καταλυτική ικανότητα των ενζύμων εκτιμώντας τις κινητικές σταθερές υδρόλυσης στην κατάσταση ισορροπίας κατά την αλληλεπίδραση με β-λακταμικά υποστρώματα (Kotsakis SD και συν., 2009). Το 2010 απομονώθηκε από κλινικό στέλεχος *E. coli* στην Γερμανία μία νέα ποικιλία της CMY-2 η οποία έφερε τη Val211Ser υποκατάσταση (CMY-42) και το ένζυμο αυτό χαρακτηρίστηκε στο εργαστήριο Βακτηριολογίας στα πλαίσια της παρούσας μελέτης εφαρμόζοντας την ίδια μεθοδολογία όπως και παραπάνω (Hentschke M και συν., 2011). Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο μεταλλάξεις προκαλούσαν διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων προς οξυίμινο υποστρώματα. Με σκοπό να διερευνηθούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πλασμιδιακές αυτές β-λακταμάσες τάξης C διευρύνουν το φάσμα τους αναλύθηκαν οι αλληλεπιδράσεις βορονικών οξέων που έφεραν τις πλευρικές αλυσίδες των οξυίμινο υποστρωμάτων κεφταζιδίμη και κεφοταξίμη (αναστολείς

καταστάσεων μετάπτωσης) με τα τρία ένζυμα εκτιμώντας τις σταθερές αναστολής με πειράματα κινητικής. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν αλλαγές στην σταθερότητα των πρωτεϊνών επαγόμενες από τις δύο υποκαταστάσεις με πειράματα θερμικής αποδιάταξης ελευθέρων ενζύμων και συμπλόκων αυτών με οξυμίμο προσδέτες (β-λακτάμες και βορονικά οξέα). Οι δομικές βάσεις της διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων εξετάσθηκαν με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποενζύμων, του ακύλ-ενζύμου της κεφταζιδίμης και του ομοιοπολικού συμπλόκου ενός βορονικού οξέος που έφερε την πλευρική αλυσίδα αυτής. Η παραπάνω ανάλυση ανέδειξε πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα παραπάνω κλινικά σημαντικά ένζυμα τάξης C μπορούν να υδρολύσουν τρίτης γενεάς κεφαλοσπορίνες και συγγενικές με αυτές β-λακτάμες (Kotsakis SD και συν., 2011; Kotsakis SD και συν., 2013).

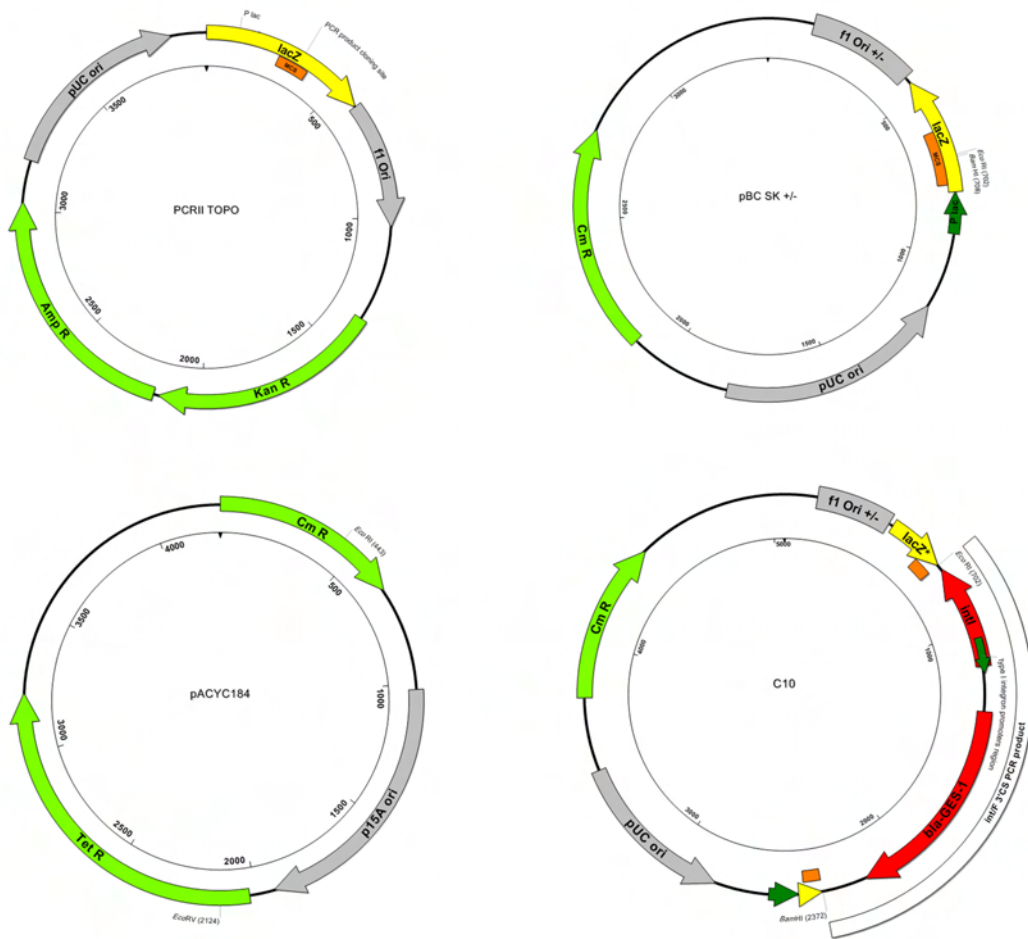
Το 2010 στο κλινικό στέλεχος *P. aeruginosa* NL68 που απομονώθηκε στην Ελλάδα ανιχνεύθηκε μία νέα ποικιλία των β-λακταμασών τάξης A τύπου GES η οποία έφερε τις Glu104Lys και Gly170Asn υποκαταστάσεις (GES-13) και οι φαινοτυπικές και βιοχημικές ιδιότητές του συγκρίθηκαν με αυτές της GES-7 (Gly170, Lys104) (Kotsakis SD και συν., 2010). Μεταλλάξεις στις δύο παραπάνω θέσεις των GES σχετίζονται με αυξημένη υδρόλυση καρβαπενεμών (170) και οξυμίμο-κεφαλοσπορινών (104). Οι διάφορες ποικιλίες των ενζύμων GES με υποκαταστάσεις στις θέσεις 104 και 170 (πίνακας 8, γενικό μέρος σελ. 130) δεν είχαν συγκριθεί ποτέ υπό τις ίδιες συνθήκες ως προς τους φαινοτύπους ευαισθησίας και τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι κλινικά σημαντικές αυτές β-λακταμάσες οδηγούνται σε υψηλές καταλυτικές αποδόσεις κατά την απενεργοποίηση των καρβαπενεμών και κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς παρέμεναν άγνωστοι. Έτσι τα γονίδια των GES-1 (Glu104, Gly170), GES-2 (Glu104, Asn170), GES-5 (Glu104, Ser170), GES-6 (Lys104, Ser170), GES-7 (Lys104, Gly170) και GES-13 (Lys104, Asn170) παρήχθησαν υπό ισογονικές συνθήκες σε εργαστηριακά στελέχη *E. coli* και διερυνήθηκαν οι φαινοτυπικές ιδιότητες του κάθε ενζύμου ενώ έπειτα από καθαρισμό τους εκτιμήθηκαν οι κινητικές σταθερές στην κατάσταση ισορροπίας κατά την αλληλεπίδραση με β-λακτάμες. Οι διαφορές σε επίπεδο δομής εξετάσθηκαν με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η ανάλυση αυτή επέτρεψε την αποκάλυψη κάποιων σχέσεων δομής-λειτουργίας των φυσικών μεταλλάξεων στις θέσεις 104 και 170 (Kotsakis SD και συν., 2011). Η θέση 104

χαρακτηρίστηκε περαιτέρω με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση θέσης επιλέγοντας την εισαγωγή αμινοξέων που απαντούν σε άλλα φυσικά ένζυμα τάξης A και εκτιμήθηκαν οι αλλαγές που επάγονται στα επίπεδα ευαισθησίας κατά την αναστολή βακτηρίων που παρήγαγαν τους εργαστηριακούς αυτούς μεταλλάκτες υπό ισογονικές συνθήκες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδιακά οχήματα

Τα εργαστηριακά στελέχη *E. coli* DH5a [*supE44* Δ *lacU169* (φ80*lacZ*Δ*M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] και *E. coli* MC100 (Δ *ampC*) χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες για τα πλασμιδιακά παράγωγα των οχημάτων TOPO PCRII (Amp^R , Kan^R), pBC-SK+/- (Cm^R) και pACYC-184 (Cm^R , Tet^R) που έφεραν τα κλωνοποιημένα γονίδια β-λακταμασών (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Πλασμιδιακά οχήματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα κλωνοποίησης. Το παράγωγο C10 είχε προκύψει από κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR με τους εκκινητές *IntF* και *3'CS* (πίνακας 1) στις *EcoRI* και *BamHI* θέσεις της περιοχής διασύνδεσης του pBC-SK (+/-) (Mavroidi A. και συν., 2001).

Ως πηγή του γονιδίου *bla_{CMY-2}* χρησιμοποιήθηκε ο εργαστηριακός κλώνος *E. coli* EC1-00-7490 (στέλεχος *E. coli* 1R716 διασυζευγμένο με φυσικό πλασμίδιο που έφερε την περιοχή *ISEcp1-bla_{CMY-2}-blc-sugE*). Ως πηγή του γονιδίου *bla_{GES-1}* για την δημιουργία κλώνων που παρήγαγαν τις διάφορες ποικιλίες GES υπό ισογονικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκε μετασχηματισμένο στέλεχος *E. coli* DH5a με πλασμίδιο παράγωγο του οχήματος pBC-SK (+/-) που έφερε την περιοχή *Int11-bla_{GES-1}* (C10, εικόνα 1).

B. Χημικές ουσίες, θρεπτικά υλικά και αντιβιοτικά

Οι περισσότερες χημικές ουσίες προέρχονταν από την εταιρεία Sigma και ήταν αναλυτικής καθαρότητας, στην περίπτωση διαφορετικού προμηθευτή αυτός θα δηλώνεται σε παρένθεση.

Για τις καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά:

α. McConkey άγαρ (Scharlau)

Πεπτόνη ζελατίνης	17 g/L
Πεπτόνη κρέατος	1,5 g/L
Πεπτόνη καζεΐνης	1,5 g/L
Λακτόζη	10 g/L
Χολικά άλατα	1,5 g/L
NaCl	5,0 g/L
Δείκτης pH (neutral red)	0,030 g/L
Crystal violet (αναστολέας Gram +)	0,001 g/L
Άγαρ	15 g/L
pH 7,1 ±0,2 στους 25 °C	

β. Luria-Bertani (LB) άγαρ (Scharlau)

Πεπτόνη καζεΐνης	10 g/L
Εκχύλισμα ζύμης	5 g/L
NaCl	10 g/L
Άγαρ	15 g/L
pH 7,2 ±0,2 στους 25 °C	

γ. Mueller-Hinton (MH) άγαρ (Scharlau)

Πεπτόνη	17,5 g/L
Στερεά εκχυλίσματος κρέατος	2 g/L
Αμυλο	1,5 g/L
Άγαρ	17 g/L
pH 7,3 ±0,2 στους 25 °C	

δ. Ζωμός LB (Scharlau)

Πεπτόνη καζεΐνης	10 g/L
Εκχύλισμα ζύμης	5 g/L
ρΗ 7,2 ±0,2 στους 25 °C	

ε. Ζωμός MH (Scharlau)

Πεπτόνη	17,5 g/L
Στερεά εκχυλίσματος κρέατος	2 g/L
Άμυλο	1,5 g/L
ρΗ 7,3 ±0,2 στους 25 °C	

στ. Ζωμός Tryptic-Soy (TSB) (Scharlau)

Πεπτόνη καζεΐνης	17 g/L
Πεπτόνη σόγιας	3 g/L
Δεξτρόζη	2,5 g/L
NaCl	2,5 g/L
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L
ρΗ 7,3 ±0,2 στους 25 °C	

Τα παραπάνω θρεπτικά υλικά ήταν αφυδατωμένα σε μορφή σκόνης και η παρασκευή τους γίνονταν με ανασύσταση σε κατάλληλη ποσότητα νερού ενώ ακολουθούσε αποστείρωση στους 121 °C για 20 min σε αυτόκαυστο. Για την παρασκευή υλικών επιλογής ανθεκτικών βακτηρίων τα παραπάνω θρεπτικά υλικά εμπλουτίζονταν με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικών. Η προσθήκη των αντιβιοτικών γίνονταν μετά την αποστείρωση και αφού η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού ήταν < 50 °C.

Για τον έλεγχο ευαισθησίας με τη μέθοδο Kirby-Bauer χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι αντιβιοτικών της εταιρείας BioRad ενώ για τον προσδιορισμό των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) με τη μέθοδο E-test χρησιμοποιήθηκαν ταινίες με διαβαθμιζόμενη συγκέντρωση αντιβιοτικών της εταιρείας BioMerieux. Τα αντιβιοτικά σε μορφή σκόνης που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμπλουτισμό των θρεπτικών υλικών, για τον προσδιορισμό των MIC με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων και για τον φασμαφωτομετρικό προσδιορισμό των ταχυτήτων υδρόλυσης προέρχονταν από διάφορες εταιρίες και συγκεκριμένα ήταν: αμοξικιλίνη (GlaxoSmithKline), πενικιλίνη G (Sigma), κεφαλοθίνη (Serva), κεφουροξίμη (Serva), κεφακλόρ (Serva), κεφοταξίμη (Sigma), κεφαζιδίμη (Sigma), κεφεπίμη (Sigma), κεφοξιτίνη (Serva), αζτρεονάμη

(Sigma), μιπενέμη/σιλαστατίν (Merck Sharp & Dohme), κλαβουλανικό Li⁺ (Glaxo, σουλβακτάμη (Sigma), ταζοβακτάμη (Sigma). Η χρωμογόνος κεφαλοσπορίνη πρώτης γενεάς νιτροσεφίνη προέρχονταν από την εταιρεία Oxoid (ThermoFischer Scientific).

Γ. Τροποποιητικά ένζυμα DNA, δέοξυ-ολιγονουκλεοτίδια και ηλεκτροφόρηση DNA

Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση τμημάτων DNA καταλύθηκαν από την GoTaq DNA πολυμεράση της εταιρείας Promega. Στις αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR για την εισαγωγή των επιθυμητών μεταλλάξεων στα γονίδια των β-λακταμασών χρησιμοποιήθηκε η υψηλής πιστότητας και θερμικά σταθερή *PfuTurbo* DNA πολυμεράση της εταιρείας Stratagene. Η δημιουργία τυφλών άκρων σε τμήματα DNA τα οποία είχαν προκύψει από τη δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών που δημιουργούν κολλώδη άκρα στα οποία προεξέχει η 5' αλυσίδα καταλύθηκε από το Klenow θραύσμα της DNA πολυμεράσης I του *E. coli* της εταιρείας New England Biolabs. Οι αντιδράσεις διασύνδεσης κολλωδών άκρων DNA καταλύθηκαν από την DNA λιγάση του T4 βακτηριοφάγου της εταιρείας Fermentas ενώ αυτές μεταξύ τυφλών άκρων από το αντίστοιχο ένζυμο της εταιρείας New England Biolabs. Στις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα που παρέχονταν από τον εκάστοτε κατασκευαστή.

Η κατάτμηση του DNA κατά την κλωνοποίηση και τον έλεγχο της κατεύθυνσης εισόδου των κλωνοποιημένων τμημάτων στα πλασμιδιακά οχήματα καταλύθηκε τα παρακάτω ένζυμα:

α. EcoRI	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'	5' προεξέχοντα κολλώδη άκρα
β. BamHI	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'	5' προεξέχοντα κολλώδη άκρα
γ. EcoRV	5'-GAT ATC-3' 3'-CTA TAG-5'	τυφλά άκρα
δ. PstI	5'-CTGCA G-3' 3'-G ACGTC-5'	3' προεξέχοντα κολλώδη άκρα
ε. DraI	5'-TTT AAA-3' 3'-AAA TTT-5'	τυφλά άκρα

Τα παραπάνω ένζυμα προέρχονταν από την εταιρεία New England Biolabs και οι αντιδράσεις έγιναν σε ρυθμιστικά διαλύματα που παρέχονταν από τον κατασκευαστή.

Η πέψη του πλασμιδίου που χρησιμοποιούνταν ως μήτρα στις αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR ώστε να επιλεγούν στη συνέχεια μόνο τα προϊόντα της αντίδρασης, έγινε με την περιοριστική ενδονουκλεάση DpnI η οποία αναγνωρίζει την παλίνδρομη αλληλουχία 5'-GATC-3' και "κόβει" μεταξύ A και T όταν η βάση αδενίνης είναι μεθυλωμένη από την δράση βακτηριακών μεθυλοτρανσφερασών. Το ένζυμο προέρχονταν είτε από την εταιρεία Stratagene είτε από τη New England Biolabs.

Κατά τις αντιδράσεις ενίσχυσης τμημάτων DNA με PCR, τις αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR και τις αντιδράσεις αλληλούχησης των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που φαίνονται στον πίνακα 1 και συντέθηκαν στα κατάλληλα επίπεδα καθαρότητας από την εταιρεία Invitrogen.

Οι ηλεκτροφορήσεις DNA γίνονταν σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Invitrogen (*molecular biology grade*). Κατά την απομόνωση και καθαρισμό προϊόντων πέψης χρησιμοποιήθηκε η αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως SeaPlaque (FMC). Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5X TBE (Tris-Βορικό Οξύ- EDTA) το οποίο παρασκευάζονταν από διάλυμα 10X που περιείχε στο 1 λίτρο 108 gr Tris, 55 gr βορικού οξέος και 40 ml EDTA 0,5 M pH 8. Κατά την απομόνωση των υπό κλωνοποίηση τμημάτων η ρύθμιση pH και η παροχή ιόντων έγιναν από διάλυμα 1X TAE (Tris-Οξικό Οξύ- EDTA) το οποίο παρασκευάζονταν από διάλυμα 50X που στο 1 λίτρο περιείχε 242 g Tris, 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M pH 8. Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμειγνύονταν 5:1 με 6X διαλύματος φόρτωσης το οποίο περιείχε 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% xylene cyanol FF και 30% v/v γλυκερόλης. Τα δείγματα φορτώνονταν στο πήκτωμα αγαρόζης (συνήθως 1% και στην περίπτωση πλασμιδίων μεγάλου μεγέθους 0,8%) σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης Centipede Owl Scientific. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας που περιείχε τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών και ποσότητας (1 Kb ladder της εταιρείας Fermentas). Η ηλεκτροφόρηση γίνονταν σε σταθερό ρεύμα έντασης 25 - 30 mA για χρονικό διάστημα κατάλληλο για τον διαχωρισμό των υπό μελέτη μορίων.

Πίνακας 1: Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Στόχος	DNA αναφοράς	Εφαρμογή	Μέθοδος καθαρισμού	T_m
ISEcp1/F2	GTTGCTCTGTGGATAACTTG	1551-1570	DQ164214	PCR <i>bla</i> _{CMY-2} περιοχής	DSL	58 ^β
Blc/R	GACAACCAGGAATGCAGC	3120-3137(-)	DQ164214	PCR <i>bla</i> _{CMY-2} περιοχής	DSL	56
E7	TTGCCAGCATCACGATGCCAAGGT	2905-2928(-)	DQ164214	Αλληλούχηση <i>bla</i> _{CMY}	DSL	74
E8	CCAGGATATTGGGCCTC	3007-3023	DQ164214	Αλληλούχηση <i>bla</i> _{CMY}	DSL	54
IntF	CGTTCATACAGAAGCTG	721-738	AF156486	Αλληλούχηση <i>bla</i> _{GES}	DSL	54
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA	5847-5863(-)	AF156486	Αλληλούχηση <i>bla</i> _{GES}	DSL	50
M13F	GTAAAACGACGGCCAG			Αλληλούχηση TOPO PCR II	DSL	50
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC			Αλληλούχηση TOPO PCR II	DSL	50
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA			Αλληλούχηση pBC-SK(+/-)	DSL	56
T7	TAATACGACTCACTATAGGG			Αλληλούχηση pBC-SK(+/-)	DSL	56
CMY_V211G-F ^β	GAAGGGAAGCCCGTACACGG*TTCTCCGGGACAACCTTGAC ^a	2520-2558	DQ164214	Val211Gly υποκατάσταση στην CMY-2	HPLC	86 ^γ
CMY_V211G-R	GTCAAGTTGTCCCGGAGAA*CGTGTACGGGCTTCCCTTC			Val211Gly υποκατάσταση στην CMY-2	HPLC	
CMY_V211S-F	AAGGGAAGCCCGTACACA*G*TTCTCCGGGACAACCTT	2521-2555	DQ164214	Val211Ser υποκατάσταση στην CMY-2	HPLC	79
CMY_V211S-R	AAGTTGTCCCGGAGAA*G*TTGTGTACGGGCTTCCCTT			Val211Ser υποκατάσταση στην CMY-2	HPLC	
GES_G170N-F	CCGAAAGAGCCGGAGATGA* A *CGACAACACACCTGGCGAC	1805-1844	AF156486	Gly170Asn υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	84
GES_G170N-R	GTCGCCAGGTGTGTGTGTG GT *CATCTCCGGCTCTTTCCGG			Gly170Asn υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_G170S-F	CGGAAAGAGCCGGAGATGA* G *GACAACACACCTGGCG	1806-1842	AF156486	Gly170Ser υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	86
GES_G170S_R	CGCCAGGTGTGTGTG GCT *CATCTCCGGCTCTTTCCG			Gly170Ser υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_E104K-F	GGGCCGACATGATCGTCA* AA TGGTCTCCTGCCACGG	1605-1641	AF156486	Glu104Lys υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	86
GES_E104K-R	CCGTGGCAGGAGACCA TTT *GACGATCATGTCCGGCCC			Glu104Lys υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_E104R-F	CCGACATGATCGTCA* G *TGGTCTCCTGCCACGG	1608-1641	AF156486	Glu104Arg υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	79
GES_E104R-R	CCGTGGCAGGAGACCAC* C *T*GACGATCATGTCCGG			Glu104Arg υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_E104P-F	GCCGGACATGATCGTCC* C *G*TGGTCTCCTGCCACGG	1607-1641	AF156486	Glu104Pro υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	82
GES_E104P-R	CCGTGGCAGGAGACCAC* G *G*GACGATCATGTCCGGC			Glu104Pro υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_E104A-F	GCCGGACATGATCGTCC* G *ATGGTCTCCTGCCACG	1607-1640	AF156486	Glu104Ala υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	85
GES_E104A-R	CGTGGCAGGAGACCA TG *CGACGATCATGTCCGGC			Glu104Ala υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_E104N-F	CGGACATGATCGTCA* AC *TGGTCTCCTGCCACGG	1609-1641	AF156486	Glu104Asn υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	80
GES_E104N-R	CCGTGGCAGGAGACCAG* TT *GACGATCATGTCCG			Glu104Asn υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	
GES_E104Y-F	GCCGGACATGATCGTCT* AT *TGGTCTCCTGCCACGG	1607-1641	AF156486	Glu104Tyr υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	81
GES_E104Y-R	CCGTGGCAGGAGACC AA * TA *GACGATCATGTCCGGC			Glu104Tyr υποκατάσταση στην GES-1	HPLC	

^a Τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια δηλώνουν το κωδικόνιο του αμινοξέος που μεταλλάσσεται ενώ ο αστερίσκος μετά από κάθε νουκλεοτίδιο δηλώνει το νουκλεοτίδιο που τροποποιείται κατά την αντίδραση μεταλλαξογένεσης.

^β Θερμοκρασίες τήξης υπολογισμένες σύμφωνα με την σχέση $T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)$.

^γ Οι θερμοκρασίες τήξης των εκκινητών μεταλλαξογένεσης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την σχέση $T_m = 81,5 + 0,41 \cdot \%GC - \frac{675}{N} - \%Mismatches$ ακολουθώντας τις οδηγίες του κίτ

QuickChange Mutagenesis της Stratagene. Θα πρέπει $T_m \geq 78$ °C.

Δ. Μέθοδοι προσδιορισμού επιπέδων ευαισθησίας σε β-λακταμικά (CLSI, 2008)

i. Μέθοδος Kirby-Bauer

Η μέθοδος *Kirby-Bauer* ή μέθοδος διάχυσης σε άγαρ αντιβιοτικών που περιέχονται σε δίσκους σε κατάλληλες ποσότητες παρέχει μία ποιοτική εκτίμηση των φαινοτύπων ευαισθησίας. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή και τον φαινοτυπικό έλεγχο των κλώνων *E. coli* που παρήγαγαν τις διάφορες ποικιλίες β-λακταμασών κατά τα στάδια κλωνοποίησης και μεταλλαξογένεσης των αντίστοιχων γονιδίων. Η εφαρμογή της μεθόδου έγινε ως εξής:

1. Παρασκευή εναιωρήματος σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (0,9% v/v NaCl) εμβολιάζοντας 2-3 απομονωμένες αποικίες από τρυβλία με McConkey άγαρ όπου είχαν καλλιεργηθεί τα βακτήρια την προηγούμενη ημέρα.
2. Ρύθμιση της πυκνότητας του εναιωρήματος των βακτηρίων ώστε η θολρότητα να αντιστοιχεί σε 0,5 MacFarland ($1,5 \cdot 10^8$ cfu/ml) με την χρήση θολοσίμετρου (Biomerieux) ή με οπτική παρατήρηση συγκρίνοντας το παρασκεύασμα με πρότυπο διάλυμα $H_2SO_4/BaCl_2$.
3. Εμβολιασμός ποσότητας του εναιωρήματος με την χρήση βαμφακοφόρου στείλεου σε τετράγωνο τρυβλίο που περιείχε Mueller-Hinton άγαρ με ομοιόμορφο τρόπο ώστε το εναιώρημα να καλύπτει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.
4. Τοποθέτηση των δίσκων αντιβιοτικών με την χρήση αυτόματου διανεμητή. Οι δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι αμοξικιλίνη (30 μg), αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (20 μg/10 μg), τικαρκιλίνη (75 μg), τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό οξύ (75 μg/25 μg), πιπερακιλλίνη (100 μg), πιπερακιλλίνη/ταζοβακτάμη (100 μg/10 μg), κεφοταξίμη (30 μg), κεφτριαξόνη (30 μg), κεφταζιδίμη (30 μg), κεφεπίμη (30 μg), κεφπιρόμη (30 μg), κεφοξιτίνη (30 μg), αζτρεονάμη (30 μg), ιμιπενέμη (10 μg) και μεροπενέμη (10 μg). Η διάταξη των αντιβιοτικών επέτρεπε την εμφάνιση συνεργιών επί της αναστολής των βακτηρίων μεταξύ των αναστολέων αυτοκτονίας και των κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς χαρακτηριστικών για την φαινοτυπική ανίχνευση των ΕΦΒΛ. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι γλωραμφενικόλης (30 μg) και τετρακυκλίνης (30 μg) για τον έλεγχο ευαισθησίας

των μετασχηματισμένων κλώνων οι οποίοι φέρουν πλασμιδιακά οχήματα που κωδικοποιούν για τα αντίστοιχα γονίδια αντοχής τα πλασμιδιακά οχήματα.

5. Επώαση στους 36 °C για 16 - 18 ώρες.

6. Μέτρηση της διαμέτρου των διαφανών ζωνών αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων που εμφανίζονται ομόκεντρα με τους δίσκους των αντιβιοτικών.

ii. Προσδιορισμός MIC με τη μέθοδο E-test

Ο προσδιορισμός των ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων που χαρακτηρίζουν τα διάφορα αντιβιοτικά κατά την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων παρέχει μία ποσοτική εκτίμηση του βαθμού ευαισθησίας αυτών. Η σύγκριση των επιπέδων αντοχής που οφείλονταν στην παραγωγή των εξεταζόμενων ποικιλιών β-λακταμασών υπό ισογονικές συνθήκες έγινε με προσδιορισμό των MIC. Κατά τον προσδιορισμό των MIC με τη μέθοδο E-test χρησιμοποιούνται προτυποποιημένες ταινίες κατάλληλα τιτλοδοτημένες με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Οι ταινίες τοποθετούνται σε ΜΗ άγαρ το οποίο έχει εμβολιαστεί με βακτήρια όπως και κατά τη μέθοδο Kirby-Bauer. Χρησιμοποιήθηκαν στρογγυλά τρυβλία και σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνταν ακτινωτά 8 ταινίες αντιβιοτικών. Έπειτα από 16 ώρες επώασης στους 36 °C ακολουθούσε παρατήρηση των τρυβλίων και καταγραφή των αποτελεσμάτων με την τιμή MIC να αντιστοιχεί στο σημείο τομής της άλω αναστολής με την ταινία E-test.

iii. Προσδιορισμός MIC με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων

Η μέθοδος αυτή προσφέρει την δυνατότητα για έλεγχο μεγαλύτερου εύρους συγκεντρώσεων αντιβιοτικών. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Αναδιάλυση λυόφιλων αντιβιοτικών σε ζωμό Mueller-Hinton σε συγκέντρωση διπλάσια της μέγιστης συγκέντρωσης που θα χρησιμοποιηθεί. Η μέγιστη τελική συγκέντρωση για όλα τα αντιβιοτικά ήταν $4.096 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ και τα αρχικά εναιωρήματα των αντιβιοτικών είχαν συγκέντρωση $8.192 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2. Προσθήκη 100 μL από το πυκνό εναιώρημα κάθε αντιβιοτικού στην πρώτη θέση κάθε σειράς μικροπλάκας ELISA (αποστειρωμένη και με πλαστικό κάλυμμα). Στις υπόλοιπες θέσεις κάθε σειράς και σε αυτές μίας δεύτερης μικροπλάκας είχαν τοποθετηθεί 50 μL ζωμού ΜΗ εκτός από τις σειρές όπου ελέγχονταν οι συνδυασμοί αμοξικιλίνης και

τικαρκιλλίνης με κλαβουλανικό οξύ όπου είχαν τοποθετηθεί 45 μL . Στην συνέχεια 50 μL από την πρώτη θέση κάθε σειράς μεταφέρονταν στην δεύτερη αναδεύονταν καλά και έπειτα 50 μL από τη δεύτερη μεταφέρονταν στην τρίτη κ.ο.κ. μέχρις ότου να γίνουν 16 διαδοχικές αραιώσεις με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού να υποδιπλασιάζεται σε κάθε μία. Στις σειρές που είχαν αρχικά προστεθεί 45 μL ζωμού MH έπειτα από τις διαδοχικές αραιώσεις προστίθονταν 5 μL διαλύματος κλαβουλανικού οξέος $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ σε κάθε θέση.

3. Προετοιμασία του εναιωρήματος των βακτηρίων. Τα κύτταρα *E. coli* είχαν αναπτυχθεί σε υγρές καλλιέργειες σε ζωμό MH μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να είναι $0,25 (2\cdot 10^8 \text{ cfu/ml})$. Στη συνέχεια ακολουθούσε 200 φορές αραιώση σε ζωμό MH (10^6 cfu/ml) και έπειτα 50 μL του εναιωρήματος ($5\cdot 10^4 \text{ cfu}$) προστίθονταν σε κάθε θέση της μικροπλάκας ELISA. Επίσης η ίδια ποσότητα εναιωρήματος προστίθονταν σε 50 μL MH χωρίς αντιβιοτικό (θετικός μάρτυρας) ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκαν ποσότητα 100 μL MH που δεν εμβολιάστηκε καθώς και 100 μL MH με αραιωμένο αντιβιοτικό που επίσης δεν εμβολιάστηκε. Με αυτή την διαδικασία στις θέσεις της μικροπλάκας (100 μL) προέκυψαν συγκεντρώσεις αντιβιοτικών εύρους $4,096 - 0,063 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ενώ η συγκέντρωση του κλαβουλανικού οξέος στους αντίστοιχους συνδυασμούς ήταν $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ και η πυκνότητα των βακτηρίων $5\cdot 10^5 \text{ cfu/ml}$.

4. Επώαση στους 36°C για 16 - 18 ώρες.

5. Ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών όπου παρατηρούνταν βακτηριακή ανάπτυξη εκτιμώμενη βάσει της εμφάνισης θολερότητας στο εναιώρημα. Η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού όπου δεν παρατηρούνταν βακτηριακή αύξηση αντιστοιχούσε στην τιμή MIC.

E. Τεχνικές απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

i. Απομόνωση μεγάλης κλίμακας με αλκαλική λύση και κατακρήμνιση σε φωσφοενολογλυκόλη (Large prep). (Maniatis και συν., 1982)

α. Διαλύματα και ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν:

1. 20 % w/v D-γλυκόζης
2. 10 % w/v SDS
3. 0,5 M EDTA pH 8,0

4. 1 M Tris/HCl pH 8,0
5. 10 N NaOH
6. 5 M οξικού καλίου
7. Οξικό οξύ πεπαγμένο
8. Ισοπροπανόλη
9. 5 M LiCl
10. 13% v/v φωσφοενελογλυκόλη (PEG 8000), 1,6 M NaCl
11. Διάλυμα TE pH 8 (10 mM Tris/HCl, 2,5 mM EDTA)
12. 20 µg/ml παγκρεατική RNAάση σε TE pH 8
13. Φαινόλη εξισορροπημένη σε Tri/HCl pH 7.5
14. Χλωροφόρμιο
15. 10 M οξικό αμμώνιο
16. Αιθανόλη απόλυτη

Τα υδατικά διαλύματα ήταν αποστειρωμένα σε αυτόκαυστο.

β. Διαδικασία

1. Τα βακτήρια που περιείχαν το προς απομόνωση πλασμίδιο αναπτύσσονταν ολονύκτια σε 500 ml ζωμού LB στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Στην περίπτωση που το πλασμίδιο περιείχε γονίδιο β-λακταμάσης το θρεπτικό υλικό εμπλουτιζόταν με 50 µg/ml αμοξικιλίνης ενώ στην περίπτωση απομόνωσης των πλασμιδιακών οχημάτων pBC-SK και pACYC-184 με 20 µg/ml χλωραμφενικόλης.
 2. Κατακρήμνιση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm σε φυγόκεντρο Sorvall RC-5B
 3. Αναδιάλυση του ιζήματος των βακτηρίων σε 20 ml διαλύματος που περιείχε
 - 50 mM γλυκόζη
 - 25 mM Tris/HCl pH 8
 - 50 mM EDTA pH 8
- Το διάλυμα αυτό (διάλυμα I) παρασκευάζονταν από τα α.1, α.3 και α.4 με ανάμειξη κατάλληλων ποσοτήτων π.χ. για παρασκευή 100 ml χρησιμοποιήθηκαν 5 ml α.1, 10 ml α.3 και 2,5 ml α.4
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

5. Προσθήκη 40 ml διαλύματος που περιείχε

0,2 N NaOH

1% SDS

και ελαφρά ανάδευση αναστρέφοντας τον σωλήνα φυγοκέντρωσης. Το διάλυμα αυτό (διάλυμα II) παρασκευάζονταν από τα α.2 και α.5 π.χ. για την παρασκευή 100 ml χρησιμοποιήθηκαν 2 ml α.5 και 10 ml α.2.

6. Επώαση σε πάγο για 10 min. Κατά την επίδραση των διαλυμάτων I και II τα βακτηριακά κύτταρα λύνονται και τα συστατικά τους απελευθερώνονται στο διάλυμα ενώ το αλκαλικό pH επάγει την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA με απομάκρυνση των μορίων νερού και αντικατάσταση από ιόντα Na^+ . Η διαλυτότητα των νουκλεϊκών οξέων μειώνεται και στο διάλυμα εμφανίζεται μία γέλη που αντιστοιχεί στα αφυδατωμένα αυτά μόρια. Όσο περισσότερο επιδράσει το αλκαλικό διάλυμα τόσο πιο εκτεταμένη θα είναι η αποδιάταξη. Τα μεγάλα μόρια DNA (π.χ. χρωμόσωμα ή πλασμίδια >200 Kb) κατά το στάδιο της επαναδιάταξης που ακολουθεί με εξουδετέρωση δε θα καταφέρουν να αποκτήσουν τη σωστή τοπολογία και στο μεγαλύτερο μέρος τους θα παραμείνουν αποδιεταγμένα ενώ τα μικρότερα μόρια (π.χ. πλασμίδια <200 Kb) θα επαναδιαταχθούν πλήρως αρκεί η επώαση να μην ξεπεράσει τα 10 λεπτά και να γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία.

7. Προσθήκη 45 ml παγωμένου διαλύματος που περιέχει

3 M K^+

5 M CH_3COO^-

και ανάδευση όπως στο βήμα 5. Το διάλυμα αυτό (διάλυμα III) παρασκευάζεται από τα α.6 και α.7 και για παρασκευή 500 ml χρησιμοποιούνται 300 ml 5 M CH_3COOK και 58 ml CH_3COOH . Το όξινο αυτό διάλυμα εξουδετερώνει το αλκαλικό pH στο παρασκεύασμα επάγοντας την επαναδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων ενώ παράλληλα κροκιδώνει τις πρωτεΐνες (ο μηχανισμός είναι αντίστοιχος με αυτόν για τα μεγάλα μόρια DNA).

8. Επώαση για 30 min σε πάγο. Το διάστημα επώασης επιμηκύνονταν όταν η γέλη των νουκλεϊκών οξέων δεν είχε διαλυθεί πλήρως.

9. Φυγοκέντρηση για 60 min σε 10000 rpm στους 4 °C σε φυγόκεντρο Sorvall Στο στάδιο αυτό τα μη επαναδιαταγμένα νουκλεϊκά οξέα, οι κροκιδωμένες πρωτεΐνες και οι βακτηριακές μεμβράνες κατακρημνίζονται.
10. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης και προσθήκη 0,6 όγκων ισοπροπανόλης [(20 ml + 40 ml + 45 ml =105 ml)x0,6 = 63 ml ισοπροπανόλης]. Σε αυτό το στάδιο κατακρημνίζονται τα νουκλεϊκά οξέα λόγω της αλλαγής του συντελεστή διαλυτότητας. Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων με φυγοκέντρηση για 30 min σε 10000 rpm σε φυγόκεντρο Sorvall RC-5B (κεφαλή GSA).
12. Απόρριψη του υπερκειμένου, στέγνωμα του ιζήματος και στη συνέχεια αναδιάλυση σε 3 ml διαλύματος TE pH 8 και μεταφορά σε μικρότερο σωλήνα φυγοκέντρησης.
13. Προσθήκη 3 ml διαλύματος 5 M LiCl. Επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 min σε φυγόκεντρο Sorvall RC-5B (κεφαλή SS34). Κατά το παραπάνω στάδιο κατακρημνίζονται μόρια RNA.
14. Προσθήκη ίσου όγκου (6 ml) ισοπροπανόλης και ανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων με φυγοκέντρηση 10 min στις 10000 rpm.
15. Απόρριψη του υπερκειμένου, στέγνωμα του ιζήματος και αναδιάλυση σε 500 µl διαλύματος α.12 που περιέχει την παγκρεατική RNAάση. Πέψη για 1 ώρα στους 37 °C ή ολονύκτια σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Προσθήκη 500 µl διαλύματος 13% v/v PEG, 1,6 M NaCl καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min στους 4 °C σε φυγόκεντρο Eppendorf 5417-R. Στο στάδιο αυτό κατακρημνίζεται το πλασμιδιακό DNA ενώ το υπολείμματα χρωμοσωμικού και μορίων RNA παραμένουν στο διάλυμα.
17. Απόρριψη του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 400 µl TE.
18. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης, σύντομη και ήπια ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min.

19. Ανάκτηση της υδατικής φάσης αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση (μεταξύ φαινόλης και νερού) στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται ισχυρά στο DNA και απομακρύνθηκαν με την παραπάνω εκχύλιση.
20. Εκχύλιση με ίσο όγκο χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 18.
21. Ανάκτηση υδατικής φάσης, προσθήκη 100 μl 10 M CH₃COONH₄ και 2 όγκων παγωμένης αιθανόλης (~1 ml). Επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 min στους 4 °C.
22. Απόρριψη υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος σε αντλία κενού υπό φυγοκέντρηση (σύστημα Speed-Vac) για 5 min.
23. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μl TE και ηλεκτροφόρηση 10μl σε πήκτωμα αγαρόζης (1% ή 0,8% σε περίπτωση πλασμιδίων μεγάλου μεγέθους) για ~3 ώρες στα 30 mA σε διάλυμα 0,5X TBE. Ελέγχεται το μέγεθος και η ακεραιότητα των απομονωθέντων πλασμιδίων καθώς και η διαμόρφωσή τους (συνήθως για κάθε πλασμίδιο παρατηρούνται 3 ζώνες που αντιστοιχούν στους διαφορετικούς βαθμούς υπερελίκωσης του μορίου με τη διαμόρφωση του υψηλού βαθμού υπερελίκωσης να είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν το απομονωθέν πλασμίδιο είναι αναδιπλωμένο σωστά).
24. Εκτίμηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 και στα 280 nm σε φασματοφωτόμετρο HITACHI U-2001 UV/Vis. Το παρασκεύασμα αραιώνονταν 100 φορές και από την απορρόφηση στα 260 nm προσδιορίζονταν η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA σύμφωνα με τη σχέση $A^{260 \text{ nm}} = 1 \rightarrow [\text{pDNA}] = 50 \text{ μg/ml}$, ενώ η καθαρότητα εκτιμούνταν βάσει του πηλίκου $A^{260 \text{ nm}} / A^{280 \text{ nm}}$ το οποίο όταν είναι μεγαλύτερο από 1,7 δηλώνει μικρό ποσοστό δεσμευμένων πρωτεϊνών και υψηλή καθαρότητα.

ii. Απομόνωση μικρής κλίμακας με βρασμό (Mini prep) (Maniatis και συν., 1982)

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για την απομόνωση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που προκύπτουν από πειράματα κλωνοποίησης ώστε να χαρακτηριστούν τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν μέσω πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η καθαρότητα των παρασκευασμάτων που προκύπτουν με την

τεχνική αυτή δεν είναι υψηλή αλλά λόγω του μικρού αριθμού σταδίων που περιλαμβάνει είναι κατάλληλη για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού κλώνων.

α. Διαλύματα και ουσίες που απαιτούνται:

1. Διάλυμα STET το οποίο περιέχει.
 - 8% w/v σουκρόζη
 - 5% v/v TritonX
 - 50 mM EDTA
 - 50 mM Tris/HCl pH 8
2. 10 mg/ml λυσοζύμη σε 0,25 M Tris/HCl pH 8
3. Ισοπροπανόλη

β. Διαδικασία

1. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε 3 ml ζωμό LB εμπλουτισμένο με 50 µg/ml αμοξικιλίνη ολονύκτια στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση.
2. Κατακρήμιση των βακτηρίων από 1,5 ml καλλιέργειας με φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 5 min σε φυγόκεντρο Eppendorf.
3. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 400 µl διαλύματος STET.
4. Προσθήκη 30 µl διαλύματος λυσοζύμης.
5. Βρασμός για 60 sec σε υδατόλουτρο.
6. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min.
7. Αφαίρεση ζελατινοειδούς ιζήματος με οδοντογλυφίδα
8. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (400 µl) και επώαση για 10 min στους -20 °C.
9. Κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων με φυγοκέντρηση για 10 min στις 12000 rpm στους 0 °C.
10. Αφαίρεση του υπερκειμένου με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας παστέρ που είχε προσαρμοστεί ως ακροφύσιο σε αντλία κενού.
11. Στέγνωμα του ιζήματος σε Speed-Vac
12. Αναδιάλυση σε 100 µl H₂O
13. Ηλεκτροφόρηση 20 µl σε πήκτωμα αγαρόζης 1%

iii. Απομόνωση μικρής κλίμακας με εμπορικά διαθέσιμες στήλες δέσμευσης DNA

Για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων κατά τα πειράματα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε επίσης το εμπορικά διαθέσιμο κίτ NucleoSpin Plasmid EasyPure της εταιρείας Macherey-Nagel. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε σχετικά μεγάλο αριθμό κλώνων και η καθαρότητα των παρασκευασμάτων που προκύπτουν επιτρέπει την χρήση τους σε αντιδράσεις αλληλούχησης και μεταλλαξογόνου PCR. Χρησιμοποιούνταν βακτηριακά κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί σε υγρές καλλιέργειες ή σε στερεό θρεπτικό μέσο (LB ή MH άγαρ). Η διάσπαση των βακτηρίων έγινε μέσω αλκαλικής λύσης με διαλύματα που παρέχονταν από την εταιρεία, ακολουθούσε εξουδετέρωση, διαύγαση του παρασκευάσματος με φυγοκέντρηση και δέσμευση του πλασμιδιακού DNA σε στήλες που προσαρμόζονταν σε κεφαλή φυγοκέντρησης και περιείχαν κατάλληλο χρωματογραφικό μέσο. Ακολουθούσε πλύση με διαλύματα που παρέχονταν από την εταιρεία και έκλουση του πλασμιδιακού DNA με 50 μl διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος. Στη συνέχεια το παρασκεύασμα (5 μl) ελέγχονταν με ηλεκτροφόρηση σε 1% αγαρόζη σε 0,5X TBE.

ΣΤ. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA (Maniatis και συν., 1982)*i. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* με $CaCl_2$*

1. Καλλιέργεια των *E. coli* ολονύκτια σε ζωμό LB (2x30 ml) στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση.
2. Εμβολιασμός 2x500 ml ζωμού LB και επώαση στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση μέχρις ότου $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ (μέση της λογαριθμικής φάσης).
3. Ψύξη των βακτηρίων σε πάγο και κατακρήμνιση με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 10 min στους 4 °C.
4. Αναδιάλυση σε 250 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M $CaCl_2$ (αποστειρωμένο).
5. Επώαση σε πάγο για 20 min.
6. Κατακρήμνιση με 15 min φυγοκέντρηση στις 5000 rpm στους 4 °C.
7. Αναδιάλυση σε 43 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M $CaCl_2$.
8. Επώαση σε πάγο για 2 ώρες.

9. Προσθήκη 7 ml 100 % γλυκερόλης (αποστειρωμένη).
10. Διανομή 500 μl του παρασκευάσματος των κυττάρων σε σωλήνες CryoTubes και αποθήκευση σε καταψύκτη - 80 °C.

ii. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli με θερμικό σοκ.

1. Τα δεκτικά κύτταρα απομακρύνονται από τον καταψύκτη -80 °C και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο για περίπου 15 min.
2. Ποσότητα πλασμιδιακού DNA (~1-10 μg) τοποθετείται στον κωνικό πυθμένα δοκιμαστικού σωλήνα πολυπροπυλενίου (αποστειρωμένος με πλαστικό πώμα). Ο όγκος του παρασκευάσματος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 10% από τον όγκο του εναιωρήματος των δεκτικών κυττάρων που θα προστεθούν.
3. Προσθήκη 200 μl δεκτικών κυττάρων *E. coli* και επώαση για 30 min σε πάγο.
4. Επώαση αμέσως σε υδατόλουτρο 42 °C για 45 - 60 sec.
5. Τοποθέτηση αμέσως σε πάγο και επώαση για 2 min.
6. Προσθήκη 1 ml ζωμού LB προθερμασμένο στους 37 °C.
7. Επώαση στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση για διάστημα κατάλληλο ώστε τα μετασηματισμένα βακτήρια να αναπτυχθούν και να εκφράσουν τον παράγοντα αντοχής με τον οποίο θα επιλεγούν. Στις περισσότερες περιπτώσεις το διάστημα αυτό ήταν 1,5 ώρες εκτός από αυτές στις οποίες η επιλογή γίνονταν με τετρακυκλίνη όπου τα κύτταρα επωάζονταν για 3 ώρες.
8. Εμβολιασμός 100 μl σε 2-3 τρυβλία με LB άγαρ εμπλουτισμένο με κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού επιλογής και επώαση στους 37 °C για 18 ώρες.
9. Στο θρεπτικό μέσο που παρέμενε στον δοκιμαστικό σωλήνα προστίθονταν επιπλέον 1 ml ζωμού LB και τα βακτήρια καλλιεργούνταν ολονύκτια όπως στο βήμα 7 ενώ την επόμενη ημέρα εμβολιάζονταν επίσης τρυβλία LB όπως στο βήμα 8.
10. Απομόνωση των βακτηριακών αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στα τρυβλία επιλογής για έλεγχο.

Z. Κλωνοποίηση των γονιδίων *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-30} και *bla*_{CMY-42} σε πλασμιδιακά οχήματα υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων

i. Κλωνοποίηση του γονιδίου της CMY-2 στο πλασμιδιακό όχημα TOPO PCRII

Το πλασμιδιακό όχημα TOPO PCRII χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση PCR προϊόντων. Το όχημα αυτό στη μορφή που παρέχεται από την εταιρεία Invitrogen (πλέον ThermoFischer Scientific) είναι ευθύγραμμο ενώ στα 3' άκρα κάθε αλυσίδας προεξέχουν δύο βάσεις θυμίνης οι οποίες είναι συνδεδεμένες με φωσφοδιεστερικό δεσμό με την τοποισομεράση I του ιού *Vaccinia*. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CCCTT κόβει τον επόμενο φωσφοδιεστερικό δεσμό αποσπώντας τη φωσφορική ομάδα και συνδέεται μέσω αυτής με τη θυμίνη στο 3' άκρο ενώ παρουσία 5'-OH καταλύει την αντίστροφη αντίδραση και αποδεσμεύεται από το DNA. Η Taq DNA πολυμεράση διαθέτει ενεργότητα τελικής τρανσφεράσης μεταφέροντας μία βάση δεοξυαδενοσίνης στο 3' άκρο των προϊόντων PCR μη ειδικά. Έτσι τα προϊόντα PCR που έχουν προκύψει από ενίσχυση με το παραπάνω ένζυμο δεσμεύονται με τα προεξέχοντα 3' άκρα τους στις συμπληρωματικές βάσεις δεοξυθυμιδίνης στο πλασμιδιακό όχημα TOPO ενώ όταν στο 5' άκρο των PCR προϊόντων υπάρχει υδροξύλιο η τοποισομεράση I αποκαθιστά τη διασύνδεση 5'-3' μεταξύ της θυμίνης και της πρώτης βάσης αυτού δημιουργώντας ένα κυκλικό μόριο. Εκατέρωθεν της περιοχής διασύνδεσης των προϊόντων PCR το πλασμιδιακό όχημα φέρει αλληλουχίες αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες οπότε το εισερχόμενο τμήμα μπορεί να υποκλωνοποιηθεί σε άλλα πλασμιδιακά οχήματα.

Το *bla*_{CMY-2} κλωνοποιήθηκε στο παραπάνω όχημα μαζί με τμήμα που περιείχε τους ισχυρούς υποκινητές που παρέχονται από την αλληλουχία εισδοχής *ISEcp1*, μέσω ενίσχυσης με τους εκκινητές PCR *ISEcp1/F2* και *B1c/R* (πίνακας 1). Οι εκκινητές αυτοί υβριδοποιούνταν αντίστοιχα με αλληλουχία πριν την *IRR* του μεταθετού στοιχείου που βρίσκονταν ανωμερώς του γονιδίου της κεφαλοσπορινάσης και με αλληλουχία στο τέλος του γονιδίου *blc* που βρίσκονταν κατωμερώς του *bla*_{CMY-2} στη δομή που εντοπίζονταν σε πλασμίδιο που έφερε το στέλεχος *E. coli* EC1-00-7490 (ίδια με την αλληλουχία DQ164214 της βάσης δεδομένων GeneBank). Για την αντίδραση ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA που είχε απομονωθεί από το στέλεχος με τη μέθοδο της ενότητας E.i.

α. Αντίδραση PCR

<u>Όγκος αντίδρασης:</u>	<u>50 μl</u>
1. Ρυθμιστικό διάλυμα GoTaq 5X	10 μ l
2. 25 mM MgCl ₂	3 μ l
3. Μίγμα dNTPs 10 mM/dNTP	1 μ l
4. ISEcp1/F2 10 pmol· μ l ⁻¹	3 μ l
5. B1c/R 10 pmol· μ l ⁻¹	3 μ l
6. <i>E. coli</i> EC1-00-7490 pDNA	5 μ l
7. GoTaq πολυμεράση 5U· μ l ⁻¹	0,4 μ l
8. H ₂ O	24,6 μ l

Το αναμενόμενο προϊόν της παραπάνω αντίδρασης ήταν 1587 bp. Ενώ είχαν συμπεριληφθεί και αντιδράσεις θετικού μάρτυρα (DNA του στελέχους Λ 1 που παρήγαγε τη LAT-1 κεφαλοσπορινάση) και αρνητικού μάρτυρα όπου η ποσότητα DNA είχε αντικατασταθεί με H₂O.

Η αντίδραση ενίσχυσης έλαβε χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή Biometra και το πρόγραμμα επωάσεων που εφαρμόστηκε ήταν το εξής:

<u>θ (°C)</u>	<u>χρόνος (min)</u>	
95	5	
94	1	} 35 κύκλοι
58	1	
72	2	
72	10	

Ακολούθησε έλεγχος των προϊόντων της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση σε 1% αγαρόζη σε 0,5X TBE.

β. Καθαρισμός PCR προϊόντος

Η αντίδραση κλωνοποίησης στο πλασμιδιακό όχημα TOPO προϋποθέτει την απομάκρυνση της περίσσειας των DNA εκκινητών, των δεόξυνουκλεοτιδίων και των μη ειδικών δευτερογενών προϊόντων PCR. Η καθαρότητα του παρασκευάσματος που περιείχε το προϊόν της ενίσχυσης εξασφαλίστηκε με καθαρισμό της ζώνης που αντιστοιχούσε στο ειδικό προϊόν της αντίδρασης από πήκτωμα αγαρόζης έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε 0,5X TBE με την χρήση των αντιδραστηρίων που περιέχονται στο εμπορικά διαθέσιμο κίτ NucleoSpin Extract II της εταιρείας Macherey-Nagel.

Η προς καθαρισμό ζώνη (μεγέθους 1587 bp) απομακρύνονταν από το πήκτωμα με αποστειρωμένο ξυράφι. Στη συνέχεια διαλυτοποιούνταν με προσθήκη 200 μ l / 100 mg πηκτώματος αγαρόζης κατάλληλου διαλύματος εκχύλισης που παρέχονταν από το κίτ και

ακολουθούσε επώαση για 10 min στους 50 °C. Έπειτα από την πλήρη διαλυτοποίηση του πηκτώματος ακολουθούσε δέσμευση σε στήλη με κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό που προσαρμόζονταν σε φυγόκεντρο ενώ στη συνέχεια διοχετεύονταν διαλύματα πλύσης. Το δεσμευμένο DNA εκλούονταν με 50 µl διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος και το αποτέλεσμα του καθαρισμού ελέγχονταν με ηλεκτροφόρηση 5 µl του παρασκευάσματος σε πήκτωμα αγαρόζης.

γ. Αντίδραση διασύνδεσης και μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a

Η αντίδραση διασύνδεσης περιείχε

1. 6 µl κεκαθαμένου προϊόντος της ISEcp1/F2- B1c/R PCR
2. 1 µl διαλύματος αλάτων που περιέχεται στο κίτ TOPO TA PCRII
3. 1 µl πλασμιδιακού οχήματος TOPO TA PCRII

το μίγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση τερματίστηκε σε πάγο και στην συνέχεια 2 µl από το μίγμα χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5a όπως περιγράφεται στην ενότητα ΣΤ.ii. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων έγινε σε τρυβλία LB άγαρ που περιείχαν 50 µg/ml αμοξικιλίνη.

δ. Χαρακτηρισμός κλώνων και προϊόντων διασύνδεσης

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλογής (~100/τρυβλίο) 30 επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο. Οι αποικίες ελήφθησαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες με τις οποίες εμβολιάστηκαν τρυβλία MacConkey άγαρ και 3 ml ζωμού LB εμπλουτισμένα με 50 µg/ml αμοξικιλίνη. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία MacConkey εκτιμήθηκε σε ποιες από αυτές είχε εισέλθει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με PCR προϊόν και σε ποιες είχε απλώς κυκλοποιηθεί το όχημα διασύνδεσης καθώς σε αυτή την περίπτωση οι αποικίες στο παραπάνω θρεπτικό μέσο θα ήταν κόκκινες λόγω του μεταβολισμού της λακτόζης από το λειτουργικό γονίδιο β-γαλακτοζιδάσης ενώ στην πρώτη περίπτωση θα ήταν άσπρες αφού εντός του γονιδίου *lacZ* θα είχε εισέλθει το PCR προϊόν.

Από τις υγρές καλλιέργειες στο ζωμό LB απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με την τεχνική που περιγράφεται στην ενότητα E.ii και εκτιμήθηκε το μέγεθος των πλασμιδίων των απομονωθέντων κλώνων. Τα τμήματα που είχαν διασυνδεθεί με το πλασμιδιακό όχημα χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος και την κατεύθυνση εισόδου με πέψεις από

τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και PstI. Το πλασμιδιακό όχημα φέρει δύο θέσεις που αναγνωρίζονται από το ένζυμο EcoRI εκατέρωθεν του σημείου εισόδου του κλωνοποιημένου τμήματος οπότε επίδραση του ενζύμου στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια αποκαλύπτει το μέγεθος του εισαγόμενου τμήματος. Το τμήμα που κλωνοποιήθηκε φέρει δύο θέσεις αναγνώρισης PstI και άλλες δύο το πλασμιδιακό όχημα, κατά συνέπεια πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο και εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης αποκάλυψε την κατεύθυνση εισόδου του κλωνοποιημένου τμήματος. Οι αντιδράσεις πέψης περιείχαν:

Πέψη με EcoRI

pDNA mini prep	15 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB <u>EcoRI</u> 10X	2 μl
H ₂ O	3 μl
EcoRI 20 U·μl ⁻¹	0,5 μl

Πέψη με PstI

pDNA mini prep	15 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB3 10X	2 μl
H ₂ O	3 μl
PstI 20 U·μl ⁻¹	0,5 μl

Κλώνοι με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση φαινοτύπου κεφαλοσπορινάσης με τη μέθοδο Kirby-Bauer ενώ δύο από αυτούς επιλέχθηκαν για τις αντιδράσεις αλληλούχησης ώστε να αποκλειστεί η ύπαρξη τυχαίων μεταλλάξεων στο κλωνοποιημένο τμήμα. Το πλασμιδιακό DNA στην περίπτωση αυτή απομονώθηκε με την τεχνική της ενότητας E.iii ενώ για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές M13F και M13R που υβριδίζουν εκατέρωθεν της περιοχής διασύνδεσης του TOPO πλασμιδίου και οι E7 (reverse) και E8 (forward) που υβριδίζουν στο εσωτερικό του γονιδίου *bla*_{CMY-2} (πίνακας 1). Οι αντιδράσεις αλληλούχησης έγιναν από την εταιρεία Lark Technologies σε σύστημα ABI3700. Ένα πλασμίδιο από τα παραπάνω επιλέχθηκε για τα παρακάτω πειράματα κλωνοποίησης (pHP401).

ii. Εισαγωγή της Val211Gly υποκατάστασης στην CMY-2 με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση θέσης.

Το γονίδιο bla_{CMY-30} προέκυψε με εισαγωγή της μετάλλαξης G αντί T στο δεύτερο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου 211 του bla_{CMY-2} μέσω αντίδρασης μεταλλαξογόνου PCR. Ως μήτρα για την αντίδραση μεταλλαξογένεσης χρησιμοποιήθηκε παράγωγο του πλασμιδιακού οχήματος TOPO που έφερε το bla_{CMY-2} (pHP401) ενώ η αντίδραση πολυμερισμού του πλασμιδίου εκκινήθηκε από τα ολιγονουκλεοτίδια CMY_V211G-F και CMY_V211G-R που δίνονται στον πίνακα 1 και είχαν σχεδιαστεί σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται από το εμπορικά διαθέσιμο κίτ QuickChange Site Directed Mutagenesis. Οι εκκινήτες αυτοί είναι αντιπαράλληλοι, μήκους 37 βάσεων υβριδίζονται στο ίδιο σημείο του γονιδίου της CMY-2 με τον έναν να αναγνωρίζει τη μη-κωδική και τον άλλο την κωδική αλυσίδα ενώ στο κέντρο φέρουν τη μετάλλαξη που θα εισαχθεί. Η *PfuTurbo* DNA πολυμεράση που περιέχεται στο κίτ αντιγράφει και τις δύο αλυσίδες του πλασμιδίου ξεκινώντας από τους παραπάνω εκκινήτες κατά τη διάρκεια αντίδρασης PCR με τον αριθμό των πλασμιδίων που φέρουν τη μετάλλαξη να αυξάνεται σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Στο τέλος της PCR στο μίγμα της αντίδρασης θα υπάρχουν μόρια του αρχικού πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα και τα οποία εφόσον παρήχθησαν σε βακτήρια *E. coli* θα φέρουν τροποποιήσεις *dam* μεθυλίωσης και νεοσυντιθέμενα πλασμίδια με τη μετάλλαξη στο γονίδιο της CMY-2 τα οποία δε θα φέρουν αντίστοιχες τροποποιήσεις. Έτσι επώαση με την ενδονουκλεάση DpnI που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-Gm6ATC-3' θα έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του αρχικού πλασμιδίου και εμπλουτισμό του μίγματος με το μεταλλαγμένο πλασμίδιο.

Η αντίδραση μεταλλαξογόνου PCR περιείχε τα εξής:

<u>Όγκος αντίδρασης:</u>	<u>50 μl</u>
1. Ρυθμιστικό διάλυμα <i>PfuTurbo</i> 10x	5 μ l
2. Μίγμα dNTPs 10 mM/dNTP	1 μ l
4. CMY_V211G-F 10 pmol· μ l ⁻¹	1 μ l
5. CMY_V211G-R 10 pmol· μ l ⁻¹	1 μ l
6. pHP401 pDNA (E.iii, 100 ng· μ l ⁻¹)	1 μ l
7. <i>PfuTurbo</i> πολυμεράση 2,5U· μ l ⁻¹	1 μ l
8. H ₂ O	40 μ l

Η αντίδραση έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή Biometra σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

<u>θ (°C)</u>	<u>χρόνος (min)</u>	
95	5	
94	0,5	} 18 κύκλοι
58	1	
72	15	
95	1	
55	1	
72	20	

Ακολούθησε πέψη με 1 μl DpnI ($X U \cdot \mu l^{-1}$) για 1 ώρα στους 37 °C. Στην συνέχεια 1 μl από την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* DH5α σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας ΣΤ.ii και η επιλογή έγινε σε LB άγαρ που περιείχε 50 μg/ml αμοξικιλίνη. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν 5 επιλέχθηκαν για φαινοτυπικό έλεγχο ευαισθησίας σε β-λακταμικά με τη μέθοδο Kirby-Bauer ενώ τρεις από αυτούς τους κλώνους εξετάστηκαν ως προς την είσοδο της μετάλλαξης με απομόνωση του πλασμιδίου με την τεχνική της ενότητας E.iii και αλληλούχηση με τους εκκινητές M13F, M13R, E8 και E7. Όλοι οι κλώνοι που ελέγχθηκαν έφεραν τη μετάλλαξη και ένας από αυτούς (pHP402) χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υποκλωνοποίησης που ακολούθησαν.

iii. Υποκλωνοποίηση των *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-30} στα πλασμιδιακά οχήματα pBC-SK (+/-) και pACYC184 ((Maniatis και συν., 1982)

Η περιοχή που περιείχε τα *bla*_{CMY-2} και *bla*_{CMY-30} και τις αλληλουχίες που ρύθμιζαν την έκφραση αυτών απομακρύνθηκε από τα παράγωγα των TOPO πλασμιδίων pHP401 και pHP402 μέσω πέψης με EcoRI και διασυνδέθηκε στα αντίστοιχα κολλώδη άκρα των πλασμιδίων υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων pBC-SK(+/-) και pACYC184.

α. Προετοιμασία των pBC-SK(+/-) και pACYC184

1. Απομόνωση των πλασμιδίων με την τεχνική της ενότητας E.i.

2. Πέψη 10 μg από το κάθε πλασμίδιο με EcoRI ως εξής

	<u>pACYC184 (125 ng/μl)</u>	<u>pBC-SK (235 ng/μl)</u>
pDNA	80 μl	42,5 μl
P. Δ/μα EcoRI (10X)	10 μl	5 μl
H ₂ O	10 μl	2,5 μl
EcoRI	2 μl	2 μl

Επώαση στους 37 °C για 3 ώρες. Έλεγχος απόδοσης πέψης με ηλεκτροφόρηση 5 μl της αντίδρασης σε 1% αγαρόζη.

3. Απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65 °C για 20 min.

4. Αντίδραση απομάκρυνσης 5' φωσφορικών ομάδων από τα ευθύγραμμα πλασμίδια με αλκαλική φωσφατάση CIAP (10 U·μl⁻¹, New England Biolabs) ως εξής. Σε κάθε αντίδραση πέψης προστέθηκαν 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος (NEB3 10X) και ο όγκος ρυθμίστηκε στα 200 μl με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας H₂O. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 μl CIAP και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 75 °C για 10 min.

5. Εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης φυγοκέντρωση στις 13000 rpm σε φυγόκεντρο Eppendorf για 5 min και ανάκτηση της υδατικής φάσης.

6. Εκχύλιση με ίσο όγκο χλωροφορμίου φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 5 min και ανάκτηση της υδατικής φάσης.

7. Προσθήκη 3 M οξικού νατρίου σε αναλογία 1:10 και 2,5 όγκων αιθανόλης.

8. Επώαση για 20 min στους -70 °C και κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 20 min στους 4 °C.

9. Στέγνωμα του ιζήματος σε Speed-Vac και αναδιάλυση σε 20 μl H₂O.

10. Εκτίμηση της ποσότητας των ευθύγραμμων πλασμιδίων με ηλεκτροφόρηση 2 μl σε 1% αγαρόζη.

β. Προετοιμασία των υπό κλωνοποίηση τμημάτων

1. Απομόνωση των pHP401 και pHP402 με την τεχνική της ενότητας E.ii.

2. Πέψη 50 μg από το κάθε πλασμίδιο με EcoRI ως εξής:

	<u>pHP401 (285 ng/μl)</u>	<u>pHP402 (615 ng/μl)</u>
pDNA	175 μl	82 μl
P. Δ/μα EcoRI (10X)	20 μl	20 μl
H ₂ O	5 μl	98 μl
EcoRI	3 μl	3 μl

Επώαση για 4 ώρες στους 37 °C και στην συνέχεια απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65 °C για 20 min.

3. Ηλεκτροφόρηση σε 1% αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξης σε 1X TAE. Ο όγκος της αντίδρασης πριν την ηλεκτροφόρηση είχε μειωθεί στα 100 μl με Speed-Vac.

4. Λήψη της ζώνης που αντιστοιχεί στο τμήμα που περιέχει τα γονίδια των κεφαλοσπορινασών (1610 bp) με αποστειρωμένο ξυράφι υπό παρατήρηση σε λάμπα UV.

5. Τήξη του τμήματος της αγαρόζης με επώαση στους 65 °C για 15 min.

6. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και 10 μl 5 M NaCl, ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min.

7. Ανάκτηση της υδατικής φάσης και πλύσιμο της οργανικής με 200 μl H₂O.

8. Ανάκτηση της υδατικής φάσης και ανάμειξη με αυτή του προηγούμενου σταδίου.

9. Εκχύλιση 2 φορές με ίσο όγκο χλωροφορμίου και ανάκτηση της υδατικής φάσης.

10. Προσθήκη 3 M οξικού αμμωνίου σε αναλογία 1:10 και 2,5 όγκων αιθανόλης.

11. Επώαση για 20 min στους -70 °C και κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min στους 4 °C.

12. Στέγνωμα του ιζήματος σε Speed-Vac και αναδιάλυση σε 20 μl H₂O.

13. Εκτίμηση της καθαρότητας και της ποσότητας των απομονωθέντων τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε 1% αγαρόζη.

γ. Αντιδράσεις διασύνδεσης

Οι αντιδράσεις διασύνδεσης καταλύθηκαν από την T4 λιγάση της εταιρείας Fermentas ως εξής:

Αντίδραση (V=20 µl)	A	B	Γ	Δ	E	ΣΤ
pACYC184 ^{EcoRI, CIAP} (1:4)	1 µl	1 µl	1 µl	-	-	-
pBC-SK ^{EcoRI, CIAP} (1:8)	-	-	-	1 µl	1 µl	1 µl
pHP401 ^{EcoRI} θραύσμα 1610 bp	-	8 µl	-	-	8 µl	-
pHP402 ^{EcoRI} θραύσμα 1610 bp	-	-	8 µl	-	-	8 µl
10X ρυθμ. δ/μα T4 λιγάσης	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
10 mM δ/τος διθειοτριόλης (DTT)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
H ₂ O	16,8 µl	8,8 µl	8,8 µl	16,8 µl	8,8 µl	8,8 µl
T4 λιγάση (X U· µl ⁻¹)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν για διάστημα μίας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου.

Κατά τις αντιδράσεις B και Γ ο γενετικός τόπος που εξέφραζε τα *bla*_{CMY-2} και *bla*_{CMY-30} αντίστοιχα εισήλθε στην EcoRI θέση του πλασμιδιακού οχήματος pACYC184 η οποία εντοπίζεται εντός του γονιδίου αντοχής στη χλωραμφενικόλη (μεθυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης) ενώ κατά τις αντιδράσεις E και ΣΤ οι αντίστοιχοι γενετικοί τόποι εισήλθαν στην EcoRI θέση στην περιοχή διασύνδεσης του pBC-SK. Οι αντιδράσεις A και Δ λειτουργούσαν ως μάρτυρες ώστε να εκτιμηθεί ο βαθμός επανακυκλοποίησης των pACYC184 και pBC-SK αντίστοιχα κατά τα πειράματα διασύνδεσης.

Ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* MC100 με 10 µl από κάθε αντίδραση όπως περιγράφεται στην ενότητα ΣΤ.ii. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων με τα προϊόντα της αντίδρασης A έγινε σε τρυβλία LB άγαρ εμπλουτισμένων με 10 µg/ml τετρακυκλίνης όπως και των αντιδράσεων B και Γ αλλά εδώ χρησιμοποιήθηκαν επίσης τρυβλία LB άγαρ που περιείχαν 10 µg/ml τετρακυκλίνης και 50 µg/ml αμοξικιλίνης. Οι κλώνοι που προέκυψαν από τις αντιδράσεις Δ, E και ΣΤ επιλέχθηκαν σε αντίστοιχα τρυβλία τα οποία αντί τετρακυκλίνης περιείχαν 20 µg/ml χλωραμφενικόλη.

Οι κλώνοι pAC-*bla*_{CMY} και pBC-*bla*_{CMY} ανακαλλιεργήθηκαν σε τρυβλία McConkey (50 µg/ml αμοξικιλίνη) και ακολούθησε φαινοτυπικός έλεγχος με τη μέθοδο Kirby-Bauer ώστε να εξακριβωθεί η παραγωγή των αντίστοιχων κεφαλοσπορινασών. Δύο κλώνοι από το κάθε είδος πλασμιδίου ελέγχθηκαν ως προς την ύπαρξη τυχαίων μεταλλάξεων με απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της ενότητας E.iii και αλληλούχηση με τους εκκινητές ISEcp1/F2, B1c/R, T3, T7, E7 και E8. Οι παραπάνω αλληλουχήσεις έδωσαν επίσης τη δυνατότητα για την εξακρίβωση της κατεύθυνσης εισόδου των κλωνοποιημένων τμημάτων. Επιλέχθηκε ένας κλώνος που παρήγαγε το κάθε είδος πλασμιδίου και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των MIC (παράγωγα pACYC-184, pAC-*bla*_{CMY-2}/pHP405 και pAC-*bla*_{CMY-30}/pHP407) και για τον καθαρισμό των CMY-2 και CMY-30 ώστε να χαρακτηριστούν οι βιοχημικές τους ιδιότητες (παράγωγα pBC-SK, pBC-*bla*_{CMY-2}/pHP408 και pBC-*bla*_{CMY-30}/pHP410).

iv. Εισαγωγή της Val211Ser υποκατάστασης στην CMY-2 που παράγονταν από τους pAC και pBC κλώνους

Το γονίδιο *bla*_{CMY-42} εκφραζόμενο ισογονικά με τα *bla*_{CMY-2} και *bla*_{CMY-30} προέκυψε με αντίδραση μεταλλαξογένεσης χρησιμοποιώντας το QuickChange Site Directed Mutagenesis kit, τους εκκινητές CMY_V211S-F και CMY_V211S-R (πίνακας 1), και πλασμιδιακό DNA που είχε απομονωθεί από τα στελέχη pHP405 και pHP408 με την τεχνική της ενότητας E.iii. Η μεταλλαξογόνος PCR έγινε ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό που εφαρμόστηκε στην περίπτωση της Val211Gly υποκατάστασης (ενότητα Z.ii). Ακολούθησε πέψη με DpnI και μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* MC100 με 1 µl από την αντίδραση. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έγινε σε LB άγαρ με 50 µg/ml αμοξικιλίνη και οι κλώνοι ελέγχθηκαν ως προς την εισαγωγή της μετάλλαξης με αλληλούχηση μέσω των εκκινητών ISEcp1/F2, B1c/R, T3, T7, E7 και E8. Ένας κλώνος από το κάθε είδος παραγωγού χρησιμοποιήθηκε σε περαιτέρω πειράματα και συγκεκριμένα αυτός που έφερε το *bla*_{CMY-42} στο όχημα χαμηλού αριθμού αντιγράφων (pAC- *bla*_{CMY-42}/pHP453) χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό των MIC και ο αντίστοιχος υψηλού αριθμού αντιγράφων (pBC- *bla*_{CMY-42}/pHP454) για τον καθαρισμό της CMY-42.

H. Κλωνοποίηση των γονιδίων των ποικιλιών GES σε πλασμιδιακά οχήματα υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων

i. Εισαγωγή των υποκαταστάσεων Glu104Lys, Gly170Asn και Gly170Ser στην GES-1

Τα γονίδια των β-λακταμασών GES-2 (Glu104, Asn170), GES-5 (Glu104, Ser170), GES-6 (Lys104, Ser170), GES-7 (Lys104, Gly170) και GES-13 (Lys104, Asn170) προέκυψαν με εισαγωγή των αντίστοιχων μεταλλάξεων στην GES-1 (Glu104, Gly170) το γονίδιο της οποίας ήταν κλωνοποιημένο σε πλασμίδιο παράγωγο του pBC-SK και η έκφρασή του ελέγχονταν από τον υβριδικό υποκινητή που παρέχονταν από την 5'CS περιοχή του ιντεγκρονίου τάξης I (πλασμίδιο C10).

Αρχικά το κωδικόνιο 170 στο bla_{GES-1} γονίδιο αντικαταστάθηκε από αυτά που απαντούν στα bla_{GES-2} και bla_{GES-5} χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών GES_G170N-F/GES_G170N-R και GES_S170N-F/GES_S170N-R (πίνακας 1) αντίστοιχα και πλασμιδιακό DNA που είχε απομονωθεί από τον κλώνο *E. coli* DH5a που περιείχε το πλασμίδιο C10 με την τεχνική της ενότητας E.iii. Οι αντιδράσεις μεταλλαξογένεσης έγιναν όπως στην ενότητα Z.ii. Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a με τα μεταλλαγμένα πλασμίδια και επιλογή σε LB άγαρ με 50 µg/ml αμοξικιλίνη. Οι κλώνοι που προέκυψαν ελέγχθηκαν ως προς τον φαινότυπο ευαισθησίας σε β-λακταμικά αντιβιοτικά καθώς και την είσοδο των αντίστοιχων μεταλλάξεων με αλληλούχηση χρησιμοποιώντας τους εκκινητές T3, T7, IntF και 3'CS (πίνακας 1) ενώ ένας από το κάθε είδος (pBC- bla_{GES-2} /pHP413 και pBC- bla_{GES-5} /pHP415) χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα.

Τα bla_{GES-7} , bla_{GES-13} και bla_{GES-6} προέκυψαν μεταλλάσσοντας το κωδικόνιο 104 στα bla_{GES-1} , bla_{GES-2} και bla_{GES-5} χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών GES_E104K-F και GES_E104K-R (πίνακας 1) και τα pBC πλασμίδια που είχαν απομονωθεί από τα C10, pHP413 και pHP415 αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις μεταλλαξογένεσης, ο μετασχηματισμός, η επιλογή και ο έλεγχος των κλώνων έγιναν όπως και παραπάνω. Ένας κλώνος που παρήγαγε κάθε μία από τις παραπάνω β-λακταμάσες (pBC- bla_{GES-7} /pHP420, pBC- bla_{GES-13} /pHP417 και pBC- bla_{GES-6} /pHP418) χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα στάδια της μελέτης.

ii. Υποκλωνοποίηση των γονιδίων *bla_{GES}* στο πλασμιδιακό όχημα χαμηλού αριθμού αντιγράφων *pACYC184*

Το γονίδιο *bla_{GES-1}* είχε κλωνοποιηθεί μαζί με τις αλληλουχίες που ρύθμιζαν την έκφρασή του στο όχημα *pBC-SK* στις θέσεις *EcoRI* και *BamHI*. Έτσι η περιοχή που εκφράζει το γονίδιο αλλά και οι αντίστοιχες των παραγώγων αυτού που προέκυψαν από τις παραπάνω αντιδράσεις μεταλλαξογένεσης μπορούσαν να υποκλωνοποιηθούν σε άλλα πλασμίδια με πέψη με τα παραπάνω ένζυμα. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την υποκλωνοποίηση των *bla_{GES}* γονιδίων στο *pACYC184* αφορούσε πέψη των *pBC* παραγώγων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *BamHI*, επίδραση στο θραύσμα που περιείχε την υπό κλωνοποίηση περιοχή (1674 bp) με το *Klenow* τμήμα της DNA πολυμεράσης I του *E. coli* ώστε τα 5' προεξέχοντα άκρα να μετατραπούν σε τυφλά και διασύνδεση στην θέση αναγνώρισης της *EcoRV* ενδονουκλεάσης η οποία επίσης δημιουργεί τυφλά άκρα στον *pACYC184*.

α. Προετοιμασία του *pACYC184*

1. Πέψη 10 μg του πλασμιδίου που είχε απομονωθεί με την τεχνική E.i με *EcoRV*

pDNA (125 ng/μl)	80 μl
P. Δ/μα NEB2 (10X)	10 μl
H ₂ O	10 μl
<i>EcoRV</i>	2 μl

Η αντίδραση επώαστηκε στους 37 °C για 4 ώρες και το ένζυμο απενεργοποιήθηκε στους 65 °C για 20 min.

2. Ακολούθησε απομάκρυνση των 5' φωσφορικών ομάδων με επίδραση αλκαλικής φωσφατάσης *CIAP* όπως στην ενότητα Z.iii.a με την διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση έπειτα από την επώαση στους 37 °C ακολούθησε μία επώαση 30 min στους 56 °C και στη συνέχεια απενεργοποίηση του ενζύμου.

3. Καθαρισμός του παρασκευάσματος όπως στην ενότητα Z.iii.a και ηλεκτροφόρηση για έλεγχο σε πήκτωμα 1% αγαρόζης.

β. Προετοιμασία των υπό κλωνοποίηση τμημάτων

1. Απομόνωση των πλασμιδίων C10, *pHP413*, *pHP415*, *pHP420*, *pHP417* και *pHP418* με την τεχνική της ενότητας E.ii.

2. Πέψη 50 μg πλασμιδίων με *EcoRI* και *BamHI* ως εξής:

	C10 (380 ng/μl)	pHP413 (732 ng/μl)	pHP415 (575 ng/μl)	pHP420 (465 ng/μl)	pHP417 (540 ng/μl)	pHP418 (725 ng/μl)
pDNA	131 μl	68 μl	87 μl	108 μl	93 μl	69 μl
P. Δ/μα (10X)	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl
H ₂ O	49 μl	105,7 μl	87 μl	72,5 μl	81.4 μl	105 μl
EcoRI	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl
BamHI	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl	3 μl

Επώαση στους 37 °C για 4 ώρες.

3. Απομόνωση του EcoRI/BamHI θραύσματος μεγέθους 1674 bp μέσω ηλεκτροφόρησης σε αгарόζη χαμηλού σημείου τήξης και καθαρισμός όπως στην ενότητα Z.iii.β.

4. Δημιουργία τυφλών άκρων με επίδραση της Klenow πολυμεράσης. Κάθε αντίδραση έγινε ως εξής.

	V (μl)
θραύσμα 1674 bp	15
P. δ/μα NEB2 10x	2
dNTPs 2mM/dNTP	2
H ₂ O	1
Klenow (5 U·μl ⁻¹)	1

Επώαση στους 37 °C για 25 min.

5. Απενεργοποίηση του ενζύμου στους 75 °C για 20 min.

6. Κατακρήμνιση όπως στα στάδια 10-12 της ενότητας Z.iii.β και επανάληψη του σταδίου ώστε να εξασφαλιστεί η ολική απομάκρυνση των dNTPs τα οποία αναστέλλουν την T4 λιγάση.

γ. Αντιδράσεις διασύνδεσης

Οι αντιδράσεις διασύνδεσης καταλύθηκαν από τη T4 λιγάση της εταιρείας New England Biolabs ως εξής:

	Μάρτυρας	C10	pHP413	pHP415	pHP420	pHP417	pHP418
pACYC184 ^{EcoRV, CIAP}	1,3 μl	1,3 μl	1,3 μl	1,3 μl	1,3 μl	1,3 μl	1,3 μl
[E/B 1674bp] ^{Klenow}	-	10 μl	5 μl	1,5 μl	10 μl	10 μl	8 μl
P. Δ/μα T4 (10X)	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
100 mM DDT	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl
H ₂ O	16,5 μl	6,5 μl	11,5 μl	15 μl	8,8 μl	8,5 μl	6,5 μl
T4 λιγάση	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl

Οι αντιδράσεις επωάστηκαν στους 16 °C ολονύκτια.

Ακολούθησε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a και επιλογή σε τρυβλία LB άγαρ εμπλουτισμένα με 20 µg/ml χλωραμφενικόλη (η επιλογή με τετρακυκλίνη δεν είναι δυνατή διότι τα κλωνοποιημένα τμήματα εισέρχονται στο γονίδιο της τετρακυκλίνης) και 50 µg/ml αμοξικιλίνη. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλογής καλλιεργήθηκαν σε MacConkey 50 µg/ml αμοξικιλίνη και εκτιμήθηκε ο φαινότυπος ευαισθησίας τους στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Από αυτούς απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με την τεχνική E.ii και εκτιμήθηκε το μέγεθος του εισερχόμενου τμήματος καθώς και η κατεύθυνση εισόδου μέσω πέψεων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI, BamHI και DraI. Οι κλώνοι στους οποίους το γονίδιο της β-λακταμάσης ήταν σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτό της τετρακυκλίνης επιλέχθηκαν για προσδιορισμό των ελαχίστων συγκεντρώσεων αναστολής αφού έγινε έλεγχος ακεραιότητας των αλληλουχιών με του εκκινητές IntF και 3'CS (pAC-*bla*_{GES-1}/pHP429, pAC-*bla*_{GES-2}/pHP424, pAC-*bla*_{GES-5}/pHP426, pAC-*bla*_{GES-7}/pHP433, pAC-*bla*_{GES-13}/pHP421 και pAC-*bla*_{GES-6}/pHP430).

iii. Παρασκευή εργαστηριακών μεταλλακτών της θέσης 104 των ενζύμων τύπου GES

Η θέση 104 χαρακτηρίστηκε λειτουργικά με εισαγωγή επιπλέον μεταλλάξεων πέρα από αυτή που απαντά στα φυσικά ένζυμα GES (Glu104Lys). Δημιουργήθηκαν μεταλλάκτες οι οποίοι στη θέση 104 έφεραν αμινοξέα που απαντούν σε άλλα φυσικά ένζυμα τάξης A. Έτσι η θέση αυτή υποκαταστάθηκε από προλίνη (KPC-2), αλανίνη (*P. vulgaris* K1), ασπαραγίνη (CTX-M), τυροσίνη (SME-1) και αργινίνη (KPC-4 και KPC-5).

Το κωδικόνιο 104 στις β-λακταμάσες GES-1, GES-2 και GES-5 αντικαταστάθηκε από τα αντίστοιχα των παραπάνω βΛτΑ με τα ζεύγη εκκινητών GES_E104P-F/ GES_E104P-R, GES_E104A-F/ GES_E104A-R, GES_E104N-F/ GES_E104N-R, GES_E104Y-F/ GES_E104Y-R και GES_E104R-F/ GES_E104R-R και πλασμιδιακό DNA που είχε απομονωθεί από τα C10, pHP413 και pHP415. Οι αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR και η επιλογή των μεταλλαγμένων κλώνων έγιναν όπως και παραπάνω. Οι κλώνοι που αντέγραφαν τα 15 παράγωγα pBC που προέκυψαν από την

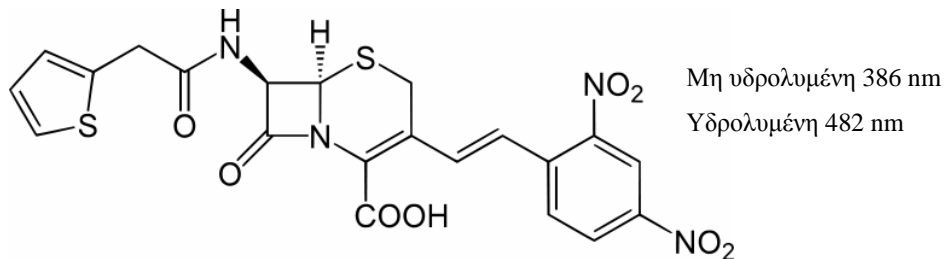
παραπάνω διαδικασία και έφεραν τις 5 διαφορετικές υποκαταστάσεις στη θέση 104 παρουσία των τριών διαφορετικών αμινοξέων που απαντούν στη θέση 170 στα φυσικά ένζυμα GES χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό MIC των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Θ. Αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση β-λακταμασών (Mathew A. και συν., 1975)

Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένα μόρια εξαιτίας της ύπαρξης καταλοίπων στο μόριο τους που φέρουν θετικές (αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη) ή αρνητικές (ασπαρτικό οξύ και γλουταμικό οξύ) πλευρικές αλυσίδες. Η φόρτιση των παραπάνω αμινοξέων καθορίζεται από την κατάσταση πρωτονίωσής τους και όσον αφορά τα κατάλοιπα που εντοπίζονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης αυτή είναι άμεση συνάρτηση του pH του διαλύματος. Οι πλευρικές αλυσίδες των παραπάνω αμινοξέων είναι πρωτονιωμένες όταν το pH του διαλύματος είναι μικρότερο από τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο της σταθεράς διάστασης οξέος (pKa) που τις χαρακτηρίζει. Έτσι οι αμινομάδες των αμινοξέων αργινίνη (pKa=12,5), λυσίνη (pKa=10,5) είναι συνήθως πρωτονιωμένες και θετικά φορτισμένες ενώ η μίνη του δακτυλίου ιμιδαζόλης της ιστιδίνης (pKa=6,1) συνήθως είναι ουδέτερη αλλά μικρές αλλαγές του pH στη φυσιολογική περιοχή ενδέχεται να προκαλέσουν την πρωτονίωσή της. Οι καρβοξυλομάδες του ασπαρτικού οξέος (pKa=3,86) και του γλουταμικού οξέος (pKa=4,07) είναι συνήθως αποπρωτονιωμένες και αρνητικά φορτισμένες. Τα αμινοξέα που τοποθετούν τις πλευρικές τους αλυσίδες σε κοιλότητες στο εσωτερικό της πρωτεΐνης ενδέχεται να επηρεάζονται όσον αφορά την πρωτονίωσή τους και από το ηλεκτροστατικό μικροπεριβάλλον τους. Ανάλογα με το ποσοστό θετικών και αρνητικών καταλοίπων που διαθέτει μία πρωτεΐνη ενδέχεται να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένη σε ένα δεδομένο pH δηλαδή συμπεριφέρεται ως αμφολύτης. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει μία τιμή pH στην οποία τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα εξισορροπούν το φορτίο των αρνητικών με αποτέλεσμα το μόριο αυτής στο σύνολό του να είναι ουδέτερο. Η τιμή αυτή ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και σε τιμές pH μεγαλύτερες από αυτό οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες ενώ στην αντίθετη περίπτωση είναι θετικά φορτισμένες.

Η ισοηλεκτρική εστίαση (IHE) είναι μία ηλεκτροφορητική τεχνική που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει της παραπάνω ιδιότητάς τους. Η τεχνική βασίζεται στη δημιουργία διαβάθμισης pH σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Οι πρωτεΐνες μετατοπίζονται υπό τη δράση του παραπάνω πεδίου μέχρις ότου προσεγγίσουν την περιοχή pH στο πήκτωμα που αντιστοιχεί στην τιμή pI που τις χαρακτηρίζει οπότε και σταματούν να κινούνται εξαιτίας του ουδέτερου φορτίου που αποκτούν εκεί, εστιάζουν δηλαδή στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η διαβάθμιση pH επιτυγχάνεται μέσω εκμετάλλευσης του γεγονότος ότι κατά τη διάρκεια μίας ηλεκτροφόρησης παρατηρείται συνεχόμενη παραγωγή υδρογονοκατιόντων στο ηλεκτρόδιο της ανόδου (+) και ανιόντων υδροξειδίου στο ηλεκτρόδιο της καθόδου (-) που συνεπάγεται πτώση και αύξηση του pH στις αντίστοιχες περιοχές. Αν τώρα στο υλικό διαχωρισμού (π.χ. πολυακρυλαμίδη) έχουν συμπεριληφθεί επαμφοτερίζοντα μόρια τα οποία στο ισοηλεκτρικό τους σημείο εμφανίζουν ρυθμιστική ικανότητα τότε με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου στα σημεία που αυτά εστιάζουν θα δημιουργούνται διακριτές ζώνες pH. Έτσι χρησιμοποιώντας κατάλληλο μίγμα αμφολυτών είναι δυνατόν να δημιουργηθεί μία σειρά από ζώνες αυτού του είδους στο πήκτωμα και όσο περισσότεροι χρησιμοποιηθούν τόσο πιο ομοιόμορφη θα είναι η σχηματιζόμενη κλίση pH. Με σκοπό η δημιουργία της διαβάθμισης να είναι πιο γρήγορη στο ηλεκτρόδιο της ανόδου (+) τοποθετείται διάλυμα ισχυρού οξέος (δότης H^+) και στο ηλεκτρόδιο της καθόδου (-) διάλυμα ισχυρής βάσης (δότης OH^-) τα οποία βρίσκονται σε επαφή με το πήκτωμα.

Όταν η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό μη-αποδιατακτικές συνθήκες τότε οι πρωτεΐνες που διαθέτουν ενζυμική ενεργότητα διατηρούν την ικανότητα κατάλυσης και επί του πηκτώματος η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με την χρήση κατάλληλου υποστρώματος. Ένα υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την εμφάνιση των ζωνών των β-λακταμασών επί του πηκτώματος IHE είναι η νιτροσεφίνη η οποία είναι μία χρωμογόνος κεφαλοσπορίνη 1ης γενεάς τα διαλύματα τις οποίας έχουν κίτρινο χρώμα ενώ όταν ο β-λακταμικός δακτύλιος σε αυτή υδrolύεται δίνει κόκκινο χρώμα (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δομή της χρωμογόνου κεφαλοσπορίνης πρώτης γενεάς νιτροσεφίνης. Η R1 πλευρική αλυσίδα είναι η αντίστοιχη της κεφαλοθίνης ενώ η R2 περιέχει τον χρωμογόνο δακτύλιο *m*-δινιτροβενζένιου ο οποίος συνδεδεμένος στο β-λακταμικό μόριο απορροφά στα 386 nm δίνοντας κίτρινο χρώμα στο διάλυμα ενώ όταν ο β-λακταμικός δακτύλιος υδρολύεται παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης στα 482 nm δίνοντας κόκκινο χρώμα.

In situ χρώση νιτροσεφίνης πηκτώματος ΙΗΕ στο οποίο έχουν διαχωριστεί πρωτεϊνικά παρασκευάσματα τα οποία περιέχουν β-λακταμάσες επιτρέπει την ειδική εμφάνιση των εστιασμένων ζωνών τους ακόμα και σε μερικώς κεκαθαρμένα παρασκευάσματα. Η αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση β-λακταμασών χρησιμοποιείται ως διαγνωστική τεχνική ώστε να εξακριβωθεί ποιοι τύποι πιθανώς παράγονται από τα υπό εξέταση βακτήρια καθώς τα διάφορα ένζυμα της κατηγορίας χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα pI. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ώστε να επιβεβαιωθεί η παραγωγή των κλωνοποιημένων ενζύμων από τα μετασηματισμένα στελέχη και εφαρμόστηκε ως εξής.

i. Παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

1. Τα βακτήρια αναπτύσσονταν σε 30 ml TSB εμπλουτισμένου με 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ αμοξικιλίνη στους 37 °C ολονύκτια.
2. Κατακρήμιση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 7000 rpm στους 4 °C σε φυγόκεντρο Sorvall για 15 min.
3. Αναδιάλυση σε 10 ml διαλύματος φωσφορικών-καλίου (K^+P_i) 0,1 M pH 7 (παρασκευάζονταν από διαλύματα 1 M KH_2PO_4 και 1 M K_2HPO_4 αναμειγνύοντας για παρασκευή 1 L διαλύματος 38,5 ml από το πρώτο και 61,5 ml από το δεύτερο διάλυμα) και φυγοκέντρηση όπως το στάδιο 2.
4. Επανάληψη του σταδίου 3 και αναδιάλυση των βακτηρίων σε 5 ml διαλύματος φωσφορικών-καλίου 0,1 M pH 7.
5. Λύση των βακτηρίων με υπερήχηση σε συσκευή SANYO Soniprep 150. Ο δοκιμαστικός σωλήνας που περιείχε τα βακτήρια τοποθετούνταν σε

"παγόλουτρο" ώστε η θερμοκρασία να μην αυξάνεται κατά την διάρκεια της υπερήχησης, ενώ στο εσωτερικό του τοποθετούνταν η ακίδα της γεννήτριας υπερήχων. Η υπερήχηση ήταν έντασης 15-18 microns και συνολικής διάρκειας 3 min χωρισμένη σε διαστήματα των 30 sec τα οποία ακολουθούνταν από διαστήματα 30 sec για να επιτυγχάνεται ψύξη του δείγματος.

6. Ακολουθούσε διαύγαση του παρασκευάσματος με φυγοκέντρηση 60 min στους 4 °C στις 12000 rpm σε φυγόκεντρο Sorvall.

7. Ανάκτηση του υπερκείμενου το οποίο περιέχει μίγμα των πρωτεϊνών που απελευθερώθηκαν από τα βακτήρια.

8. Έλεγχος της ενεργότητας των ενζυμικών παρασκευασμάτων έναντι της νιτροσεφίνης με ανάμειξη 3 ml πρωτεϊνικού παρασκευάσματος με 9 ml διαλύματος νιτροσεφίνης 0,5 mg/ml σε 0,1 M K⁺P_i pH 7 και 1% DMSO. Η βαθμονόμηση της ενεργότητας γινόταν ανάλογα με την παρατηρούμενη ταχύτητα υδρόλυσης της νιτροσεφίνης

ii. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης IHE

Το πήκτωμα παρασκευάζονταν με ανάμειξη των αντιδραστηρίων που αναφέρονται παρακάτω σε σκοτεινή φιάλη κενού 250 ml.

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Όγκος (ml)</u>
Ακρυλαμίδη:bis-ακρυλαμίδη 100:2,7	13,5
TEMED 5% v/v	0,3
Αμφολύτες (40% w/v Ampholine pH 3,5-9,5 LKB-Pharmacia)	3
H ₂ O	37,5
→Εξαέρωση με επίδραση κενού για 1 ώρα	
Ριβοφλαβίνη 0,02 mg/ml	6

Ακολουθούσε χύτευση του παραπάνω μίγματος σε εκμαγείο U-frame (LKB-Pharmacia) και πολυμερισμός για 1 ώρα οπότε και δημιουργούνταν πήκτωμα πάχους 1 mm.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και έτοιμα πηκτώματα εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρεία LKB-Pharmacia.

iii. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης και χρώσης νιτροσεφίνης

Η ηλεκτροφόρηση γίνονταν σε συσκευή Electrophoretic Cell Apparatus Multiphor II (LKB-Pharmacia). Το πήκτωμα στερεωνόταν πάνω στην πλάκα ηλεκτροφόρησης της συσκευής και στις δύο επιμήκειες πλευρές του τοποθετούνταν ταινίες χαρτιού Whatmann διαποτισμένες με διαλύματα H_3PO_4 1 N (άνοδος) και NaOH 1 N (κάθοδος). Τα δείγματα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων τοποθετούνταν σε κομμάτια χαρτιού Whatmann κοντά στο ηλεκτρόδιο της ανόδου. Ο όγκος του δείγματος που ηλεκτροφορούνταν ήταν αντιστρόφως ανάλογος της ενεργότητας που εμφάνιζε αυτό έναντι της νιτροσεφίνης. Επίσης ηλεκτροφορούνταν και μείγμα β-λακταμασών με pIs 5,4, 6,1, 7,6 8,2 και 9,4 που λειτουργούσε ως μάρτυρας. Στη συνέχεια τοποθετούνταν το κάλυμα της συσκευής που έφερε τα ηλεκτρόδια και συνδέονταν με τροφοδοτικό υψηλής τάσης. Η ηλεκτροφόρηση γίνονταν σε σταθερή ισχύ 8 – 15 Watt και διαρκούσε περίπου 1 ώρα (μέχρις ότου $I < 8-9$ mA). Η πλάκα ηλεκτροφόρησης ψύχονταν με κυκλοφορητή νερού θερμοκρασίας 8 °C.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα χαρτιά Whatmann απομακρύνονταν από το πήκτωμα και ακολουθούσε εμφάνιση των εστιασμένων β-λακταμασών με εφαρμογή επί του πηκτώματος διηθητικού χαρτιού που είχε διαποτιστεί με διάλυμα νιτροσεφίνης 0,1 mg/ml σε 0,1 M K^+P_i pH 7. Οι ζώνες αποκαλύπτονται αποκτώντας κόκκινο χρώμα σε κίτρινο υπόβαθρο. Όταν η εμφάνιση των ζωνών δεν γίνονταν πολύ γρήγορα το πήκτωμα φωτογραφίζονταν. Διαφορετικά τα αποτυπώματα των θετικών σημάτων σημειώνονταν στη ζελατίνη που κάλυπτε την κάτω επιφάνεια του πηκτώματος. Τα pI των β-λακταμασών στα υπό εξέταση δείγματα υπολογίζονταν μέσω πρότυπης καμπύλης των συντελεστών μετατόπισης (R_f) των β-λακταμασών του μάρτυρα.

I. Καθαρισμός β-λακταμασών

Οι ποικιλίες των β-λακταμασών CMY-2 και GES απομονώθηκαν σε ομογενή πρωτεϊνικά παρασκευάσματα με εφαρμογή υγρής ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας στήλης. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη που έφεραν τα pBC πλασμιδιακά παράγωγα και υπερπαρήγαγαν τις β-λακταμάσες. Χρησιμοποιήθηκαν στήλες που περιείχαν 5 ml χρωματογραφικών μέσων Q-sepharose (ανταλλάκτης

ανιόντων) και S-sepharose (ισχυρός ανταλλάκτης κατιόντων) και προέρχονταν από την εταιρεία BioRad. Οι διαχωρισμοί έγιναν στο σύστημα FPLC (Fast Procedure Liquid Chromatography) BioRad Econo System. Το σύστημα περιλαμβάνει προγραμματίσιμο αναμίκτη δύο διαλυμάτων ώστε να δημιουργούνται καθορισμένες διαβαθμίσεις συγκεντρώσεων χρησιμοποιώντας ένα πυκνό και ένα αραιό διάλυμα, ανιχνευτή απορρόφησης UV στα 280 nm, και αυτόματο συλλέκτη κλασμάτων. Η μετακίνηση της υγρής φάσης κατά τη διάρκεια του καθαρισμού εξασφαλίζεται με βαθμονομημένη αντλία η οποία επιτυγχάνει σταθερές ταχύτητες ροής που μπορούν να ρυθμιστούν.

i. Εκχύλιση των πρωτεϊνών από τον περιπλασμικό χώρο των βακτηρίων

Τα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό ανακτήθηκαν με τον ίδιο τρόπο τόσο στα ένζυμα τύπου CMY-2 όσο και στα GES τύπου και τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται παρακάτω.

1. Καλλιέργεια των pBC στελεχών σε 100 ml ζωμού LB εμπλουτισμένου με 50 $\mu\text{g/ml}$ αμοξικιλίνης στους 37 °C ολονύκτια υπό συνεχή ανάδευση.
2. Εμβολιασμός 1000 ml (2X500) ζωμού LB εμπλουτισμένου με 50 $\mu\text{g/ml}$ αμοξικιλίνης με 100 ml (2X50) από τις ολονύκτιες καλλιέργειες.
3. Ανάπτυξη των βακτηρίων στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση μέχρις ότου $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,5$.
4. Κατακρήμνιση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 7000 rpm για 15 min (τα κύτταρα από το σύνολο του 1 L συλλέγονταν στον ίδιο σωλήνα φυγοκέντρησης).
5. Πλύσιμο των κυττάρων με 250 ml 0,1 M K^+P_i pH 7 και φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 4.
6. Αναδιάλυση σε 10 ml διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 8 (παρασκευάζονταν από διάλυμα 0,1 M).
7. Τοποθέτηση του εναιωρήματος σε κατάλληλο δοκιμαστικό σωλήνα και λύση των κυττάρων με υπερήχηση όπως στην ενότητα Θ.ι.5. Το συνολικό διάστημα υπερήχησης τώρα ήταν 7 min.
8. Διαύγαση του παρασκευάσματος όπως στην ενότητα Θ.ι.6.

9. Υπερδιήθηση σε φυγοκεντρικούς σωλήνες με φίλτρα 10 KDa Amikon. Το διάλυμα που εξέρχονταν στα δύο πρώτα φυγοκεντρικά στάδια αντικαθιστούνταν με διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8 ενώ στο τελευταίο στάδιο φυγοκέντρωσης δεν έγινε αντικατάσταση με αποτέλεσμα το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα να συμπυκνώνεται. Το στάδιο αυτό εξασφάλιζε i) την απομάκρυνση μικρών μορίων που ενδέχεται να παρεμβάλλονται στη δέσμευση των πρωτεϊνών στο χρωματογραφικό μέσο, ii) την σταθεροποίηση του pH στην τιμή που θα γίνει ο καθαρισμός και iii) την συμπύκνωση του δείγματος.
10. Εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

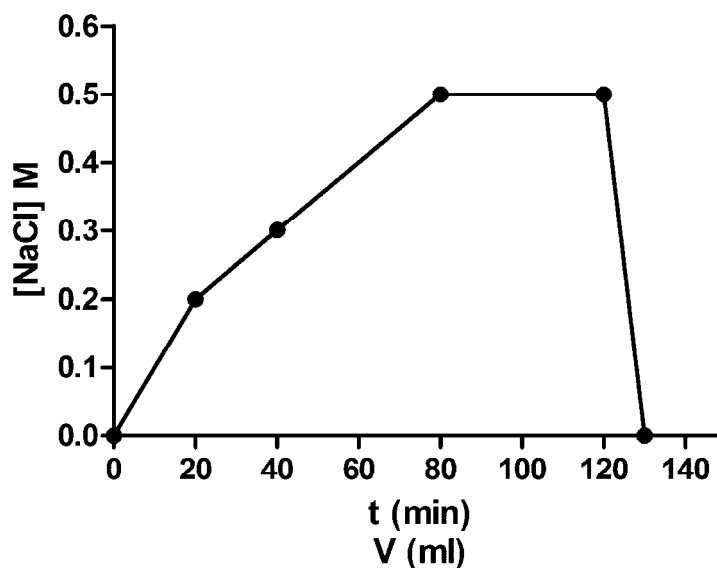
ii.. Χρωματογραφική κλασμάτωση των β-λακταμασών τύπου CMY-2

Οι β-λακταμάσες CMY-2, CMY-30 και CMY-42 χαρακτηρίζονται από pI ~9.2 οπότε σε pH μικρότερα από την τιμή αυτή θα είναι θετικά φορτισμένες. Ο καθαρισμός τους βασίστηκε στην παραπάνω ιδιότητα και έλαβαν χώρα δύο στάδια με το πρώτο να περιλαμβάνει τον ανταλλάκτη ανιόντων Q-Sepharose στον οποίο δεν δεσμεύτηκαν οι κεφαλοσπορινάσες εξαιτίας του θετικού τους φορτίου αλλά δεσμεύτηκαν αρκετές πρωτεΐνες του ακάθαρτου παρασκευάσματος ενώ στην συνέχεια οι β-λακταμάσες δεσμεύτηκαν στον ανταλλάκτη κατιόντων S-sepharose αφού πρώτα το διάλυμα στο παρασκεύασμα είχε αντικατασταθεί. Τα καθαρά παρασκευάσματα ανακτήθηκαν με έκλυση υπό διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω.

1. Φόρτιση της στήλης Q-sepharose ως εξής: Διαβίβαση 50 ml διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 8 (10 min, 5 ml/min) στην συνέχεια φόρτιση με 50 ml διαλύματος 2 M NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8 (10 min, 5 ml/min) και τέλος πλύσιμο με 50 ml διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 8 (10 min, 5 ml/min).
2. Εξισορρόπηση της στήλης με διαβίβαση 60 ml 20 mM Tris/HCl pH 8 στην ταχύτητα που γίνονταν ο καθαρισμός (1 ml/min).
3. Διαβίβαση 5 ml (~50 mg ολικής πρωτεΐνης) του παρασκευάσματος των πρωτεϊνών.

4. Συλλογή της υγρής φάσης στην οποία περιέχονται οι β-λακταμάσες που δεν δεσμεύτηκαν.
5. Πλύσιμο της στήλης με 20 mM Tris/HCl pH 8 και συλλογή της υγρής φάσης μέχρις ότου σταματήσει να ανιχνεύεται ενεργότητα β-λακταμάσης η οποία εκτιμούνταν με δοκιμή νιτροσεφίνης όπως στην ενότητα Θ.iii. Συνολικά από τα στάδια 4 και 5 συλλέγονταν περίπου 9 ml υλικού με ενεργότητα κεφαλοσπορινάσης.
6. Έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από την στήλη Q με το πυκνό διάλυμα NaCl και πλύσιμο με το αραιό ώστε να ξαναχρησιμοποιηθεί. Αν η στήλη δεν χρησιμοποιούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα αποθηκεύονταν σε 20 % v/v διαλύματος αιθανόλης.
7. Αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος στο παρασκεύασμα των β-λακταμασών με 20 mM διαλύματος φωσφορικών-νατρίου (Na^+P_i) pH 7 (παρασκευάζονταν από διαλύματα 1 M NaH_2PO_4 και 1 M Na_2HPO_4 αναμειγνύοντας για παρασκευή 1 L διαλύματος 42,3 ml από το πρώτο και 57,7 ml από το δεύτερο διάλυμα). Η αλλαγή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε με μοριακή διήθηση μέσω στηλών BioRad 10DG. Χρησιμοποιήθηκαν 3 στήλες σε κάθε διαχωρισμό στις οποίες φορτώθηκαν τα 9 ml του παρασκευάσματος των β-λακταμασών. Οι πρωτεΐνες εκλούονταν με 4 ml διαλύματος 20 mM Na^+P_i pH 7 (διάλυμα A) οπότε συνολικά προέκυπταν 12 ml παρασκευάσματος.
8. Φόρτιση της στήλης S-sepharose. Διαβίβαση 50 ml διαλύματος 20 mM Na^+P_i pH 7 (10 min, 5 ml/min) στην συνέχεια φόρτιση με 50 ml διαλύματος 2 M NaCl, 20 mM Na^+P_i pH 7 (10 min, 5 ml/min) και τέλος πλύσιμο με 50 ml διαλύματος 20 mM Na^+P_i pH 7 (10 min, 5 ml/min).
9. Εξισορρόπηση της στήλης με διαβίβαση 60 ml διαλύματος A στην ταχύτητα που γίνονταν ο καθαρισμός (1 ml/min).
10. Φόρτωση του παρασκευάσματος 12 ml στην στήλη (1 ml/min) με την συνολική ποσότητα των β-λακταμασών να δεσμεύεται σε αυτή καθώς στην εξερχόμενη υγρή φάση δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα β-λακταμάσης.
11. Πλύσιμο με ποσότητα διαλύματος A μέχρις ότου $\text{OD}_{280 \text{ nm}} < 0,002$ (συνήθως απαιτούνταν 100 ml διαλύματος).

12. Έκλουση των δεσμεύμενων πρωτεϊνών με διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl 0-0,5 M. Η διαβάθμιση δημιουργούνταν με ανάμειξη του διαλύματος A με διάλυμα 0,5 M NaCl 20 mM Na⁺P_i pH 7 (διάλυμα B). Η κλίση NaCl που χρησιμοποιήθηκε κατά τους καθαρισμούς δίνεται στην εικόνα 3. Έπειτα από την διαβίβαση 100% διαλύματος B η στήλη πλύθηκε με διάλυμα A με την ποσότητα διαλύματος B να μειώνεται σταδιακά (φάση 120 - 130 min, εικόνα 3). Με το πέρας του καθαρισμού ακολουθούσε πλύσιμο της στήλης με εφαρμογή ανάλογης διαδικασίας με αυτή που εφαρμόστηκε για την Q (βήμα 6).



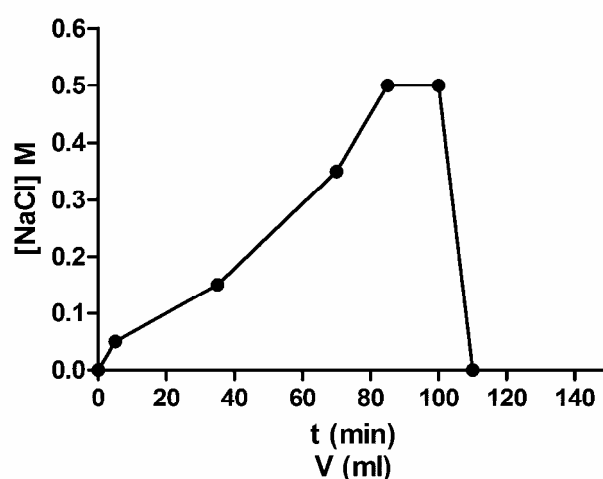
Εικόνα 3: Κλίση συγκέντρωσης NaCl που χρησιμοποιήθηκε κατά τον καθαρισμό των CMY β-λακταμασών στον ανταλλάκτη κατιόντων S-sepharose.

13. Οι CMY β-λακταμάσες εκλούονταν σε συγκέντρωση NaCl περίπου 80 - 150 mM. Τα κλάσματα (~16X1 ml) που εμφάνιζαν ενεργότητα υδρόλυσης νιτροσεφίνης αναλύονταν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) ώστε να εκτιμηθεί η καθαρότητά τους όπως περιγράφεται στην ενότητα iv. Τα κλάσματα με τη μέγιστη καθαρότητα και ποσότητα β-λακταμάσης ενώνονταν και ακολουθούσε μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσής με τη μέθοδο Bradford όπως περιγράφεται στην ενότητα v.

iii. Χρωματογραφική κλασμάτωση των β-λακταμασών τύπου GES

Οι ποικιλίες GES που φέρουν γλουταμικό οξύ στη θέση 104 (GES-1, GES-2 και GES-5) χαρακτηρίζονται από pI 5,9 ενώ αυτές με λυσίνη (GES-7, GES-13 και GES-6) έχουν pI 6,9. Έτσι στο διάλυμα που απομονώθηκαν από τους pBC κλώνους (20 mM Tris/HCl pH 8) θα είναι αρνητικά φορτισμένες και θα δεσμεύονται στον ανταλλάκτη ανιόντων Q-sepharose. Το πρώτο στάδιο καθαρισμού των ενζύμων περιελάμβανε δέσμευση στην παραπάνω στήλη ενώ στην συνέχεια ακολουθούσε αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να βρεθούν σε pH χαμηλότερο από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, να φορτιστούν θετικά και να δεσμευθούν στον ανταλλάκτη κατιόντων S-sepharose. Τα στάδια που εφαρμόστηκαν αναφέρονται παρακάτω.

1. Φόρτιση της στήλης Q όπως στο βήμα 1 της ενότητας ii.
2. Εξισορρόπηση με 60 ml 20 mM Tris/HCl pH 8 (διάλυμα A) στην ταχύτητα που γίνονταν ο καθαρισμός (1 ml/min).
3. Φόρτωση 5 ml πρωτεϊνικού παρασκευάσματος και πλύσιμο της στήλης με διάλυμα A μέχρις ότου $OD_{280\text{ nm}} < 0,002$. Οι GES δεσμεύονταν στην στήλη καθώς η ενεργότητα νιτροσεφίνης που ανιχνεύονταν στην έξοδο ήταν αμελητέα.
4. Έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών με κλίση συγκέντρωσης NaCl 0 - 0,5 M μέσω ανάμειξης διαλύματος A με διάλυμα 0,5 M NaCl 20 mM Tris/HCl pH 8 (διάλυμα B). Η διαβάθμιση συγκέντρωσης είχε τη μορφή που δίνεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl που χρησιμοποιήθηκε κατά τον καθαρισμό των ενζύμων τύπου GES στο πρώτο στάδιο καθαρισμού.

5. Τα κλάσματα που εμφάνιζαν ενεργότητα β-λακταμάσης και εκλούονταν από 80 - 100 mM NaCl αναλύθηκαν με SDS-PAGE, και αυτά τα οποία ήταν εμπλουτισμένα με ένζυμο ενώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα παρακάτω στάδια καθαρισμού.

6. Αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος με την χρήση ημιδιαπερατών μεμβρανών διαπίδυσης χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM MES pH 5,4 (διάλυμα A1) στις περιπτώσεις των GES-1, GES-2 και GES-5 και 20 mM MES pH 6,0 (διάλυμα A2) στις περιπτώσεις των GES-7, GES-13 και GES-6. Τα διαλύματα A1 και A2 παρασκευάζονταν από πυκνό διάλυμα 0,2 M MES με το αντίστοιχο pH να έχει ρυθμιστεί με NaOH. Η διαπίδυση γίνονταν ως εξής:

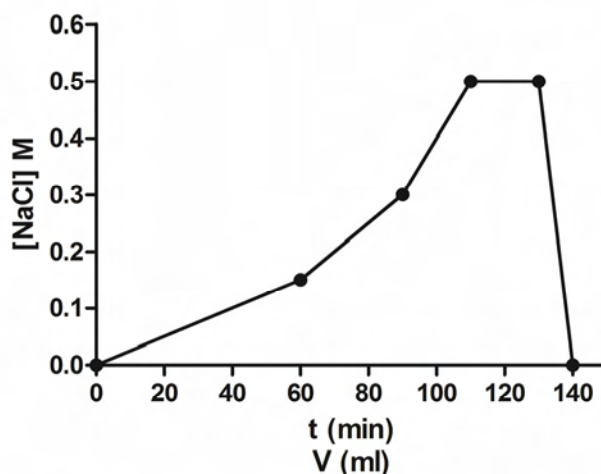
- Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 1 L διαλύματος A1 ή A2.
- Αντικατάσταση με νέο 1 L διαλύματος A1 ή A2 και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αλλαγή με 1 L διαλύματος A1 ή A2 και επώαση στους 4 °C ολονύκτια.
- Τελική επώαση με 1 L διαλύματος A1 ή A2 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έλεγχος pH και δοκιμή νιτροσεφίνης.

7. Φόρτιση της στήλης S-sepharose όπως στα παραπάνω στάδια με την διαφορά ότι η ρύθμιση pH γίνονταν από 20 mM MES pH 5,4 ή 20 mM MES pH 6,0.

8. Εξισορρόπηση με 60 ml διαλύματος A1 ή A2 στην ταχύτητα που γίνονταν ο καθαρισμός (1 ml/min).

9. Φόρτωση των πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων και πλύσιμο με διάλυμα A1 ή A2 μέχρις ότου $OD_{280\text{ nm}} < 0,002$. Οι β-λακταμάσες δεσμεύονταν στην στήλη.

10. Έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών με διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl 0 - 0,5 M αναμειγνύοντας διαλύματα A1 ή A2 με 0,5 M NaCl 20 mM MES pH 5,4 (διάλυμα B1) ή 0,5 M NaCl 20 mM MES pH 6,0 (διάλυμα B2) αντίστοιχα. Οι GES εκλούονταν σε συγκέντρωση NaCl 0,4 - 0,5 M. Η κλίση NaCl που χρησιμοποιήθηκε δίνεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση των πρωτεϊνών από την στήλη S-sepharose κατά τον καθαρισμό των ενζύμων GES.

11. Τα κλάσματα με ενεργότητα υδρόλυσης νιτροσεφίνης αναλύθηκαν με SDS-PAGE και αυτά με την υψηλότερη καθαρότητα ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με υπερδιήθηση χρησιμοποιώντας συσκευές Amicon με όριο 10 KDa ενώ ταυτόχρονα το ρυθμιστικό διάλυμα αντικαταστάθηκε με 50 mM K^+P_i pH 7, 50 mM NaCl. Ακολούθησε προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν σε 20 % γλυκερόλη στους -20°C .

iv. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) (Laemmli U. K., 1970)

Τα ακάθαρτα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα (πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βακτηρίων και ενδιάμεσα παρασκευάσματα της διαδικασίας καθαρισμού) και τα τελικά κλάσματα καθαρισμού των β-λακταμασών αναλύθηκαν ως προς το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιείχε SDS, μία τεχνική που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει μεγέθους.

α. Προετοιμασία δειγμάτων

5 μl ακάθαρτων παρασκευασμάτων και 15 μl από τα επιλεγμένα κλάσματα του καθαρισμού αναμειγνύονταν 1:1 με 2x διαλύματος φόρτωσης SDS-PAGE το οποίο είχε την παρακάτω σύσταση.

2x διάλυμα φόρτωσης SDS-PAGE

100 mM Tris/HCl pH 6,8

4 % w/v SDS

0,2 % w/v μπλέ του μεθυλενίου

20 % v/v γλυκερόλη

10% v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη

β. Παρασκευή του πήκτωματος

Το πήκτωμα συνίστατο στην γέλη φόρτωσης (5% ακρυλαμίδη, pH 6,8) και στην γέλη διαχωρισμού [10% ή 12 % ακρυλαμίδη (για τις CMY και GES αντίστοιχα), pH 8,8]. Αρχικά παρασκευάζονταν το πήκτωμα διαχωρισμού (15 ml) το οποίο είχε την παρακάτω σύσταση.

<u>Αντιδραστήρια (πρότυπα διαλύματα)</u>	<u>Όγκος (ml)</u>	
	10% ακρυλαμίδη	12% ακρυλαμίδη
H ₂ O	5,9	4,9
30% w/v ακρυλαμίδη (29:1 ακρυλαμίδη:bis-ακρυλαμίδη)	5	6
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	3,8	3,8
10 % SDS	0,15	0,15
10 % υπερθειικό αμμώνιο	0,15	0,15
<u>TEMED 100% v/v</u>	<u>0,006</u>	<u>0,006</u>

Το παραπάνω μίγμα χυτεύονταν σε δύο κάθετα εκμαγεία που αποτελούνταν από δύο γυάλινες πλάκες της συσκευής MiniProtean της εταιρείας BioRad. Το πήκτωμα αφήνονταν να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου αφού πρώτα η πάνω επιφάνειά του ομαλοποιούνταν με προσθήκη H₂O. Στην συνέχεια παρασκευάζονταν το πήκτωμα φόρτωσης (5 ml) που αποτελούνταν από τα εξής:

<u>Αντιδραστήρια (πρότυπα διαλύματα)</u>	<u>Όγκος (ml)</u>
H ₂ O	3,4
30% w/v ακρυλαμίδη	0,83
1 M Tris/HCl pH 6,8	0,63
10 % SDS	0,05
10 % υπερθειικό αμμώνιο	0,05
<u>TEMED 100% v/v</u>	<u>0,005</u>

Το παραπάνω μίγμα χυτεύονταν πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού αφού πρώτα είχε απομακρυνθεί το νερό και τοποθετούνταν οι πλαστικές χτένες που δημιουργούν τις θέσεις φόρτωσης ενώ στη συνέχεια αφήνονταν να πολυμεριστεί.

γ. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Οι γυάλινες πλάκες που περιείχαν τα πηκτώματα τοποθετούνταν στη συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης MiniProtean και στα διαμερίσματα των ηλεκτροδίων της καθόδου και της ανόδου τοποθετούνταν 1X διαλύματος Tris-γλυκίνης pH 8,3 το οποίο παρασκευάζονταν από διάλυμα 5X που περιείχε:

5X διαλύματος Tris-γλυκίνης

125 mM Tris

1,25 M γλυκίνη

0,5 % SDS

Στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα που αναφέρονται στην ενότητα α επωάζονταν για 5 min σε υδατόλουτρο που ήταν σε κατάσταση βρασμού και στην συνέχεια φορτώνονταν στο πήκτωμα με μικροσύριγγα (ακάθαρτα παρασκευάσματα 10 μl, κλάσματα καθαρισμού 30 μl). Στην πρώτη θέση κάθε πηκτώματος ηλεκτροφορούσαν 5 μl του μίγματος πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας Benchmark Protein Ladder (Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση γίνονταν σε σταθερό ρεύμα έντασης 35 mA και η μέγιστη τάση ρυθμίζονταν στα 180 V σε κατάλληλο τροφοδοτικό. Η ηλεκτροφόρηση διαρκούσε περίπου 1 ώρα.

Με την παραπάνω διαδικασία οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται εξαιτίας της δράσης του SDS, της μερκαπτοαιθανόλης και του βρασμού ενώ αποκτούν αρνητικό φορτίο εξαιτίας του κελύφους μορίων SDS που τις περιβάλλει. Υπό τη δράση του ηλεκτρικού πεδίου μετατοπίζονται στο εσωτερικό του πηκτώματος και όταν εισέλθουν στη γέλη διαχωρισμού η κίνησή τους επιβραδύνεται από τους πόρους του πηκτώματος. Όσο υψηλότερη είναι η μοριακή μάζα των πρωτεϊνικών μορίων τόσο μεγαλύτερη θα είναι η αντίσταση που δέχονται από το πήκτωμα με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός βάσει μεγέθους.

δ. Χρώση του πηκτώματος

Η εμφάνιση των ζωνών των πρωτεϊνών που είχαν διαχωριστεί με την παραπάνω διαδικασία γίνονταν με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 η οποία δεσμεύεται μη ειδικά στις πρωτεΐνες αλλά όχι στα συστατικά του πηκτώματος. Η χρώση γίνονταν παράλληλα με τη μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα ως εξής:

1. Επώαση του πηκτώματος διαχωρισμού για 30 min σε 100 ml διαλύματος 0,25% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250 σε μεθανόλη-οξικό οξύ-H₂O με αναλογίες όγκων 50:10:40.
2. Αποχρωματισμός του πηκτώματος με διάχυση της περίσσειας της χρωστικής σε διάλυμα που περιείχε μεθανόλη-οξικό οξύ-H₂O με αναλογίες όγκων 45:10:45. Ο αποχρωματισμός γίνονταν με επανειλημμένες ανανεώσεις του διαλύματος μέχρις ότου οι ζώνες των πρωτεϊνών να εμφανιστούν έντονες σε διαφανές υπόβαθρο.
3. Επανυδάτωση του πηκτώματος με H₂O.
4. Διατήρηση του πηκτώματος σε χαρτί Whatmann με αποξήρανση στους 55 °C υπό κενό.

iv. Μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων

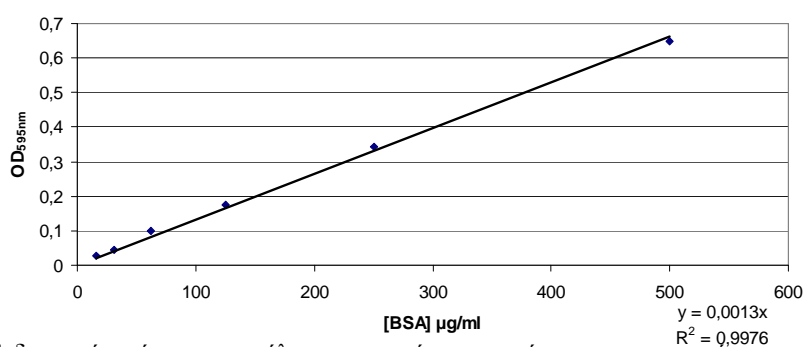
Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παρασκευάσματα που προέκυψαν από την διαδικασία καθαρισμού εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Protein Assay της εταιρείας BioRad και πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) συγκέντρωσης 10 mg/ml. Ο προσδιορισμός γίνονταν ως εξής:

1. Αραίωση του πρότυπου διαλύματος BSA σε H₂O ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκέντρωσης 500, 250, 125, 62,5, 31,25 και 15,63 μg/ml.
2. Το αντιδραστήριο αραιώνονταν με 4 όγκους νερού (5 φορές αραίωση).
3. Προσθήκη 100 μl από το κάθε πρότυπο διάλυμα σε 5 ml αραιωμένου αντιδραστηρίου.
4. Προσθήκη 100 μl από το κάθε δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης σε 5 ml αραιωμένου αντιδραστηρίου. Στην περίπτωση των ακάθαρτων παρασκευασμάτων το αρχικό δείγμα αραιώνονταν 10 ή/και 100 φορές με H₂O και ο προσδιορισμός γίνονταν για τα αραιωμένα δείγματα ενώ η συγκέντρωση των αρχικών εκτιμούνταν με αναγωγή.
4. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 595 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi UV/Vis αφού πρώτα

το όργανο είχε μηδενιστεί με τυφλά δείγματα που περιείχαν 100 μl H_2O σε 5 ml αραιωμένου αντιδραστηρίου.

5. Γραφική αναπαράσταση των τιμών οπτικής πυκνότητας των πρότυπων διαλυμάτων ως προς την συγκέντρωσή τους (πρότυπη καμπύλη).

6. Υπολογισμός των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών στα υπό εξέταση δείγματα (σε $\mu\text{g}/\text{ml}$) από την εξίσωση με την οποία αυτές συσχετίζονται με την οπτική πυκνότητα στα 595 nm όπως προκύπτει από εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης στην πρότυπη καμπύλη (εικόνα 6).

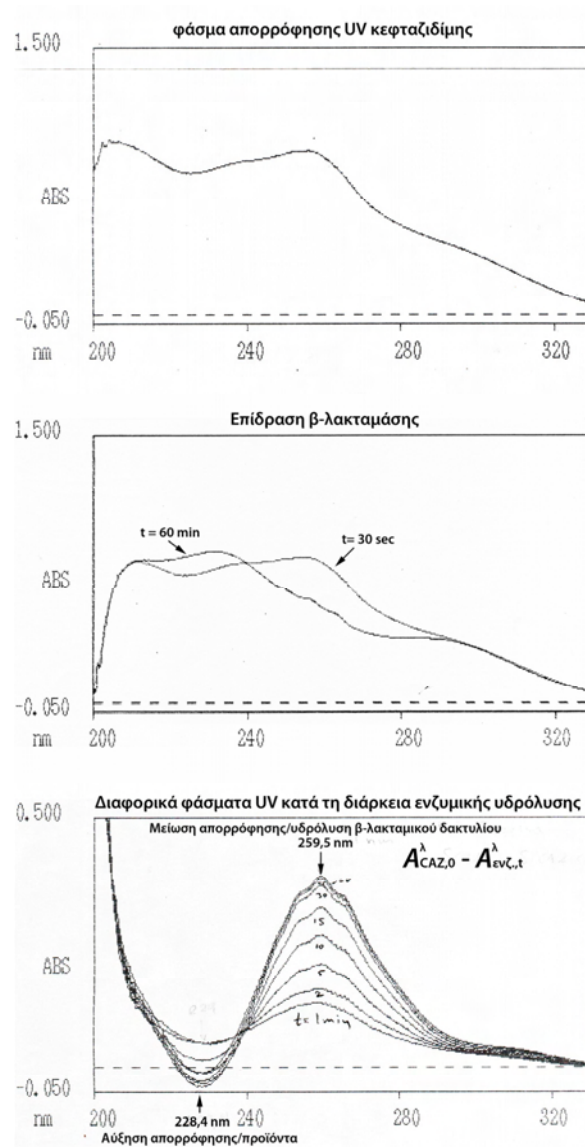


Εικόνα 6: Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη που προέκυψε κατά την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα παρασκευάσματα των β -λακταμασών με τη μέθοδο Bradford.

Κ. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης και παραμέτρων αναστολής β -λακταμασών

ι. Φασματοφωμετρικός προσδιορισμός υδρόλυσης β -λακταμικών αντιβιοτικών

Τα β -λακταμικά αντιβιοτικά παρουσιάζουν απορρόφηση σε διάφορα μήκη κύματος στο φάσμα UV εξαιτίας της ενεργοποίησης των π -ηλεκτρονίων τους (π.χ. κεφταζιδίμη, εικόνα 7). Όταν ο β -λακταμικός δακτύλιος σε αυτά διασπάται παρατηρείται μείωση της απορρόφησης σε έναν συγκεκριμένο μήκος κύματος που είναι χαρακτηριστικό για τα διάφορα β -λακταμικά μόρια. Στο παράδειγμα της εικόνας 7 όταν ένα ένζυμο που υδρολύει κεφταζιδίμη επιδρά σε αυτή παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στην περιοχή 240 - 280 nm η οποία μείωση αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου και κορυφώνεται στα 259,5 nm ενώ το φάσμα μετατοπίζεται προς τα 229 nm που πιθανώς αντιστοιχεί στην απορρόφηση κάποιων προϊόντων της αντίδρασης.



Εικόνα 7: Τροποποίηση του φάσματος UV της κεφαζιδίμης κατά την επίδραση β-λακταμάσης που την υδρολύει. Ο προσδιορισμός έγινε σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2001 UV/Vis σε κυψελίδα χαλαζία 1 ml οπτικής διαδρομής 1 cm και χρησιμοποιήθηκαν 50 μM κεφαζιδίμης σε 0,1 M K^+P_i pH 7 ενώ η υδρόλυση έλαβε χώρα από 0,5 μM CMY-30. Το φάσμα ακτινοβολίας UV 200 - 330 nm σαρώνονταν κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης και οι καμπύλες απορρόφησης που προέκυπταν αφαιρούνταν από την αντίστοιχη της κεφαζιδίμης χωρίς ένζυμο ώστε να προκύψουν τα διαφορικά φάσματα.

Το μήκος κύματος όπου παρατηρείται μέγιστη μείωση της απορρόφησης κατά τη διάσπαση του β-λακταμικού δακτυλίου στο μόριο δεν συμπίπτει με το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της μη-υδρολυμένης β-λακτάμης. Η μεταβολή αυτή στο συγκεκριμένο μήκος κύματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί ο αριθμός των μορίων που έχουν υδρολυθεί ως εξής:

Σύμφωνα με το νόμο του Beer η απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος ενός μορίου σε διάλυμα (A_λ) είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του διαλύματος ως προς το μόριο αυτό (C) και μεταξύ τους συνδέονται με τη σχέση:

$$A_\lambda = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

Εξίσωση 1

Όπου l το μήκος που διανύει η φωτεινή δέσμη διερχόμενη από το διάλυμα σε cm και ε η μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας ή σταθερά απορρόφησης σε $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ όταν η συγκέντρωση του διαλύματος είναι σε μονάδες μοριακότητας M . Η γραμμικότητα του νόμου Beer ισχύει όταν $A < 1$ και άρα το εύρος των συγκεντρώσεων που ικανοποιούν την εξίσωση 1 είναι περιορισμένο ενώ μπορεί να διευρυνθεί ελαφρά χρησιμοποιώντας κυψελίδα με μικρότερη οπτική διαδρομή.

Αν τώρα στην εξίσωση 1 όπου A αντικαταστήσουμε με τη διαφορά ΔA που παρατηρείται στο μήκος κύματος μέγιστης "απορρόφησης του β-λακταμικού δακτυλίου" η εκτίμηση του αριθμού των μορίων που έχουν υδρολυθεί σε μονάδες μοριακότητας μπορεί να γίνει γνωρίζοντας τον "συντελεστή απορρόφησης του β-λακταμικού δακτυλίου". Επειδή όμως στο συγκεκριμένο μήκος κύματος παρουσιάζουν απορρόφηση και τα προϊόντα της αντίδρασης η μέτρηση της σταθεράς ε γίνεται με έμμεσο τρόπο ως εξής: Επιλέγεται συγκέντρωση β-λακταμικού όπου στο μήκος κύματος μέγιστης μείωσης η απορρόφηση του μη-υδρολυμένου αντιβιοτικού βρίσκεται εντός των ορίων του νόμου του Beer σε κυψελίδα με οπτική διαδρομή 1 cm. Στην συνέχεια εκτιμάται η διαφορά στην απορρόφηση που παρατηρείται όταν το σύνολο των μορίων έχει υδρολυθεί το οποίο διαπιστώνεται με κάποια άλλη μέθοδο προσδιορισμού της β-λακτάμης. Η σταθερά απορρόφησης $\Delta\varepsilon$ υπολογίζεται με αναγωγή σε αρχική συγκέντρωση 1 M (O'Callaghan και συν., 1972). Έτσι λοιπόν επί παραδείγματι έχει βρεθεί ότι όταν 100 μM (10^{-4} M) κεφαλοθίνης υδρολυθούν πλήρως στα 262 nm σε κυψελίδα $l = 1$ cm στους 25 °C σε pH 7 παρατηρείται μείωση απορρόφησης 0,766 και άρα η μοριακή απορροφητικότητα ($\Delta\varepsilon$) που χαρακτηρίζει τον β-λακταμικό δακτύλιο της κεφαλοθίνης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος θα είναι $7660 M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Ουσιαστικά η "σταθερά" αυτή αποτελεί τη διαφορά των συντελεστών απορρόφησης του μη-υδρολυμένου β-λακταμικού και των προϊόντων της υδρόλυσης. Τα μήκη κύματος και οι συντελεστές απορρόφησης για τα β-λακταμικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Μήκη κύματος και συντελεστές απορρόφησης διάσπασης του β-λακταμικού δακτυλίου (Power P. και συν., 2006)

β-λακτάμη	μήκος κύματος λ (nm)	Δε (M ⁻¹ ·cm ⁻¹)
πενικιλίνη G	233	900
κεφαλοθίνη	262	7660
κεφοταξίμη	266	6700
κεφταζιδίμη	260	8660
κεφοξιτίνη	260	7700
αζτρεονάμη	318	660
μιπενέμη	300	9000
νιτροσεφίνη	482	15200

Έτσι λοιπόν η εξίσωση 1 παίρνει τη μορφή

$$\Delta A = \Delta C \cdot \Delta \varepsilon \cdot l \quad \text{Εξίσωση 2}$$

Όπου ΔC η συγκέντρωση των υδρολυμένων β-λακταμικών μορίων. Άρα παρακολουθώντας την απορρόφηση στα μήκη κύματος που δίνονται στον πίνακα 2 είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του β-λακταμικού υποστρώματος που έχει υδρολυθεί (ΔS) σε κάθε χρονική στιγμή σύμφωνα με την σχέση.

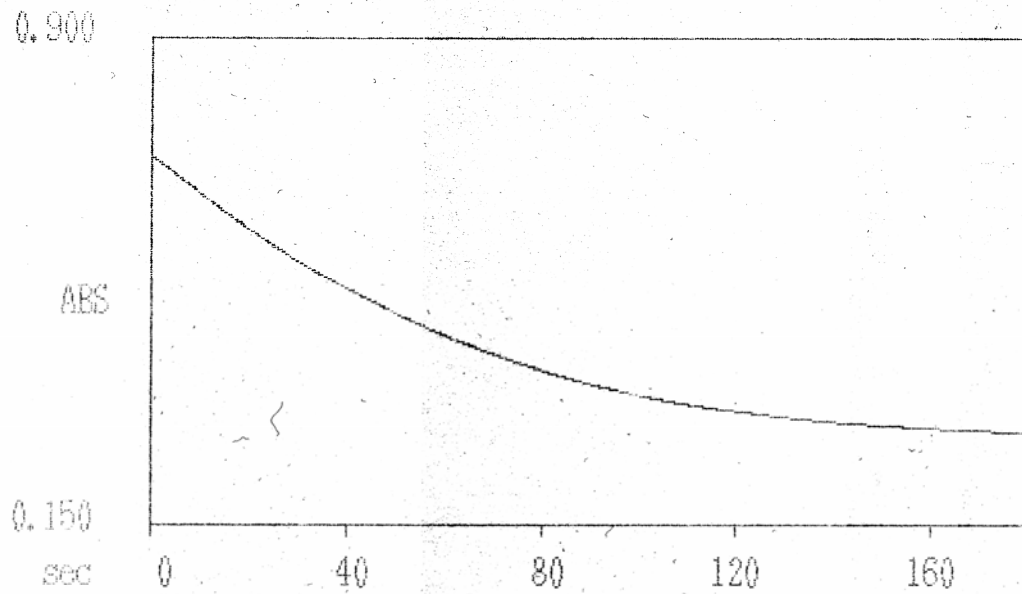
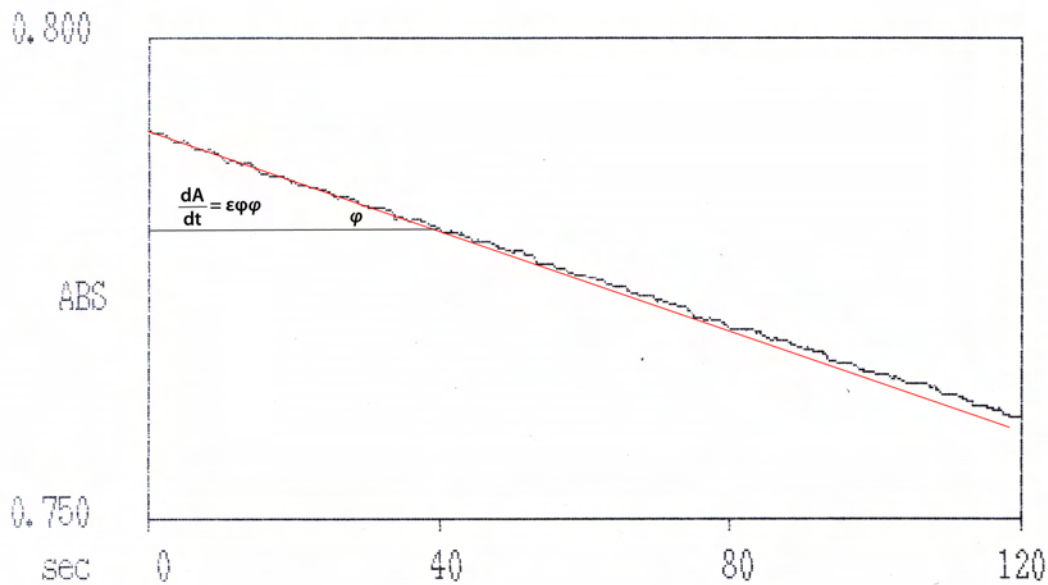
$$\Delta S = \Delta A \cdot \frac{1}{\Delta \varepsilon \cdot l} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

ii. *Μέτρηση αρχικής ταχύτητας ενζυμικής υδρόλυσης β-λακταμικών αντιβιοτικών και μονάδων ενεργότητας β-λακταμασών* (Copeland R. A., 2000)

Η εκτίμηση των ταχυτήτων ενζυμικής υδρόλυσης στην παρούσα μελέτη έγινε με συνεχή παρακολούθηση της πτώσης της απορρόφησης κατά την "καταστροφή" του β-λακταμικού δακτυλίου (κατανάλωση υποστρώματος) με φασματοφωτομετρία υπεριώδους σε κατάλληλα επιλεγμένα χρονικά διαστήματα (εκτός από την περίπτωση της νιτροσεφίνης όπου παρακολουθούνταν η δημιουργία προϊόντος στα 482 nm του ορατού) με τη χρήση φωτομέτρου διπλής δέσμης HITACHI U-2001 UV/Vis και κυψελίδες χαλαζία όγκου 1 ml με οπτική διαδρομή 1 cm. Οι προσδιορισμοί γίνονταν στους 25 °C με την χρήση κυκλοφορητή νερού που διατηρούσε σταθερή τη θερμοκρασία της διάταξης ενώ το pH ήταν σταθερό στην τιμή 7 χρησιμοποιώντας κατάλληλα

ρυθμιστικά διαλύματα (0,1 M K^+P_i pH 7 για τις CMY και 50 mM MOPS/50 mM NaCl pH 7 για τις GES). Το όργανο μηδενίζονταν με ρυθμιστικό διάλυμα. Αρχικά καταγράφονταν η μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος υποστρώματος χωρίς την προσθήκη ενζύμου ώστε να εξασφαλισθεί ότι αυτή παραμένει σταθερή κατά το χρονικό διάστημα μέτρησης (καταγραφή μάρτυρας). Κατάλληλος όγκος ενζυμικού παρασκευάσματος που είχε επιλεγεί για την μέτρηση συμπλήρωνε το ρυθμιστικό διάλυμα στην κυψελίδα ως τα 900 μ l και η έναρξη της αντίδρασης γίνονταν με προσθήκη 100 μ l υποστρώματος δεκαπλάσιας συγκέντρωσης από την τελική. Τα πυκνά διαλύματα υποστρωμάτων παρασκευάζονταν με αραιώση (στο ρυθμιστικό διάλυμα που γίνονταν η μέτρηση) πρότυπων διαλυμάτων που αποθηκεύονταν στους -20 ή -80 °C. Ακολουθούσε γρήγορη ανάδευση και απευθείας καταγραφή της πτώσης της απορρόφησης στο όργανο.

Η καταστροφή του υποστρώματος (ή η δημιουργία προϊόντος) στις ενζυμικές αντιδράσεις ακολουθεί κινητική ψευδο-πρώτης τάξης με την συγκέντρωσή του να μειώνεται εκθετικά με την πάροδο του χρόνου. Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης βαίνει μειούμενη καθώς η ποσότητα του υποστρώματος που είναι διαθέσιμη στο ένζυμο μειώνεται (εικόνα 8A). Στα αρχικά στάδια της αντίδρασης όμως όπου η συγκέντρωση του υποστρώματος δεν έχει μειωθεί σημαντικά η ταχύτητα καταστροφής του υποστρώματος μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο. Το διάστημα αυτό, που ακολουθεί τη φάση δημιουργίας των συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος η οποία είναι συνήθως είναι πολύ γρήγορη (< 1 sec), αντιστοιχεί στην κατάσταση ισορροπίας όπου η συγκέντρωση των συμπλόκων ενζύμου υποστρώματος παραμένει σταθερή. Η σταθερή αυτή αρχική ταχύτητα σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση υποστρώματος σύμφωνα με την εξίσωση *Michaelis* (Γενικό μέρος, εξίσωση 1 σελ. 81).

A**B**

Εικόνα 8: A) Πτώση της απορρόφησης στα 262 nm κατά την υδρόλυση 100 μM κεφαλοθίνης από τη CMY-30 χρησιμοποιώντας 10 nM καθαρισμένου ενζύμου. Όσο το υπόστρωμα καταναλώνεται τόσο ο ρυθμός υδρόλυσης μειώνεται. B) Υδρόλυση 100 μM κεφαλοθίνης χρησιμοποιώντας 0,2 nM CMY-30. Η ταχύτητα υδρόλυσης παραμένει σταθερή κατά τα πρώτα 40 sec της αντίδρασης. Στο διάστημα αυτό θεωρείται ότι έχει επιτευχθεί η κατάσταση ισορροπίας. Η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης υπολογίζεται από την κλίση του γραμμικού αυτού τμήματος μεταβολής της απορρόφησης.

Μεταβάλλοντας τις συνθήκες της μέτρησης, χρησιμοποιώντας συνήθως μικρή ποσότητα ενζύμου, είναι δυνατόν το διάστημα γραμμικότητας να επιμηκυνθεί και η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης να μετρηθεί με ακρίβεια. Κατά την παρακολούθηση της υδρόλυσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών με φασματοφωτομετρία UV οι συνθήκες μέτρησης ρυθμίζονταν έτσι ώστε η κατανάλωση του υποστρώματος να είναι περιορισμένη και η απορρόφηση να μειώνεται γραμμικά με τον χρόνο για ένα διάστημα μερικών δεκάδων δευτερολέπτων από την έναρξη της αντίδρασης (εικόνα 8B).

Στα πειράματα αυτά η κλίση της ευθείας μεταβολής της απορρόφησης σε σχέση με τον χρόνο ($\Delta A/\Delta t$) έδινε την ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος σύμφωνα με την εξίσωση 4 η οποία προκύπτει από την εξίσωση 3 (για $l = 1 \text{ cm}$).

$$\frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad \text{Εξίσωση 4}$$

Η μεταβολή της απορρόφησης υπολογίζονταν ανά δευτερόλεπτο και η ταχύτητα υδρόλυσης σε μονάδες $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, οπότε απαιτούνταν μετασχηματισμός της $\Delta \epsilon$ σε $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ σύμφωνα με την εξίσωση 5.

$$\nu = \frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\Delta \epsilon} \cdot 10^6 (\mu\text{M} / \text{s}) \quad \text{Εξίσωση 5}$$

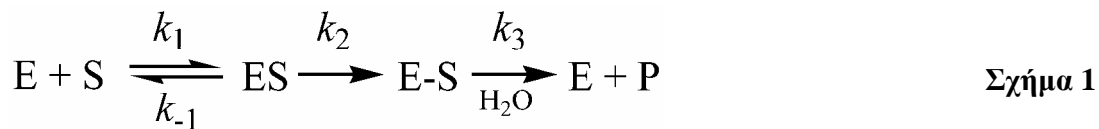
Από την ταχύτητα αυτή (ν) υπολογίζονταν οι μονάδες ειδικής ενεργότητας β-λακταμάσης σε nmol υποστρώματος/ min/mg ολικής πρωτεΐνης στην περίπτωση ακάθαρτων παρασκευασμάτων ώστε να εκτιμηθεί το υδρολυτικό προφίλ κάθε ενζύμου ενώ στην περίπτωση που μετρούνταν η υδρόλυση ομογενών παρασκευασμάτων β-λακταμασών ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών υδρόλυσης k_{cat} και K_{m} όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

Οι μονάδες ειδικής ενεργότητας β-λακταμάσης ενός παρασκευάσματος με ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση $x \text{ mg/ml}$ από το οποίο είχαν προστεθεί $y \text{ ml}$ στην κυψελίδα της αντίδρασης ($V = 1 \text{ ml}$) δίνονται από την εξίσωση 6 η οποία προκύπτει μετατρέποντας την ταχύτητα της εξίσωσης 5 σε $\text{nmol/L}/\text{min}$ (πολλαπλασιάζοντας με $60\cdot 10^3$) και υπολογίζοντας την συγκέντρωση των πρωτεϊνών στην κυψελίδα της αντίδρασης η οποία θα είναι $(x\cdot y) \text{ mg} / 10^{-3} \text{ L}$ σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης.

$$\text{units}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mg}) = \frac{\Delta S}{\Delta t} \cdot 60 \cdot \frac{1}{x \cdot y} \quad \text{Εξίσωση 6}$$

iii. Μέτρηση κινητικών σταθερών υδρόλυσης

Οι ποικιλίες των ενζύμων CMY-2 και GES τύπου ως β-λακταμάσες σερίνης κατά την υδρόλυση των β-λακταμικών, όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, θα χαρακτηρίζονται από το μηχανισμό κατάλυσης που δίνεται στο σχήμα 1. Στην κατάσταση ισορροπίας όπου οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου *Michaelis* και του ακυλ-ενζύμου παραμένουν σταθερές η αρχική ταχύτητα υδρόλυσης σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση υποστρώματος σύμφωνα με την εξίσωση 7 η οποία προκύπτει από τις εξισώσεις 1 και 2 του γενικού μέρους (σελ. 83).



$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Εξίσωση 7}$$

Όταν η συγκέντρωση του ενζύμου είναι γνωστή τότε οι σταθερές k_{cat} και K_m μπορούν να υπολογιστούν από την εξίσωση 7 μετρώντας τις αρχικές ταχύτητες υδρόλυσης σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ο υπολογισμός μπορεί να γίνει απευθείας μέσω μη-γραμμικής παλινδρόμησης των δεδομένων της αρχικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση υποστρώματος σύμφωνα με την εξίσωση 7 ή μετασχηματίζοντας τα δεδομένα σύμφωνα με κάποια από τις τεχνικές με τις οποίες η εξίσωση 7 παίρνει γραμμική μορφή (π.χ. Lineweaver-Burk, εξίσωση 8 ή Eadie-Hofstee, εξίσωση 9).

Εξίσωση Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_{cat} \cdot [E]_0} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat} \cdot [E]_0} \quad \text{Εξίσωση 8}$$

Εξίσωση Eadie-Hofstee

$$v = k_{cat} \cdot [E]_0 - K_m \cdot \left(\frac{v}{[S]} \right) \quad \text{Εξίσωση 9}$$

Τα ένζυμα που χαρακτηρίστηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν καθαριστεί και κατά συνέπεια η συγκέντρωση που χρησιμοποιούνταν για τη μέτρηση των αρχικών ταχυτήτων υδρόλυσης των β-λακταμικών υποστρωμάτων ήταν γνωστή οπότε ήταν δυνατή η εκτίμηση των κινητικών σταθερών που τα χαρακτηρίζουν. Οι μετρήσεις γίνονταν προσδιορίζοντας τις αρχικές ταχύτητες με τον τρόπο που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος. Στη συνέχεια οι αρχικές ταχύτητες "διορθώνονταν" ως προς την περιεκτικότητα του ενζύμου στην κυψελίδα σε μM και μετασχηματίζονταν με αυτό τον τρόπο σε μονάδες ανά δευτερόλεπτο (s^{-1}). Οι σταθερές υδρόλυσης υπολογίζονταν με μη-γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση 10 (που προκύπτει από την εξίσωση 7) με την χρήση του λογισμικού GraphPad Prism και με γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση 11 που προκύπτει από την Lineweaver-Burk και έχει τη μορφή $y=\alpha x+\beta$ με $\alpha = K_m/k_{cat}$ και $\beta = 1/k_{cat}$.

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Εξίσωση 10}$$

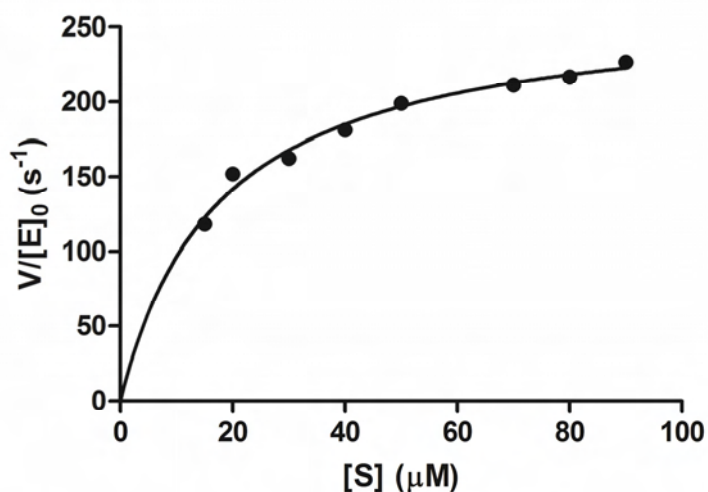
$$\frac{1}{(v/[E]_0)} = \frac{K_m}{k_{cat}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad \text{Εξίσωση 11}$$

Έτσι λοιπόν κατά την υδρόλυση 15 - 90 μM κεφαλοθίνης από τη CMY-2 χρησιμοποιώντας 0,2 - 0,3 nM ενζύμου (ή $0,2 \cdot 10^{-3}$ - $0,3 \cdot 10^{-3}$ μM) στην κυψελίδα της αντίδρασης προέκυψαν οι τιμές που δίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Υπολογισμός k_{cat} και K_m που χαρακτηρίζουν την υδρόλυση κεφαλοθίνης από τη CMY-2

[S] (μM)	$v/[E]_0$ (s^{-1})	$1/[S]$ (μM^{-1})	$1/(v/[E]_0)$ (s)
90	226,675	0,0111	0,0044
80	216,695	0,0125	0,0046
70	211,370	0,0143	0,0047
50	199,041	0,0200	0,0050
40	181,210	0,0250	0,0055
30	162,450	0,0333	0,0062
20	152,056	0,0500	0,0066
15	118,250	0,0667	0,0085

Για το συγκεκριμένο παράδειγμα μη-γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση 10 δίνει την καμπύλη της εικόνας 9 η οποία ικανοποιείται από τιμές k_{cat} και K_m 266,5 s^{-1} και 17,45 μM αντίστοιχα (πίνακας 4).

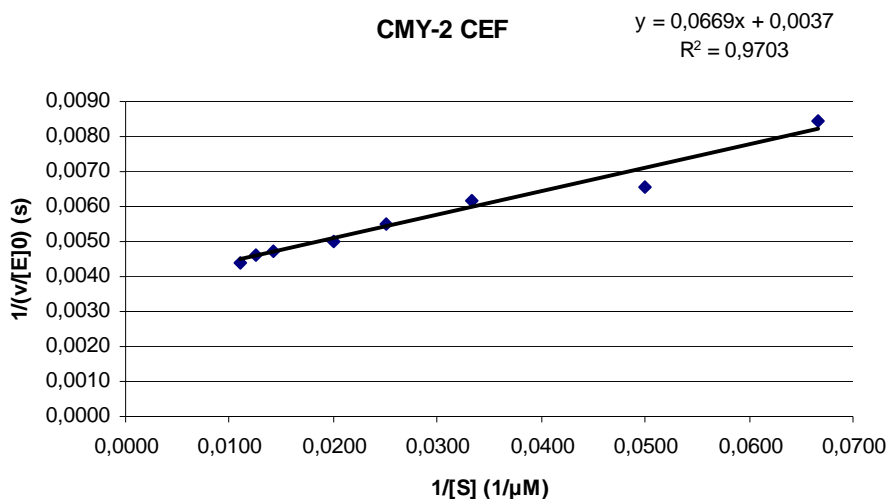


Εικόνα 9: Καμπύλη των δεδομένων του πίνακα 3 που ικανοποιούν την εξίσωση 10.

Πίνακας 4: Δεδομένα μη γραμμικής παλινδρόμησης με το λογισμικό GraphPad Prism

Michaelis-Menten	
Best-fit values	
KCAT	266,5
KM	17,45
Std. Error	
KCAT	7,530
KM	1,728
95% Confidence Intervals	
KCAT	248.1 to 284.9
KM	13.42 to 21.88
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	6
R ²	0,9800
Absolute Sum of Squares	193,8
Sy.x	5,683
Constraints	
KM	KM > 0.0
Number of points	
Analyzed	8

Μετασχηματισμός των δεδομένων του πίνακα 3 σύμφωνα με την εξίσωση 11 δίνει την ευθεία της εικόνας 10 που χαρακτηρίζεται από την εξίσωση $y = 0,0669x + 0,0037$ και άρα θα είναι $1/k_{cat} = 0,0037$ άρα $k_{cat} = 270,3 \text{ s}^{-1}$ και $K_m/k_{cat} = 0,0669$ άρα $K_m = 18,1 \text{ }\mu\text{M}$.



Εικόνα 10: Ευθεία που προκύπτει συσχετίζοντας τα μετασχηματισμένα δεδομένα του πίνακα 3 με την εξίσωση 11.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τρόποι μέτρησης των σταθερών υδρόλυσης. Οι τιμές που προέκυψαν από τη μη-γραμμική παλινδρόμηση επιλέχθηκαν για τις συγκρίσεις μεταξύ των διάφορων ποικιλιών CMY-2 και GES καθώς ο τρόπος υπολογισμού μέσω της εξίσωσης Lineweaver-Burk για μικρά πειραματικά σφάλματα στην εκτίμηση των αρχικών ταχυτήτων δίνει μεγάλες αποκλίσεις του όρου $1/v$ οι οποίες είναι εκτεταμένες σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

Οι μετρήσεις των σταθερών υδρόλυσης όπως έχει συζητηθεί από τον Copeland RA (Copeland R. A., 2000) για να είναι ακριβείς θα πρέπει οι πειραματικές συνθήκες να έχουν ρυθμιστεί έτσι ώστε οι μετρούμενες αρχικές ταχύτητες να βρίσκονται στην περιοχή 20 - 80% της μέγιστης ταχύτητας υδρόλυσης (V_{max}) και άρα οι συγκεντρώσεις υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να αντιστοιχούν σε $0,25 - 5 \cdot K_m$. Η παραπάνω προϋπόθεση κατά τη φασματοφωτομετρική εκτίμηση της ταχύτητας υδρόλυσης των β-λακταμικών είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί καθώς τίθενται περιορισμοί που στο ανώτερο οριό τους αφορούν το κατώφλι γραμμικότητας του νόμου του Beer και στο κατώτερο την πολύ μικρή απορρόφηση χαμηλών συγκεντρώσεων και τις πολύ μικρές μεταβολές της απορρόφησης στις χαμηλές αυτές συγκεντρώσεις που

βρίσκονται στο όριο ανίχνευσης του οργάνου. Έτσι για τα περισσότερα β-λακταμικά οι μετρούμενες σταθερές κατά την υδρόλυση από β-λακταμάσες είναι προσεγγίσεις των πραγματικών.

Όταν ένα ένζυμο χαρακτηρίζεται από πολύ μικρή σταθερά K_m τότε στις συγκεντρώσεις β-λακταμικού που μπορούν να μετρηθούν οι αρχικές ταχύτητες δεν μεταβάλλονται με τη μεταβολή της ποσότητας του υποστρώματος καθώς το ενεργό κέντρο είναι κορεσμένο με υπόστρωμα. Εκτίμηση των αρχικών ταχυτήτων σε $[S] \gg K_m$ δίνει μία καλή προσέγγιση της μέγιστης ταχύτητας υδρόλυσης και στην περίπτωση αυτή από την εξίσωση 10 θα είναι $k_{cat} = v/[E]_0$. Ουσιαστικά το υπόστρωμα συμπεριφέρεται ως μη αντιστρεπτός αναστολέας του ενζύμου και μία προσέγγιση της φαινόμενης συγγένειας του ως προς αυτό (K_m) δίνεται από την σταθερά αναστολής (K_i). Η K_i μετράται σε πειράματα ανταγωνισμού όπου εκτιμάται η απώλεια ενεργότητας που προκαλείται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα ως προς την υδρόλυση ενός υποστρώματος αναφοράς που υδρολύεται αποδοτικά.

Όταν ένα υπόστρωμα χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη K_m κατά την αλληλεπίδρασή του με ένα ένζυμο τότε στις συγκεντρώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο φωτόμετρο δεν μπορεί να παρατηρηθεί κορεσμός του ενεργού κέντρου. Οι μετρούμενες αρχικές ταχύτητες θα φαίνεται ότι μεταβάλλονται γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος με την K_m να υπολογίζεται εσφαλμένα ως "άπειρη". Στις παραπάνω περιπτώσεις η μόνη σταθερά που μπορεί να μετρηθεί είναι το πηλίκο k_{cat}/K_m εφόσον σύμφωνα με την εξίσωση 10 για $[S] \ll K_m$ θα είναι $v/[E]_0 = (k_{cat}/K_m) \cdot [S]$ και άρα η απόδοση της κατάλυσης σε αυτή την περίπτωση μπορεί να υπολογιστεί από την ευθεία $y=ax$ που χαρακτηρίζει τις αρχικές ταχύτητες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Συνηθίζεται και σε αυτή την περίπτωση οι σταθερές K_m να μετρούνται ως σταθερές αναστολής και από το πηλίκο k_{cat}/K_m να υπολογίζεται η σταθερά κατάλυσης k_{cat} .

Οι CMY-2, CMY-30 και CMY-42 κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα υποστρώματα που υδρολύονται αργά από αυτές εμφανίζουν χαμηλές τιμές K_m και οι σταθερές υδρόλυσης υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη περίπτωση για $[S] \gg K_m$ και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα. Χαμηλές K_m εμφάνιζαν και κάποιες ποικιλίες GES κατά την υδρόλυση ιμιπενέμης. Σε

αυτή την περίπτωση όμως έχει βρεθεί ότι $K_m \gg K_i$ οπότε οι αντίστοιχες σταθερές υπολογίστηκαν με τις συμβατικές μεθόδους.

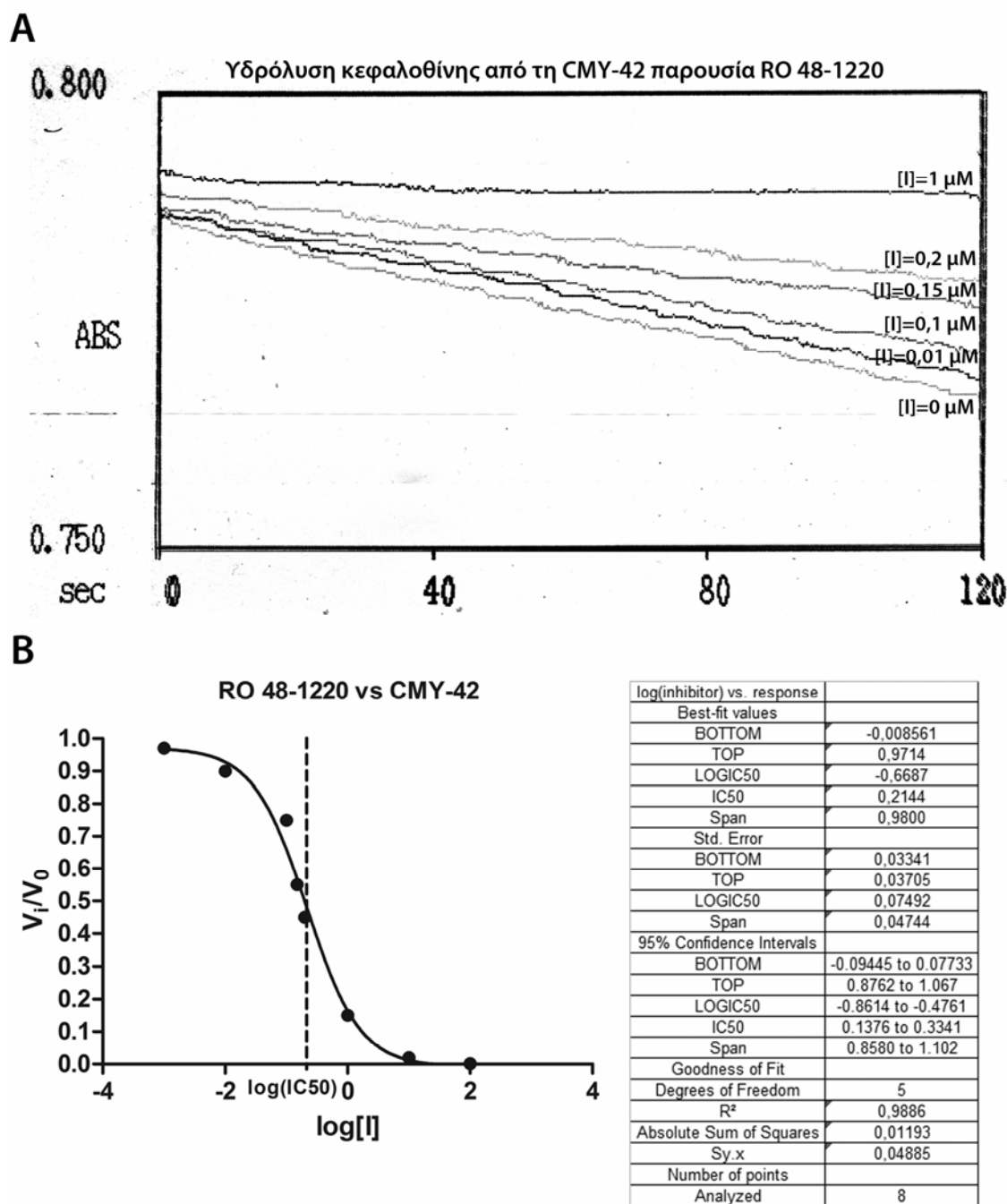
iv. Μέτρηση παραμέτρων αναστολής β-λακταμασών κατά την αλληλεπίδρασή τους με β-λακταμικά αντιβιοτικά (De Meester F. και συν., 1997; Copeland R. A., 2000)

Κάποιες κατηγορίες β-λακταμικών συμπεριφέρονται ως ανταγωνιστικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς συγκεκριμένων ομάδων β-λακταμασών. Πέρα από τους αναστολείς αυτοκτονίας κλαβουλανικό οξύ και σουλφόνες πενικιλίνης, τα οποία ακυλώνοντας την καταλυτική σερίνη μέσω δευτερογενών αντιδράσεων που ακολουθούν προκαλούν μόνιμη απενεργοποίηση του ενζύμου, άλλα μόρια (π.χ. τρίτης γενεάς κεφαλοσπορίνες και αζτρεονάμη για τις βΛτC και κεφαμυκίνες ή καρβαπενέμες για τις βΛτA που δεν τις υδρολύουν) ακυλώνουν γρήγορα και με υψηλή συγγένεια την καταλυτική σερίνη με το ακυλένζυμο που δημιουργείται να υδρολύεται πολύ αργά προκαλώντας ουσιαστικά επίσης μόνιμη απενεργοποίηση του ενζύμου. Η απενεργοποίηση των β-λακταμασών από τις παραπάνω κατηγορίες β-λακταμικών είναι εξαρτώμενη από τον χρόνο με το ποσοστό αναστολής να αυξάνεται με την πάροδο κάποιων κύκλων αντίδρασης εξαιτίας της συσσώρευσης σταθερών ακυλενζύμων.

Μία παράμετρος που υποδεικνύει το πόσο ισχυρή είναι η απενεργοποίηση που προκαλεί ένα β-λακταμικό είναι η συγκέντρωση αυτού όπου παρατηρείται 50 % αναστολή του ενζύμου (IC50). Η IC50 πέρα από την συγγένεια του αναστολέα ως προς το ενεργό κέντρο εξαρτάται και από τις ταχύτητες δημιουργίας των απενεργοποιημένων ενζυμικών ριζών αλλά και από τις ταχύτητες απελευθέρωσης ενεργού ενζύμου ώστε να εισέλθει σε νέο κύκλο αντίδρασης. Ο υπολογισμός των IC50 στην παρούσα μελέτη έγινε με πειράματα ανταγωνισμού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα αναφοράς κάποιο β-λακταμικό που υδρολύονταν αποδοτικά από το υπό εξέταση ένζυμο (κεφαλοθίνη ή νιτροσεφίνη) ως εξής.

1. Επιλέγονταν συγκέντρωση υποστρώματος αναφοράς και ενζύμου όπου η ταχύτητα υδρόλυσης ήταν σταθερή για το χρονικό διάστημα μέτρησης. Η συγκέντρωση υποστρώματος ήταν ίση με την K_m κάθε ενζύμου ή πολλαπλάσια αυτής με τον ίδιο παράγοντα για τις διάφορες ποικιλίες ενζύμων που συγκρίνονταν.

2. Το ένζυμο επωάζονταν με συγκεντρώσεις αναστολέα που στον τελικό όγκο της αντίδρασης θα έδιναν υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις 100 - 0,001 μM (ανάλογα με την ισχύ του αναστολέα το εύρος αυτό τροποποιούνταν ανάλογα), για χρονικό διάστημα τέτοιο ώστε να είχε επιτευχθεί η δημιουργία των απενεργοποιημένων ριζών (συνήθως 10 min). Το ίδιο χρονικό διάστημα επωάζονταν και ποσότητα ενζύμου στο ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς την προσθήκη αναστολέα.
3. Προσθήκη του υποστρώματος και καταγραφή των αρχικών ταχυτήτων υδρόλυσης στο φωτόμετρο (εικόνα 11A).
4. Εκτίμηση του ποσοστού αναστολής από το πηλικό των ταχυτήτων υδρόλυσης του υποστρώματος αναφοράς με αναστολέα (v_i) ως προς την ταχύτητα υδρόλυσης χωρίς αναστολέα (v_0).
5. Επανάληψη με 2-3 συγκεντρώσεις αναστολέα που βρίσκονταν κοντά στη συγκέντρωση όπου είχε παρατηρηθεί αναστολή που προσέγγιζε το 50 %.
6. Μετατροπή των συγκεντρώσεων αναστολέα σε δεκαδικούς λογαρίθμους και συσχέτιση με το ποσοστό αναστολής που παρατηρούνταν σε κάθε συγκέντρωση. Προκύπτει μία συμμετρική σιγμοειδής καμπύλη δέσμευσης (εικόνα 11B) από την οποία υπολογίζονταν το IC50 με την ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης dose(inhibitor)-vs-response του λογισμικού GraphPad Prism σύμφωνα με το μοντέλο $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(X - \text{LogIC50})})$.



Εικόνα 11: Υπόδειγμα μέτρησης IC₅₀. Α) Καμπύλες υδρόλυσης κεφαλοθίνης από τη CMY-42 παρουσία της σουλφονής πενικιλίνης RO 48-1220 0,01-1 μM. Χρησιμοποιήθηκαν και συγκεντρώσεις 100, 10 και 0,001 μM που έδιναν 99 %, 95% και 0,5% αναστολή αντίστοιχα. Β) Συσχέτιση βαθμού αναστολής με τους δεκαδικούς λογάριθμους των συγκεντρώσεων RO 48-1220 που χρησιμοποιήθηκαν και υπολογισμός IC₅₀ με το λογισμικό GraphPad.

Οι CMY-2, CMY-30 και CMY-42 κατά την υδρόλυση των οξυμίμο υποστρωμάτων κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη και αζτρεονάμη αλλά και κατά την απενεργοποίηση της κεφοξιτίνης και της βενζυλπενικιλίνης χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλές K_m οι οποίες εκτιμήθηκαν ως σταθερές αναστολής (K_i). Μετρήθηκαν οι κινητικές και οι θερμοδυναμικές σταθερές αναστολής οι οποίες για τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις συμπίπτουν καθώς η ακυλίωση συμβαίνει πολύ αποδοτικά και η απακυλίωση είναι σχετικά αργή. Οι μετρήσεις έγιναν με πειράματα ανταγωνισμού όπως στην περίπτωση των IC50 χωρίς όμως το στάδιο της επώασης ενώ οι αντιδράσεις ξεκινούσαν με την προσθήκη ενζύμου σε διάλυμα που περιείχε τον αναστολέα και το υπόστρωμα αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα είχαν επιλεγεί έτσι ώστε να δίνουν 20 - 80 % αναστολή. Στις καμπύλες που προέκυπταν παρατηρούνταν ένα αρχικό στάδιο όπου η ταχύτητα υδρόλυσης ήταν σταθερή ενώ με την πάροδο του χρόνου μειώνονταν εξαιτίας της συσσώρευσης σταθερών ριζών ακυλενζύμου. Η διαφορά μεταξύ αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης και τελικής για το διάστημα που είχε επιλεγεί για τη μέτρηση εξαρτώνταν από τον ρυθμό με τον οποίο ο αναστολέας απενεργοποιούσε το ένζυμο. Η διαφορά αυτή είναι έντονη για χαμηλές συγκεντρώσεις αναστολέα και μειώνεται με την αύξηση των συγκεντρώσεων υποδηλώνοντας αύξηση της ταχύτητας απενεργοποίησης. Η ποσοτική εκτίμηση του ρυθμού απενεργοποίησης (k_{obs}) για κάθε συγκεντρωση αναστολέα, ο οποίος αντιστοιχεί σε σταθερά ταχύτητας κινητικής ψευδο-πρώτης τάξης, έγινε από τις καμπύλες μείωσης της απορρόφησης σε σχέση με τον χρόνο με μη-γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιώντας την εξίσωση 12 και το λογισμικό GraphPad.

$$A_t = A_0 - \left[v_f \cdot t + (v_0 - v_f) \cdot \frac{1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)}{k_{obs}} \right] \quad \text{Εξίσωση 12}$$

Όπου v_0 η αρχική ταχύτητα υδρόλυσης σε απόλυτες μονάδες πτώσης της απορρόφησης ($\Delta A/\Delta t$)₀ κατά την έναρξη της αντίδρασης και v_f η τελική ταχύτητα υδρόλυσης επίσης εκφραζόμενη ως ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης στο τέλος του χρονικού διαστήματος που γίνεται η μέτρηση ($\Delta A/\Delta t$)_f. Όταν το υπόστρωμα αναφοράς ήταν η νιτοσεφίνη η αγκύλη της εξίσωσης είχε θετικό πρόσημο (αύξηση απορρόφησης). Οι ρυθμοί απενεργοποίησης που εκτιμήθηκαν με τον παραπάνω τρόπο συνδέονταν με την

συγκέντρωση του αναστολέα σύμφωνα με την εξίσωση 13 (η οποία είναι αντίστοιχη της *Michaelis-Menten*).

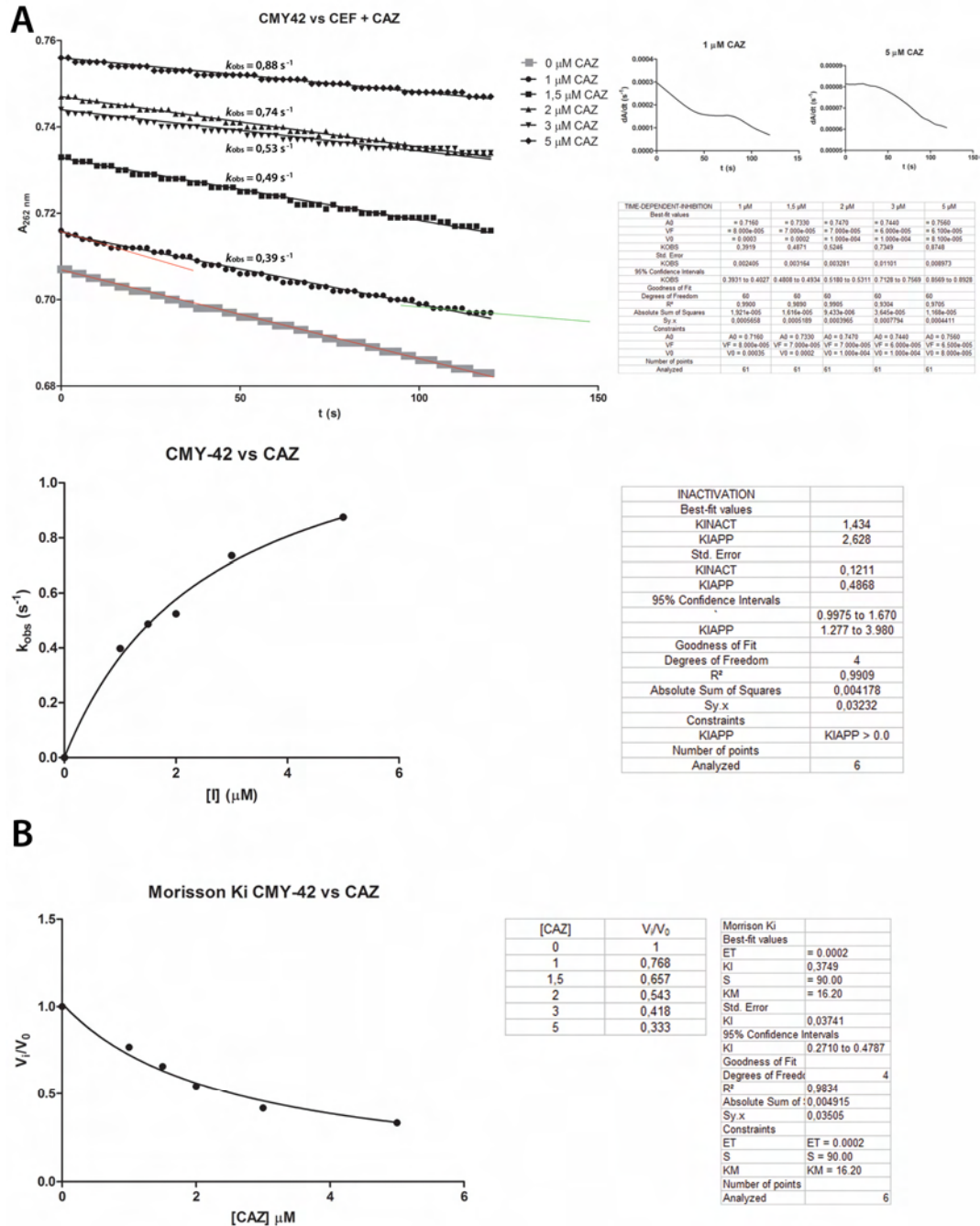
$$k_{obs} = \frac{k_{inact} \cdot [I]}{[I] + K_i^{app}} \quad \text{Εξίσωση 13}$$

Όπου k_{inact} η μέγιστη ταχύτητα αναστολής (στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις συμπίπτει με την σταθερά ταχύτητας ακυλίωσης k_2) και K_i^{app} η φαινόμενη σταθερά αναστολής όπου ο ρυθμός απενεργοποίησης είναι στη μισή τιμή της k_{inact} . Θεωρήθηκε ότι η ταχύτητα απακυλίωσης είναι πολύ χαμηλή για τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις διαφορετικά στην εξίσωση 13 ο δεύτερος όρος είναι αυξημένος κατά τη σταθερά απακυλίωσης k_3 . Η K_i^{app} υπολογίζονταν με μη-γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση 13 και σχετιζονταν με την σταθερά αναστολής K_i σύμφωνα με την εξίσωση 14 που χαρακτηρίζει τους ανταγωνιστικούς αναστολείς και συνδέει τη φαινόμενη σταθερά αναστολής με τη συγκέντρωση του υποστρώματος αναφοράς και τη K_m που εμφανίζει το ένζυμο κατά την υδρόλυσή αυτού.

$$K_i^{app} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \quad \text{Εξίσωση 14}$$

Κατά την αναστολή της CMY-42 από 1 μM κεφταζιδίμης παρατηρήθηκε ένας αρχικός ρυθμός πτώσης της απορρόφησης $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ στα 262 nm κατά την υδρόλυση 90 μM κεφαλοθίνης, η οποία ήταν αντίστοιχη του ρυθμού υδρόλυσης χωρίς αναστολέα. Ο ρυθμός υδρόλυσης με την πάροδο του χρόνου όμως μειωνόταν και στο τέλος του χρονικού διαστήματος μέτρησης ήταν $0,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (εκτιμώμενη από την πρώτη παράγωγο dA/dt που υπολογίστηκε από την καμπύλη μεταβολής της απορρόφησης, εικόνα 12A). Μη γραμμική παλινδρόμηση των δεδομένων της καμπύλης πτώσης της απορρόφησης σε σχέση με τον χρόνο σύμφωνα με την εξίσωση 12 έδωσε έναν ρυθμό απενεργοποίησης $k_{obs} = 0,39 \text{ s}^{-1}$. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αναστολέα χαρακτηρίζονται από περισσότερο ομοιόμορφες καμπύλες και στα 5 μM κεφταζιδίμης το ένζυμο αναστέλλεται πιο γρήγορα με την αρχική ταχύτητα να είναι $0,81 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ και την τελική $0,61 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ δίνοντας έναν ρυθμό απενεργοποίησης $k_{obs} = 0,88 \text{ s}^{-1}$ (εικόνα 12A). Οι τιμές k_{obs} που μετρήθηκαν με αυτόν τον τρόπο για τις διάφορες συγκεντρώσεις κεφταζιδίμης ικανοποιούσαν την εξίσωση 14 για $k_{inact} = 1,4 \text{ s}^{-1}$ και $K_i^{app} = 2,64 \mu\text{M}$ (εικόνα 12A)

οπότε η σταθερά αναστολής σύμφωνα με την εξίσωση 14 για $[S] = 90 \mu\text{M}$ και $K_m = 16,2 \mu\text{M}$ θα είναι $K_i = 0,40 \mu\text{M}$.



Εικόνα 12: Υπόδειγμα μέτρησης σταθερών αναστολής των ενζύμων CMY. Α) Μέτρηση κινητικής σταθεράς αναστολής κατά την αλληλεπίδραση 0,2 nM CMY-42 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις κεφαζιδικμης εκτιμώντας τον ρυθμό απώλειας ενεργότητας ως προς την υδρόλυση 90 μM κεφαλοθίνης. Β) Μέτρηση θερμοδυναμικής σταθεράς αναστολής υπό τις ίδιες συνθήκες μέσω της εξίσωσης Morrison.

Στο παραπάνω παράδειγμα αν οι ταχύτητες υδρόλυσης για κάθε συγκέντρωση κεφταζιδίμης αποδοθούν ως μέσοι όροι για το χρονικό διάστημα μέτρησης και υπολογιστούν τα κλάσματα v_i/v_0 τότε προκύπτει ότι αυτά μεταβάλλονται με την συγκέντρωση της κεφταζιδίμης σύμφωνα με την εξίσωση Morrison (εξίσωση 15) η οποία χαρακτηρίζει μόρια που δεσμεύονται πολύ ισχυρά σε ένζυμα προκαλώντας μη-αντιστρεπτή αναστολή.

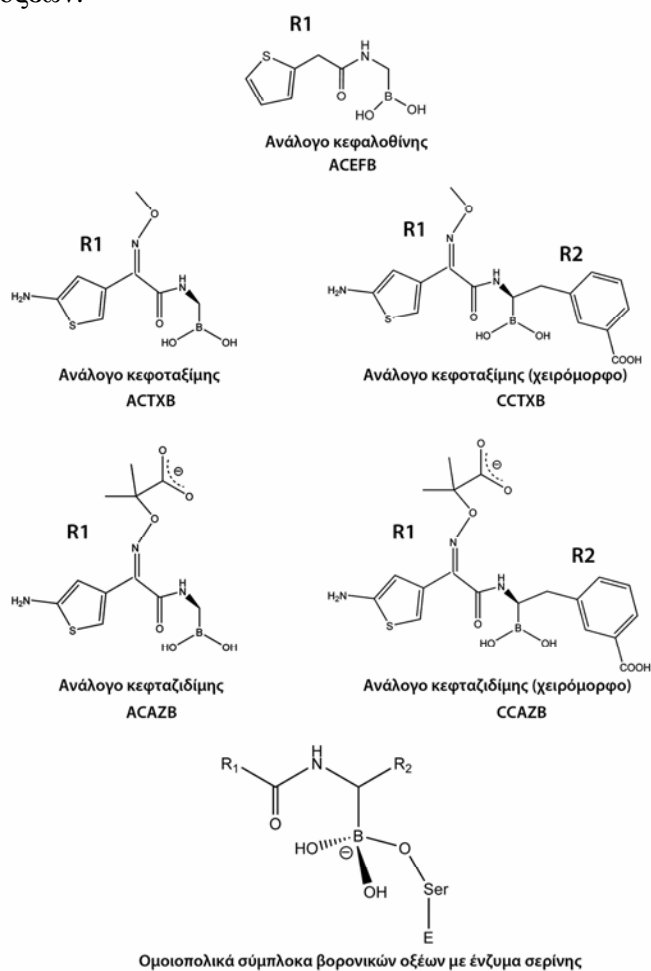
$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad \text{Εξίσωση 15}$$

Όπου K_i^{app} η φαινόμενη σταθερά αναστολής η οποία στην εξίσωση 15 αντικαθίσταται με τον όρο της εξίσωσης 14 που χαρακτηρίζει ανταγωνιστικούς αναστολείς. Μη γραμμική παλινδρόμηση για συγκέντρωση ενζύμου $[E] = 0,2 \text{ nM}$, $[S] = 90 \text{ }\mu\text{M}$ και $K_m = 16,2 \text{ }\mu\text{M}$ δίνει μία σταθερά $K_i = 0,38 \text{ }\mu\text{M}$ που είναι πολύ κοντά στην κινητική K_i (εικόνα 12B). Οι σταθερές αναστολής των β-λακταμικών έναντι των κεφαλοσπορινών που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν σε κάποιες περιπτώσεις και με τους δύο παραπάνω τρόπους ενώ τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν τον προσδιορισμό μέσω της εξίσωσης Morrison. Ο υπολογισμός των σταθερών αναστολής μέσω της εξίσωσης 15 είναι εξίσου ακριβής ειδικά αν η συγκέντρωση του υποστρώματος αναφοράς είναι μικρότερη από την K_m οπότε προκύπτουν πιο ομαλές καμπύλες με σταθερή ταχύτητα υδρόλυσης καθώς ο αναστολέας ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ακυλιώνει γρήγορα το ενεργό κέντρο καθώς τον ανταγωνίζεται μικρότερη ποσότητα υποστρώματος.

v. Μέτρηση παραμέτρων αναστολής β-λακταμασών κατά την αλληλεπίδρασή τους με βορονικά οξέα ανάλογα των κεφαλοσπορινών (Copeland R. A., 2000)

Με σκοπό να εκτιμηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η ισχύς της αλληλεπίδρασης των ενζύμων CMY-2, CMY-30 και CMY-42 με τις πλευρικές αλυσίδες των κεφαλοσπορινών προσδιορίστηκε ο βαθμός αναστολής που υφίστανται από βορονικά οξέα που φέρουν R1 πλευρικές αλυσίδες των παραπάνω αντιβιοτικών. Τα κεφαλοσπορινικά αυτά ανάλογα αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο των β-λακταμασών σερίνης δημιουργώντας παροδικά ομοιοπολικά σύμπλοκα μέσω σύνδεσης με το υδροξύλιο της καταλυτικής

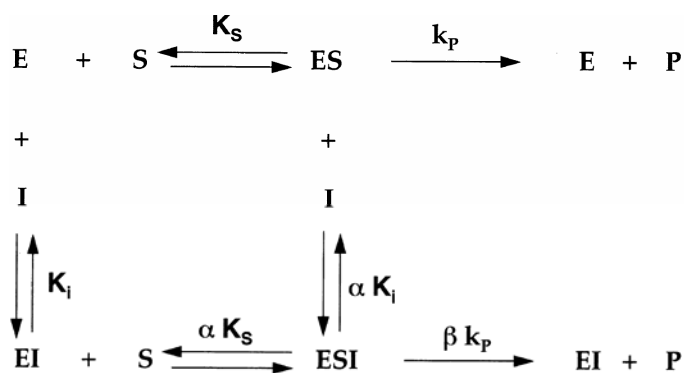
σερίνης τα οποία προσομοιάζουν τις καταστάσεις μετάπτωσης που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των αντίστοιχων υποστρωμάτων. Στην περίπτωση των βΛτC τα σύμπλοκα αυτά είναι αντίστοιχα της ρίζας οξυανιόντος της κατάστασης μετάπτωσης της απακυλίωσης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν βορονικά οξέα που έφεραν τις R1 πλευρικές αλυσίδες της κεφαλοθίνης, της κεφοταξίμης και της κεφταζιδίμης. Εξετάστηκαν και ανάλογα κεφοταξίμης και κεφταζιδίμης τα οποία στον άνθρακα που συνδέονταν το άτομο του βορίου έφεραν πλευρική αλυσίδα m-κάρβοξυ-φαινυλαλανίνης η οποία μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του δακτυλίου διυδροθειαζίνης των κεφαλοσπορινών στο στάδιο του ακυλενζύμου (εικόνα 13). Το παραπάνω άτομο άνθρακα ήταν ασύμμετρο και χρησιμοποιήθηκαν ρακεμικά μίγματα των χειρόμορφων αυτών βορονικών οξέων.



Εικόνα 13: Βορονικά οξέα που έφεραν τις R1 πλευρικές αλυσίδες της κεφαλοθίνης, της κεφοταξίμης και της κεφταζιδίμης και δομή του παροδικού ομοιοπολικού συμπλόκου που δημιουργούν με την καταλυτική σερίνη.

Τα βορονικά οξέα συντέθηκαν από το εργαστήριο οργανικής χημείας του πανεπιστημίου της Modena στην Ιταλία (Kotsakis S. D. και συν., 2013). Τα μόρια αυτά στα πρότυπα πυκνά παρασκευάσματα (καθαρότητας >90%) ήταν διαλυμένα σε DMSO.

Κατά την αλληλεπίδρασή τους με τις β-λακταμάσες τα βορονικά οξέα μπορεί να θεωρηθεί ότι συμπεριφέρονται ως αντιστρεπτοί αναστολείς, και εξαιτίας του μηχανισμού δράσης τους ανταγωνίζονται το υπόστρωμα ως προς την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο. Ο γενικός μηχανισμός που περιγράφει την αντιστρεπτή αναστολή που προκαλείται από έναν αναστολέα I κατά την υδρόλυση ενός υποστρώματος S από ένα ένζυμο E στην κατάσταση ισορροπίας περιγράφεται στο σχήμα 2.



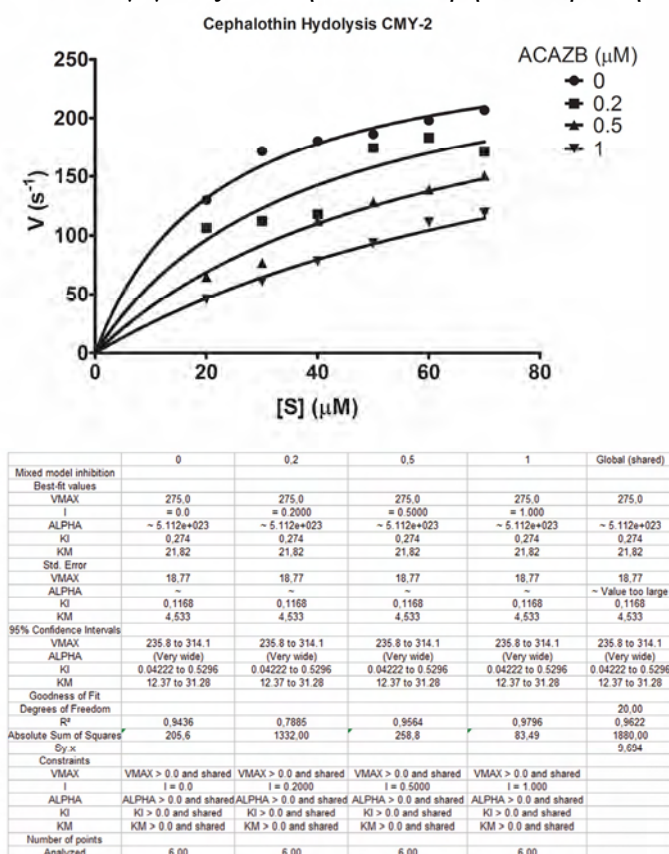
Σχήμα 2

Η ανασταλτική δράση του μορίου ενδέχεται να οφείλεται είτε στον ανταγωνισμό που παρουσιάζει έναντι του υποστρώματος ως προς τη δέσμευση στο ενεργό κέντρο (ανταγωνιστική αναστολή) είτε από τη δέσμευση σε άλλη κοιλότητα του μορίου επιτρέποντας στο υπόστρωμα να δεσμευθεί στο ενεργό κέντρο χωρίς όμως να δίνεται η δυνατότητα κατάλυσης (μη-ανταγωνιστική αναστολή, διακρίνονται δύο τύποι, κατά τον ένα ο αναστολέας δεσμεύεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος και στον άλλο η δέσμευσή του στο ένζυμο δεν εξαρτάται από την παρουσία υποστρώματος). Ο παραπάνω μηχανισμός περιγράφει και του δύο τρόπους αναστολής (μεικτή αναστολή). Η αρχική ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος στην κατάσταση ισορροπίας συνδέεται με τις συγκεντρώσεις υποστρώματος, αναστολέα και σταθερών K_m και K_i σύμφωνα με την εξίσωση 16.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Εξίσωση 16

Δηλαδή κατά την αντιστρεπτή αναστολή το υπόστρωμα αναφοράς εμφανίζεται να υδρολύεται με μεταβαλλόμενη μέγιστη ταχύτητα και σταθερά *Michaelis* οι οποίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωση αναστολέα και την σταθερά αναστολής. Το ποιος σταθερές θα μεταβληθούν και κατά ποιο τρόπο εξαρτάται από τον τύπο της αναστολής. Στην περίπτωση καθαρής ανταγωνιστικής αναστολής η παράμετρος α είναι άπειρη και η φαινόμενη σταθερά *Michaelis* αντιστοιχεί στο γινόμενο της πραγματικής K_m με τον παράγοντα $1+[I]/K_i$ ενώ η V_{max} παραμένει σταθερή. Οι σταθερές αναστολής που χαρακτηρίζαν την αλληλεπίδραση των κεφαλοσπορινασών με τα μη-χειρόμορφα βορονικά οξέα μετρήθηκαν μέσω εκτίμησης των σταθερών V_{max} και K_m με προσδιορισμό των αρχικών ταχυτήτων υδρόλυσης κεφαλοθίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος (20 - 90 μM) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αναστολέα με μη γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση 16 (Εικόνα 14). Σε όλες τις περιπτώσεις η παράμετρος α ήταν $> 10^{13}$ γεγονός που δήλωνε καθαρή αντιστρεπτή αναστολή.



Εικόνα 14: Υπόδειγμα μετρήσης σταθερών αναστολής των μη-χειρόμορφων βορονικών οξέων έναντι των κεφαλοσπορινασών. Η αλληλεπίδραση του μη χειρόμορφου αναλόγου της κεφατζιδίμης με τη CMY-2 χαρακτηρίζονταν από $K_i = 0,274 \mu\text{M}$.

Τα χειρόμορφα βορονικά οξέα εμφάνιζαν υψηλή συγγένεια με τα προς εξέταση ένζυμα ($K_i < 1000 \cdot [E]$) ενώ η αναστολή που προκαλούσαν ήταν εξαρτώμενη από τον χρόνο, δηλαδή είχαν τα χαρακτηριστικά μη-αντιστρεπτού αναστολέα. Στις περιπτώσεις αυτές οι σταθερές αναστολής εκτιμήθηκαν από την εξίσωση Morrison όπως περιγράφεται στην ενότητα *in epwázοντας* το ένζυμο με τον αναστολέα για 15 min και χρησιμοποιώντας συγκέντρωση κεφαλοθίνης $< K_m$.

ΚΑ. Εκτίμηση θερμικής σταθερότητας β-λακταμασών CMY-2 τύπου

Η εκτίμηση της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων CMY-2, CMY-30 και CMY-42 έλαβε χώρα με προσδιορισμό των σχετικών θερμοκρασιών τήξης (T_m) χρησιμοποιώντας την τεχνική DSF (Differential Scanning Fluorometry) (Wan K. F. και συν., 2009; Gatti-Lafranconi P. και συν., 2010). Η τεχνική βασίζεται στην δυνατότητα της χρωστικής SYPRO Orange να δεσμεύεται μη ειδικά στις υδρόφοβες επικράτειες των πρωτεϊνών όπου εκπέμπει φθορισμό. Η χρωστική εμφανίζει μέγιστη διέγερση στα 488 nm και μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 580 nm με τον φθορισμό της να εξασθενεί σε υδατικό διάλυμα. Κατά την διάρκεια θερμικής αποδιάταξης των πρωτεϊνών σε υδατικό διάλυμα οι υδρόφοβες επικράτειες τους αποκαλύπτονται με αποτέλεσμα παρουσία της SYPRO Orange ο φθορισμός στα 580 nm στις παραπάνω συνθήκες διέγερσης να αυξάνεται και να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλο όργανο το οποίο συνήθως είναι θερμικός κυκλοποιητής Real-Time PCR. Η αύξηση του φθορισμού ακολουθεί την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρις ότου να αποδιαταχθεί το σύνολο των πρωτεϊνικών μορίων ενώ παρουσιάζει την τυπική σιγμοειδή καμπύλη αποδιάταξης. Το σημείο καμψής της καμπύλης αυτής (όπου η πρώτη παράγωγος της μεταβολής του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία θα είναι μέγιστη) χαρακτηρίζεται από την θερμοκρασία στην οποία τα μισά πρωτεϊνικά μόρια θα είναι αποδιαταγμένα δηλαδή στην T_m . Έπειτα από την ολική αποδιάταξη των πρωτεϊνών παρατηρείται μία πτώση στον φθορισμό η οποία οφείλεται είτε στην αποδέσμευση μορίων χρωστικής λόγω της υψηλής θερμοκρασίας είτε στη συσσωμάτωση των αποδιαταγμένων μορίων. Οι θερμοκρασίες τήξης που προσδιορίζονται με αυτό τον τρόπο δεν αποτελούν απόλυτες τιμές αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σχετικές συγκρίσεις πολύ συγγενικών πρωτεϊνών, όπως τα τρία

παραπάνω ένζυμα, όταν οι μετρήσεις γίνονται στις ίδιες συνθήκες. Οι συνθήκες του προσδιορισμού ετερόλογων πρωτεϊνών ενδέχεται να διαφέρουν ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών και την περιεκτικότητα της αντίδρασης σε SYPRO.

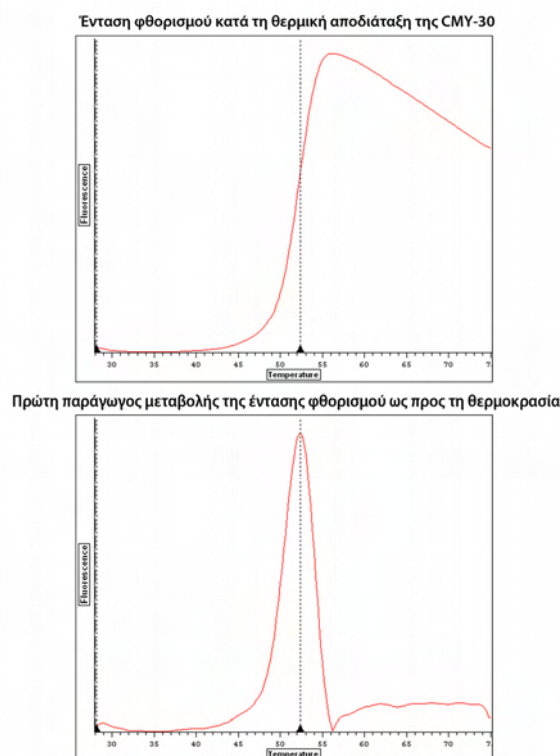
Τα ένζυμα CMY που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι εμφανίζουν τη βέλτιστη συμπεριφορά σε συγκέντρωση 3 μM (~116 $\mu\text{g/ml}$) παρουσία 5X SYPRO Orange. Κάθε αντίδραση ($V = 20 \mu\text{l}$) περιείχε:

25 mM Na^+P_i pH 7, 150 mM NaCl (προσθήκη διαλύματος 4X)

3 μM ενζύμου

5X SYPRO (προσθήκη υδατικού διαλύματος 50X το οποίο παρασκευάζονταν από διάλυμα χρωστικής 500X σε DMSO).

Η θερμική αποδιάταξη και η ανίχνευση του φθορισμού γίνονταν στη συσκευή MiniOpticon της BioRad στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής της χρωστικής HEX. Η θερμοκρασία αυξάνονταν από τους 28 °C στους 75 °C με βήματα των 0,2 °C ενώ σε κάθε θερμοκρασία τα δείγματα επωάζονταν για 2 s. Οι καμπύλες αποδιάταξης είχαν τη μορφή που δίνεται στην εικόνα 15.



Εικόνα 15: Υπόδειγμα μέτρησης θερμοκρασιών τήξης των ενζύμων CMY. Δίνεται η καμπύλη αποδιάταξης της CMY-30. Η πρώτη παράγωγος μεταβολής της έντασης φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία εμφάνιζε μέγιστο στους 52,4 °C και αυτή ήταν η T_m του ενζύμου.

Μετρήθηκε επίσης η επίδραση μορίων με οξυμίμο πλευρικές αλυσίδες (αζτρεονάμη, κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη και βορονικά οξέα που φέρουν τις R1 πλευρικές αλυσίδες αυτών) στις θερμοκρασίες αποδιάταξης των τριών ενζύμων. Για κάθε μόριο εκτιμήθηκε η επίδραση συγκεντρώσεων 10, 50 και 100 μM . Η μέτρηση γινόταν όπως και παραπάνω με τη διαφορά ότι στην αντίδραση προστίθονταν όγκος διαλύματος των παραπάνω μορίων που είχε δεκαπλάσια συγκέντρωση από την τελική. Στην κάθε μέτρηση συμπεριλαμβάνονταν και ελεύθερα ένζυμα ενώ η επίδραση του κάθε προσδέτη εκτιμήθηκε ως η διαφορά μεταξύ των T_m ελεύθερων και συμπλοκοποιημένων ενζύμων. Ο προσδιορισμός της επίδρασης των βορονικών οξέων γίνονταν έπειτα από επώαση 15 min σε θερμοκρασία δωματίου με την ποσότητα ενζύμου που χρησιμοποιούνταν στο πείραμα.

KB. Υπολογιστική δομική ανάλυση β-λακταμασών

Στην παρούσα μελέτη οι δομικές ιδιότητες των υπό εξέταση ενζύμων αναλύθηκαν με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics, MD). Προσομοιώθηκαν ελεύθερα ένζυμα και ομοιοπολικά σύμπλοκα αυτών με την κεφταζιδίμη (ποικιλίες CMY), το μη-χειρόμορφο βορονικό ανάλογο αυτής (ποικιλίες CMY και GES) και με την κεφοξιτίνη (ποικιλίες GES). Χρησιμοποιήθηκαν οι υπολογιστικές τεχνικές και τα λογισμικά προγράμματα που αναφέρονται παρακάτω.

i. Γενικές θεωρήσεις επί των προσομοιώσεων βιολογικών μακρομορίων

(Field M. J., 1999; Becker O. M. και συν., 2001)

Η διάταξη των ατόμων ενός μορίου στον χώρο είναι αυτή που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία του. Η πιο πιθανή δομή ενός μορίου ή συστήματος μορίων είναι αυτή στην οποία η ενέργεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων που το απαρτίζουν είναι ελάχιστη στις δεδομένες συνθήκες. Έτσι λοιπόν για να προβλεφθεί η περισσότερο πιθανή δομή ενός συστήματος είναι αναγκαίος ο ακριβής υπολογισμός της παραπάνω ενέργειας για συγκεκριμένες διαμορφώσεις.

Ο πιο ακριβής υπολογισμός της ενέργειας ενός συστήματος σωματιδίων είναι μέσω της εξαρτώμενης από το χρόνο εξίσωσης *Schrödinger* όπως διατυπώθηκε από τον Dirac. Για συστήματα ατόμων και μορίων η εξίσωση αυτή θα πρέπει να λυθεί για το σύνολο των σωματιδίων, ηλεκτρονίων και πυρήνων, που τα απαρτίζουν. Εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς μάζας μεταξύ ηλεκτρονίων και πυρήνων (ο πιο απλός πυρήνας του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο έχει 1836 φορές μεγαλύτερη μάζα από ένα ηλεκτρόνιο) οι δύο τύποι σωματιδίων θα έχουν πολύ διαφορετική κινητική συμπεριφορά. Έτσι λύνοντας την εξίσωση *Schrödinger* μόνο για τα ηλεκτρόνια θεωρώντας τους πυρήνες ακίνητους προκύπτει μια καλή προσέγγιση της ενέργειας του συστήματος (προσέγγιση *Born-Oppenheimer*). Ακόμα και με αυτήν την απλοποίηση όμως ο υπολογισμός της ηλεκτρονικής ενέργειας ενός μορίου μερικών δεκάδων ατόμων με συγκεκριμένη διαμόρφωση πυρήνων είναι πολύπλοκος και χρονοβόρος. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες υπολογιστικές τεχνικές που επιτυγχάνουν *ab initio* υπολογισμό της ενέργειας λύνοντας την ηλεκτρονική εξίσωση *Schrödinger* οι οποίες μέσω απλοποιήσεων διαφόρων σταδίων της λύσης της αυξάνουν την ταχύτητα προσδιορισμού. Τρεις κατηγορίες μεθοδολογιών προσομοιώσεων κβαντικής μηχανικής (QM) έχουν αναπτυχθεί (*density functional theory, molecular orbital theory* και *valence bond theory*) με αυτές της μοριακής θεωρίας των τροχιακών να είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες (π.χ. Hartee-Fock, HF) και της θεωρίας παραγοντικής πυκνότητας οι πιο ακριβείς (B3LYP). Πέρα από τις παραπάνω λεπτομερείς *ab initio* τεχνικές χρησιμοποιούνται και ήμι-εμπειρικές μέθοδοι λύσης της ηλεκτρονικής εξίσωσης *Schrödinger* που χρησιμοποιούν περισσότερες απλοποιήσεις (π.χ. AM1).

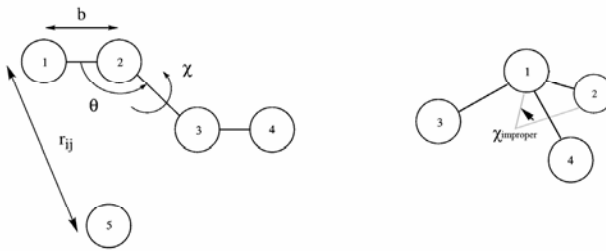
Οι προσομοιώσεις κβαντικής μηχανικής ακόμα και στην ημι-εμπειρική μορφή τους είναι πρακτικά αδύνατο να περιγράψουν συστήματα ατόμων μεγάλου μεγέθους, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Η χρήση εξ'ολοκλήρου εμπειρικών ενεργειακών εξισώσεων επιτρέπει μία καλή προσέγγιση της στάθμης ενέργειας στην οποία βρίσκεται ένα δεδομένο μακρομοριακό σύστημα. Στις προσομοιώσεις αυτές τα άτομα που απαρτίζουν το σύστημα θεωρείται ότι δεν έχουν εσωτερική δομή και είναι απλώς φορτισμένα σωματίδια τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα άτομα θεωρούνται ότι κινούνται εντός ενός πεδίου δυνάμεων σύμφωνα με τον θεμελιώδη νόμο της μηχανικής ($F=m \cdot a$) με τη δύναμη που τους ασκείται να σχετίζεται με το εμπειρικό

δυναμικό του πεδίου το οποίο εξαρτάται από τις ομοιοπολικές και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στις οποίες αυτά συμμετέχουν. Η ενέργεια του συστήματος θα συνίσταται από το σύνολο των δυναμικών αυτών.

Το δυναμικό ενός εμπειρικού πεδίου δυνάμεων συνήθως απαρτίζεται από έξι επιμέρους δυναμικά. Τα τέσσερα αφορούν τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις ομάδων ατόμων που συνδέονται μεταξύ τους και τα δύο μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που χαρακτηρίζουν ζεύγη ατόμων. Έτσι λοιπόν θα είναι:

$$V_{\text{pot}} = V_{\text{bonds}} + V_{\text{angles}} + V_{\text{dih.,propers}} + V_{\text{dih.,impropers}} + V_{\text{coulomb}} + V_{\text{LJ}}$$

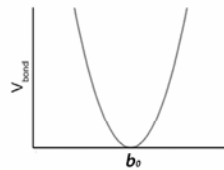
Όπου V_{bonds} το δυναμικό που χαρακτηρίζει τον δεσμό μεταξύ δύο ατόμων και έχει συνήθως τη μορφή αρμονικού ταλαντωτή. Το δυναμικό αυτό ελαχιστοποιείται σε μήκος δεσμού b_0 που αντιστοιχεί στην κατάσταση ισορροπίας και είναι χαρακτηριστικό για κάθε ζεύγος συνδεδεμένων ατόμων. Απόκλιση από το μήκος ισορροπίας "τιμωρείται" βάσει της σταθεράς αρμονικού ταλαντωτή k_b που χαρακτηρίζει επίσης συγκεκριμένα ζεύγη ατόμων (εικόνα 16). Οι αλληλεπιδράσεις συστήματος τριών ατόμων που συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς περιγράφεται από το δυναμικό της γωνίας (V_{angles}) που σχηματίζουν το οποίο επίσης είναι αρμονική συνάρτηση με θ_0 τη γωνία ισορροπίας και k_θ τη σταθερά ελατηρίου για δεδομένες τριάδες ατόμων (εικόνα 16). Οι αλληλεπιδράσεις τεσσάρων ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων περιγράφονται από το δυναμικό της γωνίας που σχηματίζουν τα δύο επίπεδα των δεσμών μεταξύ πρώτου και δεύτερου ατόμου και μεταξύ τρίτου και τέταρτου η οποία αντιστοιχεί στην γωνία περιστροφής του δεσμού μεταξύ δεύτερου και τρίτου ατόμου (εικόνα 16). Το δυναμικό αυτό μεταβάλλεται περιοδικά και όχι αρμονικά με τη γωνία περιστροφής του παραπάνω δεσμού καθώς όλες οι δυνατές γωνίες περιστροφής από 0° ως 360° είναι εφικτές χωρίς μεγάλες αλλαγές στην ενέργεια. Το δυναμικό γωνίας διέδρου συνήθως περιγράφεται από την περιοδική εξίσωση που δίνεται στην εικόνα 16. Όπου n η περιοδικότητα που εμφανίζει η μεταβολή της ενέργειας σε συνάρτηση με τη γωνία διέδρου (δηλαδή πόσες κορυφές ή κοιλάδες υπάρχουν σε μια πλήρη περιστροφή, συνήθως 1 ως 6), δ η φάση της γωνίας περιστροφής (0° ή 180°) και V_n το ενεργειακό φράγμα που εμφανίζεται κατά την περιστροφή.



A. Δεσμικά δυναμικά

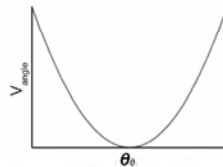
1. Αρμονικό δυναμικό ομοιοπολικού δεσμού

$$V_{bonds} = \sum_{bonds} \frac{1}{2} \cdot k_b \cdot (b - b_0)^2$$



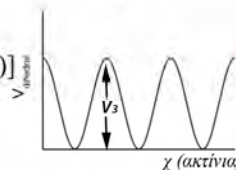
2. Αρμονικό δυναμικό γωνίας 3 ατόμων

$$V_{angles} = \sum_{angles} \frac{1}{2} \cdot k_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2$$



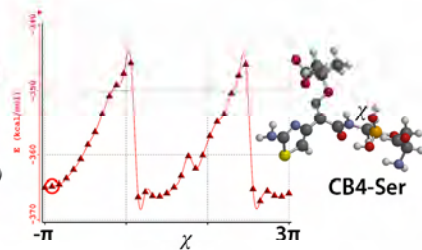
3. Δυναμικό γωνίας διέδρου

$$V_{dihedrals} = \sum_{dihedrals} \frac{1}{2} \cdot V_n \cdot [1 + \cos(n \cdot \chi - \delta)]$$



4. Δυναμικό γωνίας διέδρου εκτός επιπέδου (1-4, impropers)

$$V_{improper} = \sum_{impropers} \frac{1}{2} \cdot V_n \cdot [1 + \cos(n \cdot \chi_{impropers} - \delta)]$$



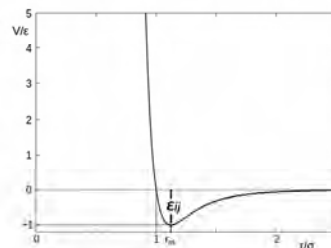
B. Μη δεσμικά δυναμικά

1. Δυναμικό Lennard-Jones (Δυνάμεις διάχυσης London)

$$V_{LJ} = \sum_{ijpairs} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (2 \cdot r^{vdW}_{ij})^6 = 2 \cdot \sigma_{ij}^6$$

$$V_{LJ}^v = 4 \cdot \epsilon_{ij} \cdot \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \cdot \epsilon_j}$$

$$r^{vdW}_{ij} = \frac{r^{vdW}_{ii} + r^{vdW}_{jj}}{2}$$



2. Δυναμικό ηλεκτροστατικών αλ/σεών (Δυνάμεις Coulomb)

$$V_{elect} = \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon} \sum_{ijpairs} \frac{q_i \cdot q_j}{r_{ij}}$$

Εικόνα 16: Δεσμικές και μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις και δυναμικά ενός χημικού πεδίου δυνάμεων. Το πρώτο γράφημα που δίνεται στην περίπτωση της γωνίας διέδρου αντιστοιχεί στο δυναμικό περιστροφής των μεθυλομάδων του αιθανίου (ισοδύναμες) ενώ το δεύτερο στην περιστροφή του δεσμού μεταξύ του άνθρακα που δεσμεύεται το άτομο βορίου στο βορονικό ανάλογο της κεφαζιδίμης (CB4) και του αζώτου της αμινο-άκυλο πλευρικής αλυσίδας αυτού στο υβριδικό μόριο CB4-σερίνη. Παρατηρούμε ότι εμφανίζονται τουλάχιστον 3 ενεργειακά φράγματα με διαφορετική περιοδικότητα.

Όταν οι ομάδες που συνδέονται στα άτομα του δεσμού που περιστρέφεται δεν είναι "ισοδύναμες" τότε ενδέχεται να παρατηρηθούν πολλαπλά ενεργειακά φράγματα κατά τη διάρκεια μίας πλήρους περιστροφής με διαφορετική περιοδικότητα (εικόνα 16). Με σκοπό να περιγραφούν καλύτερα αυτές οι τετράδες ατόμων ο όρος του δυναμικού διέδρου ενδέχεται να είναι τροποποιημένος στα διάφορα πεδία δυνάμεων που είναι διαθέσιμα. Ένας επιπλέον όρος δεσμικού δυναμικού που πρέπει να συμπεριληφθεί στην ενεργειακή εξίσωση είναι αυτό που χαρακτηρίζει την κίνηση τριών ατόμων, που συνδέονται σε ένα τέταρτο, εκτός του επιπέδου που σχηματίζουν τα 4 άτομα μεταξύ τους (εικόνα 16, πάνω δεξιά). Ο όρος αυτός εξασφαλίζει ότι οι ομάδες sp^2 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα (καρβονυλομάδες, αρωματικοί δακτύλιοι κλπ) θα διατηρούνται επίπεδες. Το δυναμικό αυτό χαρακτηρίζεται ως δυναμικό μη επιτρεπτών διαμορφώσεων και περιγράφεται είτε από μία περιοδική συνάρτηση της γωνίας διέδρου που δίνεται στην εικόνα 16 είτε από μία αρμονική της απόστασης μεταξύ του κοινού ατόμου και του επιπέδου που δημιουργούν τα συνδεδεμένα με αυτό άτομα. Όλα τα παραπάνω δυναμικά ουσιαστικά προσεγγίζουν τις αλληλεπιδράσεις των ηλεκτρονικών νεφών μεταξύ ομοιοπολικά δεσμευμένων ατόμων.

Οποιοδήποτε άτομο στο σύστημα αλληλεπιδρά με τα άλλα άτομα του συστήματος μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με την ισχύ της αλληλεπίδρασης αυτής να είναι συνάρτηση της απόστασης (εξασθενεί με την αύξηση της μεταξύ τους απόστασης). Οι δυνάμεις αυτές όπως και οι δεσμικές εξαρτώνται από τη σωματιδιακή σύσταση των ατόμων. Δύο τύποι δυναμικών είναι αρκετοί ώστε να περιγράψουν το σύνολο των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε ένα μακρομοριακό σύστημα. Ο πρώτος είναι το δυναμικό Lennard-Jones το οποίο περιγράφει τις δυνάμεις διάχυσης London (υποπερίπτωση των δυνάμεων Van der Waals). Όταν τα αλληλεπιδρώντα άτομα βρίσκονται σε μεγάλη μεταξύ τους απόσταση (r_{ij}) το δυναμικό μηδενίζεται ενώ όσο αυτά πλησιάζουν έλκονται λόγω αλληλεπιδράσεων των σωματιδίων που τα απαρτίζουν με το δυναμικό να ελαχιστοποιείται μέχρις μίας συγκεκριμένης απόστασης όποτε αρχίζουν να απωθούνται (ακτίνα Van der Waals) και το δυναμικό απειρίζεται. Η σχέση που συνδέει το δυναμικό Lennard-Jones με την ελάχιστη ενέργεια (ενεργειακό πηγάδι, ϵ_{ij}) και την απόσταση όπου η ενέργεια αλληλεπίδρασης είναι 0 (σ_{ij}) για κάθε ζεύγος ατόμων δίνεται στην εικόνα 16. Ο παράγοντας σ_{ij} σχετίζεται με την ακτίνα Van der Waals σύμφωνα με

τη σχέση που δίνεται στην εικόνα 16. Τα ενεργειακά πηγάδια και οι ακτίνες VdW για δύο αλληλεπιδρώντα άτομα του συστήματος υπολογίζονται ως γεωμετρικοί και αριθμητικοί μέσοι αντίστοιχα των σταθερών του κάθε ατόμου όταν αλληλεπιδρά με άτομο του ίδιου είδους (εικόνα 16). Τέλος τα άτομα ως φορτισμένα σωματίδια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που μπορούν να περιγραφούν από το νόμο Coulomb και κάθε ζεύγος ατόμων $i j$ στο σύστημα με μερικό φορτίο q_i και q_j αντίστοιχα θα χαρακτηρίζεται από το δυναμικό της εικόνας 16 όπου ϵ η διηλεκτρική σταθερά του κενού (συνήθως 1). Τα μερικά ατομικά φορτία που χρησιμοποιούνται στα πεδία δυνάμεων θεωρούνται σταθερά. Έχουν αναπτυχθεί όμως νέα πεδία δυνάμεων όπου έχει εισαχθεί και όρος που περιγράφει την πόλωση που υφίστανται τα άτομα κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων. Τα μερικά φορτία των ατόμων στα πεδία αυτά θα πρέπει να έχουν υπολογιστεί σε πολύ ακριβείς *ab initio* προσομοιώσεις (B3LYP) ενώ στην περίπτωση που δεν υπάρχει δυναμικό πόλωσης υπολογισμός τους με προσομοιώσεις HF είναι αποδεκτός.

Έτσι λοιπόν για ένα σύστημα ατόμων των οποίων η θέση καθορίζεται από τρισδιάστατο σύστημα καρτεσιανών συντεταγμένων είναι δυνατός ο υπολογισμός της ενέργειάς του γνωρίζοντας τις παραμέτρους των ατόμων και των δεσμών στα οποία αυτά συμμετέχουν οι οποίες ικανοποιούν τα δυναμικά της ενεργειακής εξίσωσης του πεδίου δυνάμεων. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων αυτών περιλαμβάνει προσομοιώσεις κβαντικής μηχανικής και πειραματικές μετρήσεις σε μία κυκλική διαδικασία δοκιμής-λάθους μέχρις ότου βρεθούν οι παράμετροι που θα αναπαράγουν όσο το δυνατόν ακριβέστερα τις πειραματικές παρατηρήσεις. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί πεδία δυνάμεων που επιτυγχάνουν πολύ μεγάλη ακρίβεια κατά τον υπολογισμό της ενέργειας πρωτεϊνικών μορίων τα οποία αφορούν τις διάφορες εκδόσεις Amber και CHARMM. Πέρα από τις πρωτεΐνες τα πεδία δυνάμεων αυτά έχουν παραμετροποιηθεί και για νουκλεϊκά οξέα και πολυσακχαρίτες, ενώ περιλαμβάνουν σταθερές για μεγάλο αριθμό μικρών οργανικών μορίων.

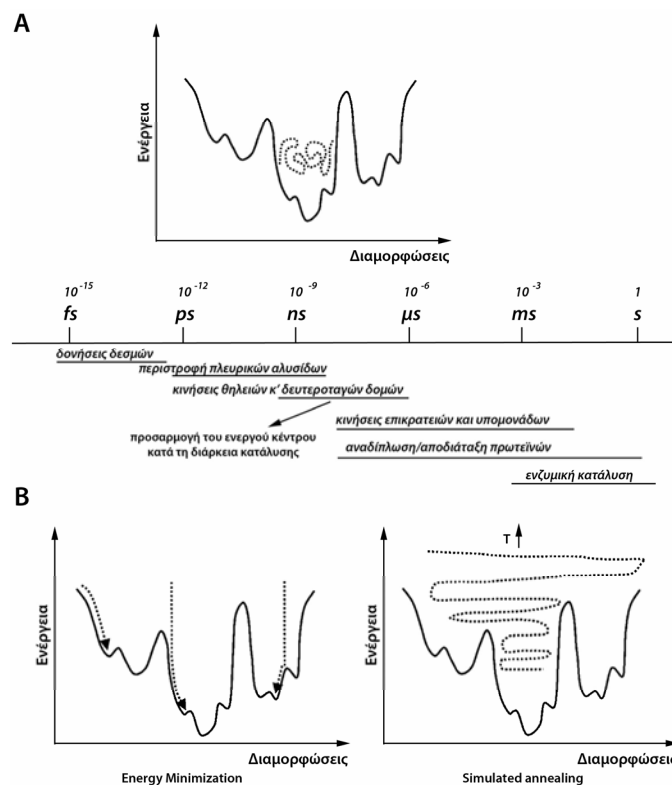
Γνώση της δομής με την ελάχιστη ενέργεια δεν είναι αρκετή για να αποδοθεί λειτουργία σε ένα μόριο. Σε ένα ενεργειακό τοπίο που χαρακτηρίζει τις δυνατές διαμορφώσεις ενός συστήματος ατόμων μπορούν να παρατηρηθούν πολλαπλά ελάχιστα τα οποία βρίσκονται σε ισοδύναμες ενεργειακές στάθμες. Ένα ευέλικτο μόριο όπως αυτό

των πρωτεϊνών σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες του απολύτου 0 έχει τη δυνατότητα να αλλάζει τη διαμόρφωσή του λόγω της κίνησης Brown των ατόμων του και να μεταπηδά σε διάφορες ενεργειακές στάθμες που εντοπίζονται στο ενεργειακό φρεάτιο που παρατηρείται το συνολικό ελάχιστο (εικόνα 17A). Η δυναμική συμπεριφορά των ευέλικτων μακρομορίων είναι συνήθως αυτή που σχετίζεται με τη λειτουργία τους και το καλύτερο παράδειγμα είναι αυτό των πρωτεϊνών *prions*. Τα πρωτεϊνικά μόρια έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν τη διαμόρφωσή τους εκτελώντας κινήσεις σε διάφορες χρονικές κλίμακες (εικόνα 17A) που περιλαμβάνουν τις δονήσεις δεσμών και τη περιστροφή πλευρικών αλυσίδων (fs-ps), συλλογικές κινήσεις μεσαίας κλίμακας των θηλειών τους και περισσότερο σταθερών δευτεροταγών δομών (ns) και μεγάλης κλίμακας συλλογικές κινήσεις επικρατειών και υπομονάδων (μs-ms). Οι κινήσεις αυτές σχετίζονται με σημαντικές λειτουργίες του μορίου όπως είναι η δέσμευση υποστρώματος κατά τη διάρκεια μίας ενζυμικής κατάλυσης, η αλλοστερική ρύθμιση, η αναδίπλωση κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης κλπ.

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής δίνουν τη δυνατότητα να αναπαραχθούν αυτές οι κινήσεις με σχετική ακρίβεια και να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά τους. Σε αυτές ένα σύστημα ατόμων αφήνεται να κινηθεί σε ένα πεδίο δυνάμεων σύμφωνα με τους κλασσικούς νόμους της Νευτώνιας μηχανικής για χρονικό διάστημα τέτοιο ώστε να συμπίπτει με τις παραπάνω χρονικές κλίμακες των κινήσεων που εκτελούν τα μακρομόρια και των οποίων τα χαρακτηριστικά πρόκειται να μελετηθούν. Οι αρχικές συντεταγμένες του συστήματος συνήθως προέρχονται από κρυσταλλογραφικές δομές ή από μοντέλα που έχουν προκύψει με τεχνικές μοριακής προτυποποίησης (*molecular modeling*).

Το σύστημα πριν την έναρξη της προσομοίωσης *παραγωγής* πρέπει να βρίσκεται σε ολικό ελάχιστο (*global minimum*). Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την εύρεση της διαμόρφωσης ολικού ενεργειακού ελαχίστου για ένα σύστημα ατόμων. Οι πρώτες αφορούν την ελαχιστοποίηση της ενέργειας τροποποιώντας ελαφρά τη θέση των ατόμων με συγκεκριμένους αλγορίθμους οι οποίοι προσομοιώνουν την πτώση μίας σταγόνας σε μία κεκλιμένη επιφάνεια με κάθε βήμα να μειώνει τη δυναμική της ενέργεια (εικόνα 17B). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται είτε θέτοντας προκαθορισμένο αριθμό βημάτων είτε μέχρις ότου η μεταβολή της ενέργειας που παρατηρείται σε κάθε βήμα να

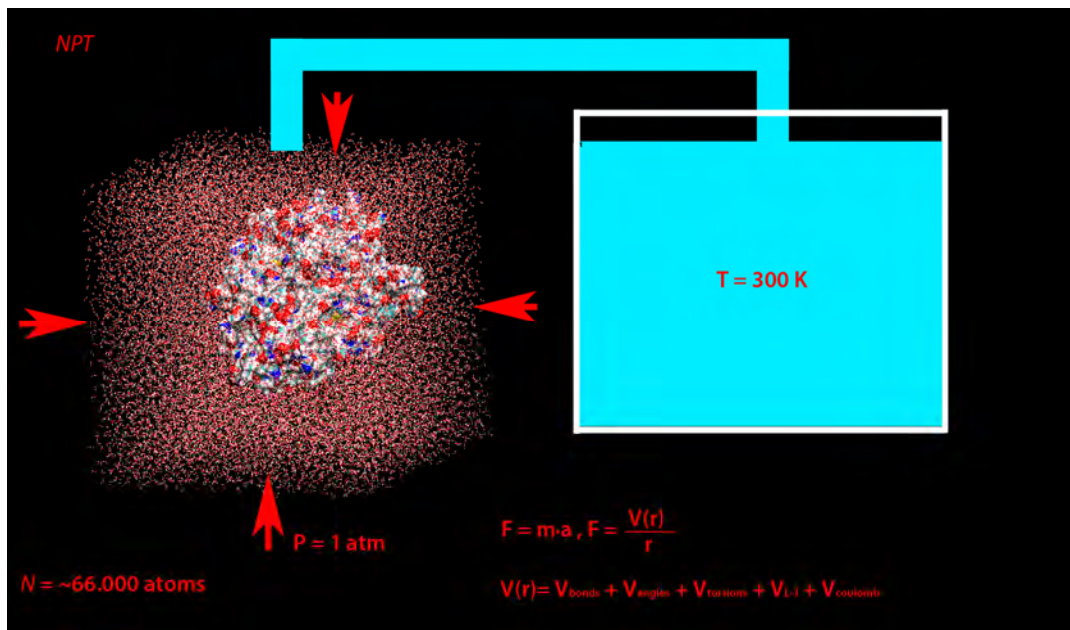
είναι πολύ μικρή. Ο πιο απλός αλγόριθμος είναι ο *steepest descents (SD)* ο οποίος υπολογίζει την ενεργειακή διαβάθμιση του συστήματος και μετακινεί τα άτομα για πολύ μικρή απόσταση σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτή, δηλαδή προς την κατεύθυνση της δύναμης. Αν στη νέα διαμόρφωση η ενέργεια είναι μικρότερη από αυτή της προηγούμενης ο αλγόριθμος επαναλαμβάνει την ίδια διαδικασία αυξάνοντας την απόσταση μετακίνησης. Ο αλγόριθμος αυτός συνήθως δεν συγκλίνει σε ένα σημείο αλλά επαναλαμβάνει την διαδικασία γύρω από ένα τοπικό ελάχιστο, παρ' όλα αυτά είναι πολύ αποδοτικός ως πρώτο βήμα στην ελαχιστοποίηση ενεργειακά "βρώμικων" δομών. Περισσότερο ακριβής αλγόριθμος είναι ο *conjugated gradients (CG)* ο οποίος διατηρεί στη μνήμη του τις ενεργειακές διαβαθμίσεις των προηγούμενων βημάτων. Το πρώτο βήμα γίνεται προς την κατεύθυνση της δύναμης αλλά τα επόμενα καθορίζονται από τους μέσους όρους της διαβάθμισης ενέργειας της νέας διαμόρφωσης και αυτές των προηγούμενων χρησιμοποιώντας κατάλληλους συντελεστές βαρύτητας. Ο αλγόριθμος αυτός συγκλίνει σε μία τελική δομή περισσότερο αποδοτικά και συνήθως ακολουθεί τον *SD*.



Εικόνα 17: A) Ενεργειακό τοπίο μίας πρωτεΐνης και οι πιθανές διαμορφώσεις κοντά στο ολικό ελάχιστο που καθορίζονται από μικρής, μεσαίας και μεγάλης χρονική κλίμακας κινήσεις. B) Εύρεση διαμορφώσεων ελάχιστης ενέργειας.

Η ελαχιστοποίηση ενέργειας ενδέχεται να παγιδέψει το σύστημα σε μία διαμόρφωση που αντιστοιχεί σε κάποιο τοπικό ελάχιστο. Η εύρεση ολικού ελαχίστου για δομές που δεν υπάρχει πληροφορία για το αν βρίσκονται κοντά σε αυτό γίνεται είτε τροποποιώντας τη διαμόρφωση με "τυχαίο" τρόπο χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις Monte Carlo ή γενετικούς αλγορίθμους (χρησιμοποιούνται συνήθως σε προσομοιώσεις πρόσδεσης μορίου σε μόριο) είτε με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αυξάνοντας και μειώνοντας τη θερμοκρασία αφήνοντας το σύστημα να κινηθεί για μερικά ps, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία για μερικούς κύκλους με ενδιάμεσα στάδια ελαχιστοποίησης ενέργειας (*simulated annealing*, εικόνα 17B).

Ένα τυπικό πρωτόκολλο προσομοίωσης MD περιλαμβάνει ελαχιστοποίηση της αρχικής δομής σε κενό (*in vacuo*), στην συνέχεια διαλυτοποίηση του συστήματος σε μόρια νερού κατάλληλα παραμετροποιημένα για το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιείται τα οποία τοποθετούνται γύρω από το σύστημα σε ένα νοητό κουτί καθορισμένου σχήματος (κυβικό ή δωδεκαεδρικό) και μεγέθους, εξουδετέρωση των φορτισμένων ομάδων του συστήματος με ιόντα Na^+ και Cl^- (εικόνα 18). Εφαρμογή κύκλων ελαχιστοποίησης ενέργειας και προσομοιώσεων MD μερικών εκατοντάδων ps στις οποίες η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά με τα άτομα της πρωτεΐνης αρχικά να μένουν ακίνητα με εφαρμογή κατάλληλης αρμονικής δύναμης σταθεράς K και σε κάθε κύκλο οι περιορισμοί να εξασθενούν με μείωση της σταθεράς αυτής (στάδιο εξισορρόπησης). Στον πρώτο κύκλο ο όγκος τους συστήματος παραμένει σταθερός ενώ στους υπόλοιπους διατηρείται σταθερή η πίεση με εφαρμογή κατάλληλων αλγορίθμων. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσομοίωση παραγωγής σε σταθερή θερμοκρασία (κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος) για το χρονικό διάστημα που έχει επιλεγεί και συνήθως για να έχουν φυσική σημασία οι παρατηρήσεις αυτή πρέπει να είναι τουλάχιστον μερικών ns. Κατά την έναρξη της προσομοίωσης οι αρχικές ταχύτητες των ατόμων καθορίζονται από κατανομή Boltzmann για την συγκεκριμένη θερμοκρασία. Οι συντεταγμένες και η ενέργεια του συστήματος αποθηκεύεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση.



Εικόνα 18: Προσομοίωση συστήματος πρωτεΐνης σε νερό σε συνθήκες σταθερής πίεσης και θερμοκρασίας.

Οι τροχιές που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης αναλύονται ως προς διάφορες ιδιότητες του συστήματος για τις οποίες εξετάζεται η μεταβολή τους σε σχέση με τον χρόνο. Για κάθε ιδιότητα υπολογίζονται μέσοι όροι, διακυμάνσεις, συναρτήσεις συσχέτισης με τον χρόνο (αυτοσυσχέτισης καθώς και διασυσχέτισης με κάποια άλλη ιδιότητα του συστήματος). Έστω μια ιδιότητα X και X_n η τιμή αυτής στο n χρονικό σημείο της προσομοίωσης και n_i το σύνολο των χρονικών σημείων της προσομοίωσης. Η μέση τιμή της ιδιότητας αυτής για το σύνολο της προσομοίωσης θα δίνεται από την εξίσωση 17.

$$\langle X \rangle = \frac{1}{n_i} \sum_{n=1}^{n_i} X_n \quad \text{Εξίσωση 17}$$

Η διακύμανση (*fluctuation*) της ιδιότητας δίνεται από το μέσο τετράγωνο της απόκλισης της ιδιότητας από τη μέση τιμή της. Αν η απόκλιση είναι $\delta X = X - \langle X \rangle$ τότε η διακύμανση θα δίνεται από την εξίσωση 18.

$$\langle (\delta X)^2 \rangle = \langle X^2 \rangle - \langle X \rangle^2 = \frac{1}{n_i} \sum_{n=1}^{n_i} X_n^2 - \langle X \rangle^2 \quad \text{Εξίσωση 18}$$

Η ρίζα των μέσων τετραγώνων αποκλίσεων της ιδιότητας (RMS), ή διαφορετικά $\sigma(X)$ θα είναι η τετραγωνική ρίζα της διακύμανσής της δηλαδή $\sigma(X) = \sqrt{\langle (\delta X)^2 \rangle}$. Από τις παραπάνω ποσότητες μπορεί να υπολογιστεί η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης που δηλώνει τον τρόπο με τον οποίο η ιδιότητα αποκλίνει από τη μέση τιμή της σε σχέση με τον χρόνο και δίνεται από την εξίσωση 18.

$$C_{zz}(t) = \langle \delta X(t) \cdot \delta X(0) \rangle = \langle X(t) \cdot X(0) \rangle - \langle X \rangle^2 \quad \text{Εξίσωση 18}$$

Συνήθως η συνάρτηση αυτή κανονικοποιείται διαιρώντας με τη διακύμανση της ιδιότητας (εξίσωση 19).

$$\hat{C}_{zz}(t) = \frac{C_{zz}(t)}{\sigma^2(X)} \quad \text{Εξίσωση 19}$$

Με παρόμοιο τρόπο μπορούν να συσχετισθούν και δύο διαφορετικές ιδιότητες (X, Ψ) με τη συνάρτηση διασυσχέτισης να δίνεται από την εξίσωση 20.

$$C_{zz}(t) = \langle \delta X(t) \cdot \delta \Psi(0) \rangle = \langle X(t) \cdot \Psi(0) \rangle - \langle X \rangle \cdot \langle \Psi \rangle \quad \text{Εξίσωση 20}$$

Συνήθως και σε αυτή την περίπτωση γίνεται κανονικοποίηση διαιρώντας με το γινόμενο των RMS των αποκλίσεων της κάθε ιδιότητας. Οι συναρτήσεις αυτές δεν εξαρτώνται από το σημείο που επιλέγεται για να υπολογιστούν δηλαδή για όλους τους χρόνους τ θα ισχύει

$$\langle X(t) \cdot X(0) \rangle = \langle X(\tau + t) \cdot X(\tau) \rangle \quad \text{Εξίσωση 21}$$

Αυτό σημαίνει ότι για ένα χρονικό σημείο t τα γινόμενα $\langle X(\tau + t) \cdot X(\tau) \rangle$ για όλους τους δυνατούς χρόνους τ θα συνεισφέρουν στον μέσο όρο που χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η αυτοσυσχέτιση. Αυτό αποδίδεται στην εξίσωση 22

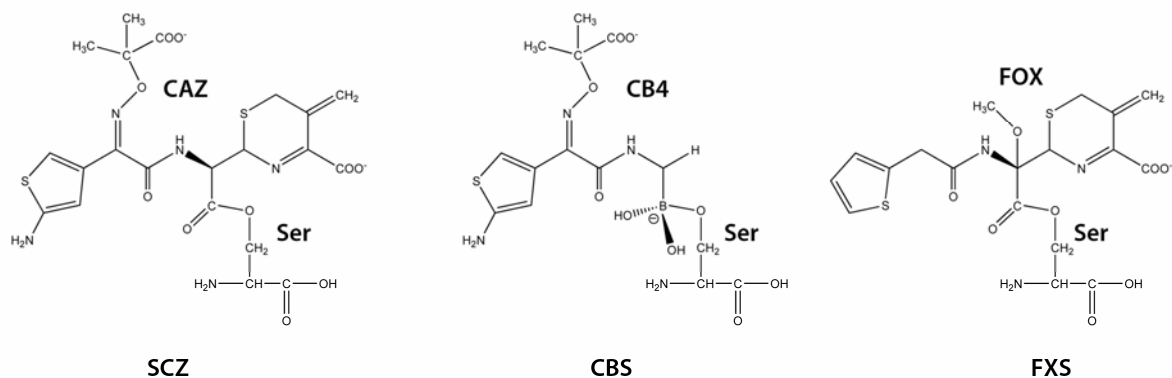
$$\langle X(t_n) \cdot X(0) \rangle = \frac{1}{n_{\max}} \sum_{i=1}^{n_{\max}} X_i \cdot X_{i+1} \quad \text{Εξίσωση 22}$$

Όπου t_n ο χρόνος που αντιστοιχεί στο n στοιχείο της σειράς δεδομένων και $n_{\max} = n_t - n_0$ αριθμός των διαστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί ο μέσος όρος. Ο χρόνος συσχέτισης μίας ιδιότητας (τ_c) αντιστοιχεί στο χρονικό σημείο της προσομοίωσης που παρατηρείται σύγκλιση μίας ιδιότητας προς τη μέση τιμή της. Οι τρεις παραπάνω ποσότητες (μέσοι όροι, διακυμάνσεις, συναρτήσεις συσχέτισης) χρησιμοποιούνται για να

εκτιμηθούν οι μικροσκοπικές ιδιότητες του συστήματος που μπορούν να συσχετισθούν με μακροσκοπικές πειραματικές παρατηρήσεις.

ii. Παραμετροποίηση πεδίου δυνάμεων

Στην παρούσα μελέτη οι β-λακταμάσες και τα σύμπλοκα αυτών προσομοιώθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα GROMACS v3.3 (<http://www.gromacs.org/>) χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα Amber99 όπως είχε τροποποιηθεί για χρήση από το παραπάνω λογισμικό πρόγραμμα (Sorin E. J. και Pande V. S., 2005; Van Der Spoel D. και συν., 2005). Όπως αναφέρθηκε προσομοιώθηκαν και ομοιοπολικά σύμπλοκα των ενζύμων με τα β-λακταμικά κεφταζιδίμη και κεφοξιτίνη και με το βορονικό ανάλογο της κεφταζιδίμης τα οποία συνδέονταν με το οξυγόνο του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε δεν διέθετε παραμέτρους για τα παραπάνω μόρια. Έτσι παραμετροποιήθηκαν τροποποιημένα κατάλοιπα σερίνης τα οποία στην πλευρική τους αλυσίδα έφεραν συνδεδεμένα τα παραπάνω μόρια (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Τροποποιημένα κατάλοιπα σερίνης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Οι δομές της κεφταζιδίμης (CAZ) και της κεφοξιτίνης (FOX) αντιστοιχούν στη ρίζα ακύλ-ενζύμου από όπου η R2 πλευρική αλυσίδα του C3 του δακτυλίου διυδροθειαζίνης έχει απομακρυνθεί και αυτός συνδέεται με μεθυλιδέν ομάδα. Είναι SCZ: κεφταζιδίμη-σερίνη ($q_{\text{tot}} = -2$), CBS: βορονικό ανάλογο κεφταζιδίμης-σερίνη ($q_{\text{tot}} = -2$) και FXS: κεφοξιτίνη-σερίνη ($q_{\text{tot}} = -1$). Τα κατάλοιπα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω μορφή για τον υπολογισμό των ατομικών μερικών φορτίων. Στο πεδίο δυνάμεων εισήχθησαν με την αμινομάδα της σερίνης να είναι αποπρωτονωμένη και την καρβονυλομάδα από-υδροξυλιωμένη αντίστοιχα εφόσον τα κατάλοιπα αυτά συμμετέχουν σε εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς.

Αρχικά υπολογίστηκαν τα μερικά ατομικά φορτία των παραπάνω καταλοίπων μέσω υπολογισμού του δυναμικού ESP με προσομοίωση κβαντικής μηχανικής στο επίπεδο HF/6-31G* της θεωρίας των μοριακών τροχιακών (κατάλληλο για αρνητικά φορτισμένα και ουδέτερα μόρια). Τα κατάλοιπα "δομήθηκαν" με το λογισμικό Spartan και δημιουργήθηκε το αρχείο εισόδου για το πρόγραμμα Gaussian03 με το οποίο έγινε ο υπολογισμός QM. Το αρχείο εξόδου με το πέρας της προσομοίωσης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των μερικών φορτίων RESP (Restricted Electrostatic Potential) μέσω του λογισμικού πακέτου AmberTools χρησιμοποιώντας τα προγράμματα *antechamber* και *resp* αυτού (Wang J. M. και συν., 2000). Πέρα από τα μερικά φορτία το πρόγραμμα εξάγει και τις παραμέτρους των δεσμικών δυναμικών για τα άτομα των μορίων βάσει της ηλεκτρονικής ομοιότητας τους με άτομα μικρών οργανικών μορίων όπως έχουν παραμετροποιηθεί στο πεδίο δυνάμεων GAFF (General Amber Force Field for organic molecules) (Wang J. και συν., 2006). Εφόσον για την προσομοίωση των β-λακταμασών επιλέχθηκε το πεδίο δυνάμεων Amber99 που είναι συμβατό με το GAFF οι σταθερές των δυναμικών που δόθηκαν από το *antechamber* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις προσομοιώσεις των τροποποιημένων καταλοίπων σερίνης.

Οι προσομοιώσεις έγιναν με το GROMACS οπότε απαιτούνταν κάποιοι μετασχηματισμοί καθώς τα δύο πακέτα χρησιμοποιούν διαφορετικές μονάδες μέτρησης και μορφές των ενεργειακών εξισώσεων. Οι μετασχηματισμοί έγιναν με αυτόματη διαδικασία χρησιμοποιώντας *script* που έτρεχε με το πρόγραμμα Python και οι κανόνες που ακολουθήθηκαν δίνονται παρακάτω.

α. Δυναμικό δόνησης ομοιοπολικού δεσμού

Στο Amber το δυναμικό των δεσμών δίνεται από την παρακάτω σχέση

$$V_{\text{bonds}} = \sum_{\text{bonds}} K_b (b - b_0)^2$$

σε την σταθερά του δεσμού K_b να δίνεται σε $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ και το μήκος ισορροπίας του δεσμού b_0 σε \AA .

Το παραπάνω αρμονικό δυναμικό στο GROMACS δίνεται από την παρακάτω εξίσωση

$$V_{\text{bonds}} = \sum_{\text{bonds}} \frac{K_b}{2} (b - b_0)^2$$

Όπου εδώ η K_b μετράται σε $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ και το b_0 σε nm. Οπότε οι μετασχηματισμοί που απαιτούνται θα είναι:

$$K_{b,\text{GROMACS}} = (2\cdot 4.184 \cdot K_{b,\text{Amber}}) / (10^{-1})^2$$

και

$$b_{0,\text{GROMACS}} = b_{0,\text{Amber}} \cdot 10^{-1}$$

β. Δυναμικό κάμψης γωνίας

Το αρμονικό δυναμικό μεταβολής της γωνίας τριών συνδεδεμένων ατόμων στο Amber δίνεται από τη σχέση

$$V_{\text{angles}} = \sum_{\text{angles}} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$$

Όπου η K_{θ} μετράται σε $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{deg}^2$ και η γωνία ισορροπίας θ_0 σε μοίρες (deg)

Το αρμονικό γωνιακό δυναμικό στο GROMACS είναι

$$V_{\text{angles}} = \sum_{\text{angles}} \frac{K_{\theta}}{2} (\theta - \theta_0)^2$$

Με την K_{θ} να είναι σε $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{deg}^2$ και η θ_0 σε deg

οπότε

$$K_{\theta,\text{GROMACS}} = 2\cdot 4.184 \cdot K_{\theta,\text{Amber}}$$

γ. Δυναμικό γωνίας διέδρου

Στο Amber το δυναμικό γωνίας διέδρου περιγράφεται από την παρακάτω περιοδική εξίσωση

$$V_{\text{proprs}} = \sum_{\text{proprs}} \frac{PK}{IDIVF} [1 + \cos(PN\phi - PHASE)]$$

Όπου PK το ενεργειακό φράγμα περιστροφής διαιρεμένο με το 2 (σε Kcal·mol⁻¹), IDIVF ένας παράγοντας με τον οποίο το ενεργειακό φράγμα διαιρείται ώστε να συνυπολογιστούν τα διάφορα ενεργειακά φράγματα που εμφανίζονται σε μία πλήρη περιστροφή του δεσμού, PN η περιοδικότητα εμφάνισης κοιλάδων και κορυφών και PHASE η φάση της γωνίας διέδρου σε ακτίνια (rad).

Στο GROMACS το δυναμικό της γωνίας διέδρου περιγράφεται από συνάρτηση Ryckaert-Bellemans ώστε να αποδοθούν με ακρίβεια τα πολλαπλά ενεργειακά φράγματα περιστροφής διαφόρων δεσμών. Το δυναμικό RB έχει τη μορφή

$$V^{rbs} = \sum_{n=0}^5 C_n [\cos(\psi)]^n$$

και οι 5 σταθερές C_n υπολογίζονται από τα ενεργειακά φράγματα περιστροφής V_n ως εξής

$$V_n = 2 \cdot 4.184 \cdot PK \cdot IDIVF^{-1}$$

$$PHASE_{\text{Gromacs}} = \pi \cdot PHASE_{\text{Amber}}$$

$$C_0 = \begin{cases} 0.5 \cdot V_n & , \text{ PN}=1 \\ V_n & , \text{ PN}=2 \text{ PHASE} = 180^\circ \\ 0 & , \text{ PN}=2 \text{ PHASE} = 0^\circ \\ 0.5 \cdot V_n & , \text{ PN}=3 \\ 0 & , \text{ PN}=4 \text{ PHASE} = 180^\circ \\ V_n & , \text{ PN}=4 \text{ PHASE} = 0^\circ \end{cases}$$

$$C_1 = \begin{cases} -0.5 \cdot V_n & , \text{ PN=1 PHASE} = 0^\circ \\ 0.5 \cdot V_n & , \text{ PN=1 PHASE} = 180^\circ \\ 0 & , \text{ PN=2} \\ 1.5 \cdot V_n & , \text{ PN=3 PHASE} = 0^\circ \\ -1.5 \cdot V_n & , \text{ PN=3 PHASE} = 180^\circ \\ 0 & , \text{ PN=4} \end{cases}$$

$$C_2 = \begin{cases} 0 & , \text{ PN=1} \\ -V_n & , \text{ PN=2 PHASE} = 180^\circ \\ V_n & , \text{ PN=2 PHASE} = 0^\circ \\ 0 & , \text{ PN=3} \\ 4 \cdot V_n & , \text{ PN=4 PHASE} = 180^\circ \\ -4 \cdot V_n & , \text{ PN=4 PHASE} = 0^\circ \end{cases}$$

$$C_3 = \begin{cases} 0 & , \text{ PN=1} \\ 0 & , \text{ PN=2} \\ 2 \cdot V_n & , \text{ PN=3 PHASE} = 180^\circ \\ -2 \cdot V_n & , \text{ PN=3 PHASE} = 0^\circ \\ 0 & , \text{ PN=4} \end{cases}$$

$$C_4 = \begin{cases} 0 & , \text{ PN=1} \\ 0 & , \text{ PN=2} \\ 0 & , \text{ PN=3} \\ -4 \cdot V_n & , \text{ PN=4 PHASE} = 180^\circ \\ 4 \cdot V_n & , \text{ PN=4 PHASE} = 0^\circ \end{cases}$$

$$C_5 = 0$$

δ. Δυναμικό γωνίας διέδρου εκτός επιπέδου

Στο Amber οι γωνίες διέδρου εκτός επιπέδου χαρακτηρίζονται από ένα περιοδικό δυναμικό

$$V_{\text{impropers}} = \sum_{\text{impropers}} PK [1 + \cos(PN\varphi - \text{PHASE})]$$

Το GROMACS χρησιμοποιεί μία αρμονική συνάρτηση για να περιγράψει την κίνηση εκτός επιπέδου, οπότε χρησιμοποιήθηκε ένα περιοδικό δυναμικό κανονικής γωνίας διέδρου ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι παράμετροι του Amber.

$$V_{\text{impropers}} = \sum_{\text{impropers}} K_d [1 + \cos(n\phi - \phi_s)]$$

$$K_{d,\text{GROMACS}} = 4.184 \cdot PK$$

$$n = PN$$

$$\phi_s = \pi \cdot \text{PHASE}$$

ε. Δυναμικό Lennard-Jones

Στο Amber, οι αλληλεπιδράσεις VdW περιγράφονται από το δυναμικό Lennard – Jones που έχει τη μορφή

$$V_{\text{LJ}} = \sum_{\text{pairs}} \left[\frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^6} \right]$$

Ενώ στο GROMACS ο όρος 6-12 δίνεται από την εξίσωση

$$V_{\text{LJ}} = \sum_{\text{pairs}} 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

Οι όροι A και C συνδέονται με την ακτίνα VdW και το ενεργειακό πηγάδι του δυναμικού σύμφωνα με τις σχέσεις

$$A = \epsilon \cdot (2 \cdot r_{\text{vdw}})^{12} \text{ and } C = 2 \cdot \epsilon \cdot (2 \cdot r_{\text{vdw}})^6$$

Η παράμετρος σ που χρησιμοποιεί το GROMACS συνδέεται με την ακτίνα VdW σύμφωνα με την σχέση

$$\sigma = 2 \cdot r_{\text{vdw}} \cdot 2^{-1/6}$$

Οπότε απαιτούνται οι ακόλουθοι μετασχηματισμοί

$$\epsilon_{\text{Gromacs}} = [C^2 \cdot (4 \cdot A)^{-1}] \cdot 4.184 \text{ (KJ/mol)}$$

και

$$\sigma_{\text{Gromacs}} = (A/C)^{1/6} \cdot 0.1 \text{ (nm)}$$

Το GAFF δεν διαθέτει παραμέτρους για το άτομο βορίου όταν αυτό βρίσκεται σε βορονικά οξέα οπότε για το CBS οι συγκεκριμένες σταθερές προέκυψαν με αντίστοιχη

διαδικασία χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους που είχαν αναπτυχθεί για το πεδίο δυνάμεων Amber* από άλλη ερευνητική ομάδα και περιγράφουν το άτομο βορίου και τις υδροξυλομάδες που αυτό συνδέεται σε αλκύλ-βορονικά οξέα (Tafi A. και συν., 2005). Αναφορικά με το δυναμικό LJ για το άτομο βορίου δίνονταν το ενεργειακό φρέατι και η ακτίνα VdW οπότε οι μετασχηματισμοί που έγιναν ήταν οι παρακάτω.

$$\epsilon_{\text{Gromacs,B}} = 4.184 \cdot \epsilon_{\text{Amber*,B}} \text{ (μετετροπή σε KJ/mol)}$$

και

$$\sigma_{\text{Gromacs,B}} = 2^{5/6} \cdot r_{\text{vdW}} * 0.1$$

Οι αντίστοιχες παράμετροι εισήχθησαν στα αρχεία του πεδίου δυνάμεων Amber99 του GROMACS δημιουργώντας ένα υβριδικό πεδίο δυνάμεων το οποίο περιείχε τα τροποποιημένα κατάλοιπα SCZ, CBS και FXS (παράρτημα A).

iii. Αρχικές δομές που χρησιμοποιήθηκαν στις προσομοιώσεις MD

Οι συντεταγμένες της CMY-2 προέρχονταν από την κρυσταλλική δομή συμπλόκου της με κιτρικό οξύ (PDB ID: 1ZC2, ανάλυση 1,92 Å) και αυτές της GES-1 εξήχθησαν από την κρυσταλλογραφική δομή αυτής (PDB ID: 1QPN ανάλυση 1,1 Å). Οι δομές των μεταλλακτών της CMY-2, CMY-30 (Val211Gly) και CMY-42 (Val211Ser) όπως και αυτών της GES-1, GES-2 (Gly170Asn), GES-5 (Gly170Ser), GES-7 (Glu104Lys), GES-13 (Glu104Lys, Gly170Asn) και GES-6 (Glu104Lys, Gly170Ser) προέκυψαν μέσω προτυποποίησης ομολογίας (*homology modeling*) χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο MODELLER (version 9.4, <http://salilab.org/modeller/>) (Eswar N. και συν., 2008). Το πρόγραμμα χρησιμοποιούσε τις κρυσταλλογραφικές δομές ως μήτρα και βάσει ενός αρχείου στο οποίο οι αμινοξικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης γνωστής δομής είχαν αντιστοιχηθεί με τους μεταλλάκτες (αρχείο PIR) παρήγαγε μοντέλα των μεταλλακτών αφού πρώτα βελτίωνε ενεργειακά τις δομές χρησιμοποιώντας λεπτομερή πρωτόκολλα ελαχιστοποίησης ενέργειας και προσομοιώσεων *simulated annealing*. Τα τελικά μοντέλα που εξάγονταν από το πρόγραμμα βαθμολογούνταν βάσει της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας (*probability density function*) ενώ ελέγχονταν περαιτέρω με το πρόγραμμα PROCHEK και το δυναμικό DOPE του MODELLER (Laskowski R. A. και συν., 1994; Shen M. Y. και Sali A., 2006). Οι δομές με τις καλύτερες βαθμολογίες επιλέγονταν για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Οι δομές των ομοιοπολικών συμπλόκων των ενζύμων CMY με την κεφταζιδίμη και το βορονικό ανάλογο αυτής προέκυψαν μέσω υπερτοποθέτησης των τρισδιάστατων δομών των ελευθέρων ενζύμων στις κρυσταλλογραφικές δομές των αντίστοιχων συμπλόκων της AmpC του *E. coli* K12 (PDB IDs 1IEL και 1IEM αντίστοιχα; Powers R. A. και συν., 2001) χρησιμοποιώντας τα Ca άτομα του πρωτεϊνικού σκελετού για τη διαδικασία RMS. Τα άτομα της CAZ και του CB4 μεταφέρονταν από το αρχείο pdb της εκάστοτε υπερτοποθετημένης κρυσταλλογραφικής δομής σε αυτό της CMY και το όνομα καταλοίπου τροποποιούνταν σε SCZ και CBS αντίστοιχα όπως και αυτό της Ser64 του κάθε ενζύμου CMY. Ο δεσμός μεταξύ του κάθε προσδέτη και της καταλυτικής σερίνης δημιουργούνται αυτόματα από το GROMACS όπως θα αναφερθεί στην επόμενη ενότητα. Με τον ίδιο τρόπο προέκυψαν και τα ομοιοπολικά σύμπλοκα των ενζύμων GES με την κεφοξιτίνη και το CB4 όπου όμως χρησιμοποιήθηκαν οι κρυσταλλογραφικές δομές των αντίστοιχων συμπλόκων της β-λακταμάσης τάξης A CTX-M-9 (PDB IDs 1YMX και 1YLY αντίστοιχα; Chen Y. και συν., 2005).

iv. Δημιουργία των αρχικών συστημάτων και προσομοιώσεις

(Rosenblum G. και συν., 2007)

Τα αρχεία pdb που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία εισήχθησαν στο GROMACS με το πρόγραμμα *pdb2gmx* του πακέτου με επιλογή παραμετροποίησης σύμφωνα με το τροποποιημένο πεδίο δυνάμεων Amber99. Το πρόγραμμα αναγνωρίζει το όνομα των καταλοίπων και εξάγει τις αντίστοιχες παραμέτρους της ενεργειακής εξίσωσης από το πεδίο δυνάμεων δημιουργώντας ένα αρχείο τοπολογίας (αρχείο top). Ανάλογα λοιπόν με το όνομα των αμινοξικών καταλοίπων εξάγει τις παραμέτρους για τις πρωτονιωμένες ή αποπρωτονιωμένες μορφές αυτών (π.χ. αν ένα κατάλοιπο λυσίνης στο αρχείο pdb έχει το όνομα LYP θα πρωτονιωθεί αντίστοιχα ώστε να είναι θετικά φορτισμένο ενώ αν έχει το όνομα LYN η αμινομάδα του θα πρωτονιωθεί με δύο υδρογόνα και θα είναι ουδέτερη). Τα τροποποιημένα κατάλοιπα σερίνης που φέρουν τα β-λακταμικά και το βορονικό οξύ αναγνωρίζονται επίσης από το όνομά τους και το πρόγραμμα δημιουργεί τον δεσμό μεταξύ του οξυγόνου της σερίνης και του C8 του β-λακταμικού ή του ατόμου βορίου του βορονικού οξέος εφόσον από το πεδίο δυνάμεων

"βλέπει" ότι τα άτομα αυτά είναι συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό. Η κατάσταση πρωτονίωσης των αμινοξέων με πλευρικές αλυσίδες που μπορούν να φορτιστούν εκτιμήθηκε σε pH 7 βάσει των τιμών pKa που υπολογίστηκαν για την κάθε δομή με το πρόγραμμα PROPKA (<http://proPKA.ki.ku.dk/>). Η λυσίνη 67 των ενζύμων CMY έδινε μία $\langle pKa \rangle \sim 7,5$ για όλα τα ένζυμα αλλά εφόσον η κατάσταση πρωτονίωσης αυτής αποτελεί ακόμα αντικείμενο μελέτης για κάθε ρίζα των ενζύμων CMY έγιναν δύο προσομοιώσεις όπου στη μία η Lys67 ήταν ουδέτερη και στην άλλη θετικά φορτισμένη. Στα ένζυμα GES και τα δύο καταλυτικά αμινοξέα Lys73 και Glu166 ήταν φορτισμένα. Στις παραπάνω δομές η ενέργεια ελαχιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας SD 5000 βημάτων δημιουργώντας ένα αρχείο με τις παραμέτρους της προσομοίωσης (αρχείο mdp) το οποίο εισήχθη στο *grompp* που δημιουργεί ένα αρχείο (top) με όλες τις πληροφορίες του συστήματος που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα *mdrun* που είναι η κεντρική μηχανή προσομοιώσεων του GROMACS. Στη συνέχεια το σύστημα περιβλήθηκε σε ένα νοητό κουτί κυβικού σχήματος το οποίο απείχε 0,9 nm από την επιφάνεια της κάθε πρωτεΐνης με το πρόγραμμα *editconf*. Προστέθηκαν μόρια νερού του μοντέλου TIP3P με το πρόγραμμα *genbox* ενώ στην συνέχεια το φορτίο του συστήματος εξουδετερώθηκε χρησιμοποιώντας ιόντα Na⁺ και Cl⁻ σε συνολική συγκέντρωση 0,15 mol/l με το πρόγραμμα *genion*.

Τα παραπάνω συστήματα εξισορροπήθηκαν με 5 κύκλους ελαχιστοποίησης ενέργειας SD και προσομοιώσεων MD διάρκειας 100 ps κατά τις οποίες η θερμοκρασία αυξάνονταν σταδιακά ως τα 300 K σε σταθερή πίεση 1 atm με τη θέση των ατόμων της πρωτεΐνης να περιορίζεται από ένα αρμονικό δυναμικό σταθεράς 1000 KJ·mol⁻¹·nm⁻² που εφαρμοζόταν στις 3 διαστάσεις του συστήματος συντεταγμένων. Η σταθερά αυτή σε κάθε κύκλο μειωνόταν με αποτέλεσμα τα άτομα της πρωτεΐνης να αφήνονται σταδιακά να κινηθούν. Έπειτα από την τελική ελαχιστοποίηση το σύστημα εισήχθη στην φάση παραγωγής κατά την οποία εξερευνήθηκαν 5 ns για τις CMY και 6 ns για τις GES του χώρου φάσης (που συνίσταται από το σύνολο διαμορφώσεων και ταχυτήτων των ατόμων) σε θερμοκρασία 300 K σε σταθερή πίεση 1 atm (σύστημα NPT). Το μήκος όλων των δεσμών περιορίζονταν με τον αλγόριθμο SHAKE ενώ ένα διάστημα 2 fs χρησιμοποιούνταν για την ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεγάλης κλίμακας υπολογίζονταν με τη μέθοδο PME (Particle Mesh Ewald). Η ενέργεια και οι συντεταγμένες αποθηκεύονταν κάθε 0,1 και 1

ps αντίστοιχα. Οι προσομοιώσεις MD έγιναν χρησιμοποιώντας την παράλληλη έκδοση του προγράμματος *mdrun* σε δύο επεξεργαστές διπύρηνων συστημάτων.

v. Ανάλυση των τροχιών μοριακής δυναμικής

Εξετάσθηκαν οι διακυμάνσεις στη δυναμική ενέργεια του συστήματος καθώς και αυτές των επιμέρους όρων της ενεργειακής εξίσωσης (π.χ. δυναμικό Lennard-Jones για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-διαλύτη) ώστε να εξακριβωθεί το χρονικό σημείο ενεργειακής σύγκλισης για κάθε πρωτεΐνη. Η δομική σύγκλιση εξακριβώθηκε μέσω της ρίζας των μέσων τετραγώνων της απόκλισης (RMSD) της θέσης των ατόμων από αυτή που είχαν στην αρχική δομή. Επιπλέον εξετάσθηκαν γραφήματα μεταβολής σε σχέση με τον χρόνο της πρωτεϊνικής προσβάσιμης επιφάνειας (υδρόφιλης και υδρόφοβης) όπως και της ακτίνας περιστροφής (*radius of gyration*) ώστε να εξακριβωθεί περαιτέρω η δομική σταθερότητα. Η ευελιξία της πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με προσδιορισμό της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης της γωνίας δίδρου χ του πρωτεϊνικού σκελετού από όπου υπολογίστηκαν οι παράμετροι τάξης (S^2 , δηλώνουν την κατεύθυνση του διανύσματος της αμίδης του σκελετού) και ο εσωτερικός χρόνος συσχέτισης για κάθε αμινοξικό κατάλοιπο της πρωτεΐνης (τ_{eq}). Η διακύμανση της θέσης των ατόμων σε κάθε σύστημα εκτιμήθηκε με την ρίζα των μέσων τετραγώνων της διακύμανσης (**RMSF**) από όπου υπολογίστηκαν οι θερμικοί παράγοντες (**B-factors**), οι οποίοι επίσης δίνουν ένα μέτρο της ευελιξίας της πρωτεΐνης, σύμφωνα με την σχέση:

$$B = \frac{8\pi^2}{3} \cdot (RMSF \cdot 10)^2 \quad \text{Εξίσωση 23}$$

με τις **RMSF** να είναι σε nm και οι παράγοντες **B** σε \AA^2 .

Η ερμηνεία των ατομικών διακυμάνσεων (ή μετατοπίσεων) έγινε με ανάλυση συνδιακύμανσης η οποία μπορεί να αναγνωρίσει ποιες είναι οι κύριες συλλογικές κινήσεις που σημειώθηκαν στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Η ανάλυση αυτή (*Principle Component Analysis*; Ichiye T. και Karplus M., 1991) ξεκινώντας από την πολυδιάστατη κατανομή των διαμορφώσεων των ατόμων που προέκυψαν από την προσομοίωση μετασηματίζει τις συντεταγμένες τους στους αρχικούς άξονες αναφοράς βάσει ομοιότητας των δομών ώστε να βρει νέους άξονες που θα ικανοποιούν μία απλούστερη

κατανομή των διαμορφώσεων. Η ανάλυση παίρνει το q διάνυσμα των συντεταγμένων m για το σύστημα διαμορφώσεων και υπολογίζει τον τετραγωνικό πίνακα $m \times m$ $\mathbf{M}^T \mathbf{M}$ (όπου \mathbf{M}^T τα μετασχηματισμένα δεδομένα) ο οποίος ονομάζεται και πίνακας συνδιακύμανσης C με τον οποίο συσχετίζονται οι συντεταγμένες των δομών και θα είναι (Becker O. M. και συν., 2001)

$$C = \langle (q - \langle q \rangle) \cdot (q - \langle q \rangle)^T \rangle \quad \text{Εξίσωση 24}$$

Ο πίνακας συνδιακύμανσης στην συνέχεια διαγωνοποιείται ώστε να προκύψουν τα ιδιοδιανύσματα που εξηγούν τις κύριες ατομικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν στο σύνολο των δομών για το διάστημα που εξετάζεται. Η ανάλυση PCA εφαρμόστηκε στα βαρέα άτομα των ενζύμων και των προσδεδεμένων μορίων.

Οι διαμορφώσεις του ενεργού κέντρου που εμφανίστηκαν κατά την διάρκεια της κάθε προσομοίωσης (τα αμινοξέα των ενεργών κέντρων για τις βΛτΑ και C δίνονται στις αντίστοιχες ενότητες του γενικού μέρους) ομαδοποιήθηκαν βάσει ομοιότητας (RMSD < 1 Å) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο GROMOS. Για το σταθερό τμήμα κάθε προσομοίωσης υπολογίστηκε μία μέση δομή της οποίας η ενέργεια ελαχιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 10000 βήματα SD και 5000 βήματα CG *in vacuo*. Στο πρώτο βήμα ελαχιστοποίησης οι ομοιοπολικοί δεσμοί περιγράφονταν από ένα δυναμικό *Morse* το οποίο επιτρέπει την διάσπαση τους και όχι από αρμονικό δυναμικό το οποίο δεν την επιτρέπει.

Οι χρόνοι παραμονής των μορίων νερού στις θέσεις υδάτωσης του ακυλενζύμου κεφατιζιδίμης των CMY (τ_{res}) υπολογίστηκαν με ολοκλήρωση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης (εξίσωση 25; Larentzos J. P. και Criscenti L. J., 2008) των επαφών μεταξύ του ατόμου οξυγόνου του νερού και ομάδων των ενζύμων και της κεφατιζιδίμης οι οποίες επαφές εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα όριο 3,6 Å.

$$\tau_{res} = \int_0^{\infty} \left(\frac{1}{n_{max}} \cdot \sum_{i=1}^{n_{max}} \langle C_i(t) \cdot C_i(0) \rangle \right) \quad \text{Εξίσωση 25}$$

Επίσης αναλύθηκαν σημαντικές αποστάσεις και το δίκτυο δεσμών υδρογόνου των ενεργών κέντρων κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων.

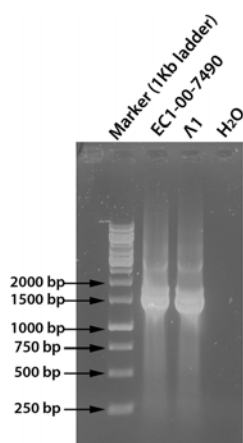
Όλα τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αναλύσεις συμπεριλαμβάνονταν στο πακέτο GROMACS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Φάσμα υποστρωμάτων των β-λακταμασών CMY-2, CMY-30 και CMY-42

i. Κλωνοποίηση των bla_{CMY-2} , bla_{CMY-30} και bla_{CMY-42} στα πλασμιδιακά οχήματα $pACYC-184$ και $pBC-SK(+/-)$

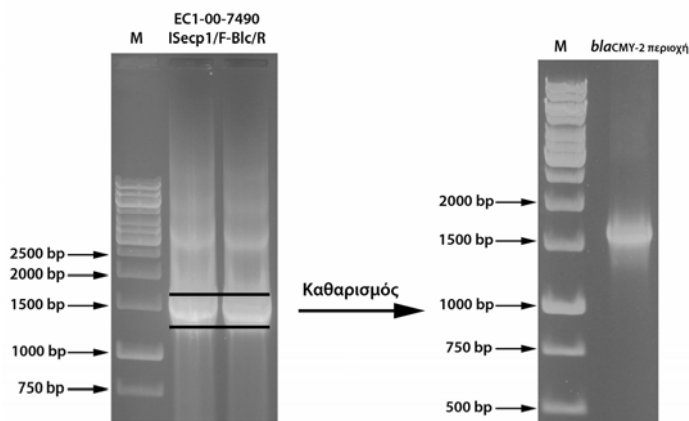
Από την αντίδραση PCR που περιγράφεται στην ενότητα 2.Z.i προέκυψαν τα προϊόντα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Προϊόντα ISEcp1/F2 - B1c/R PCR.

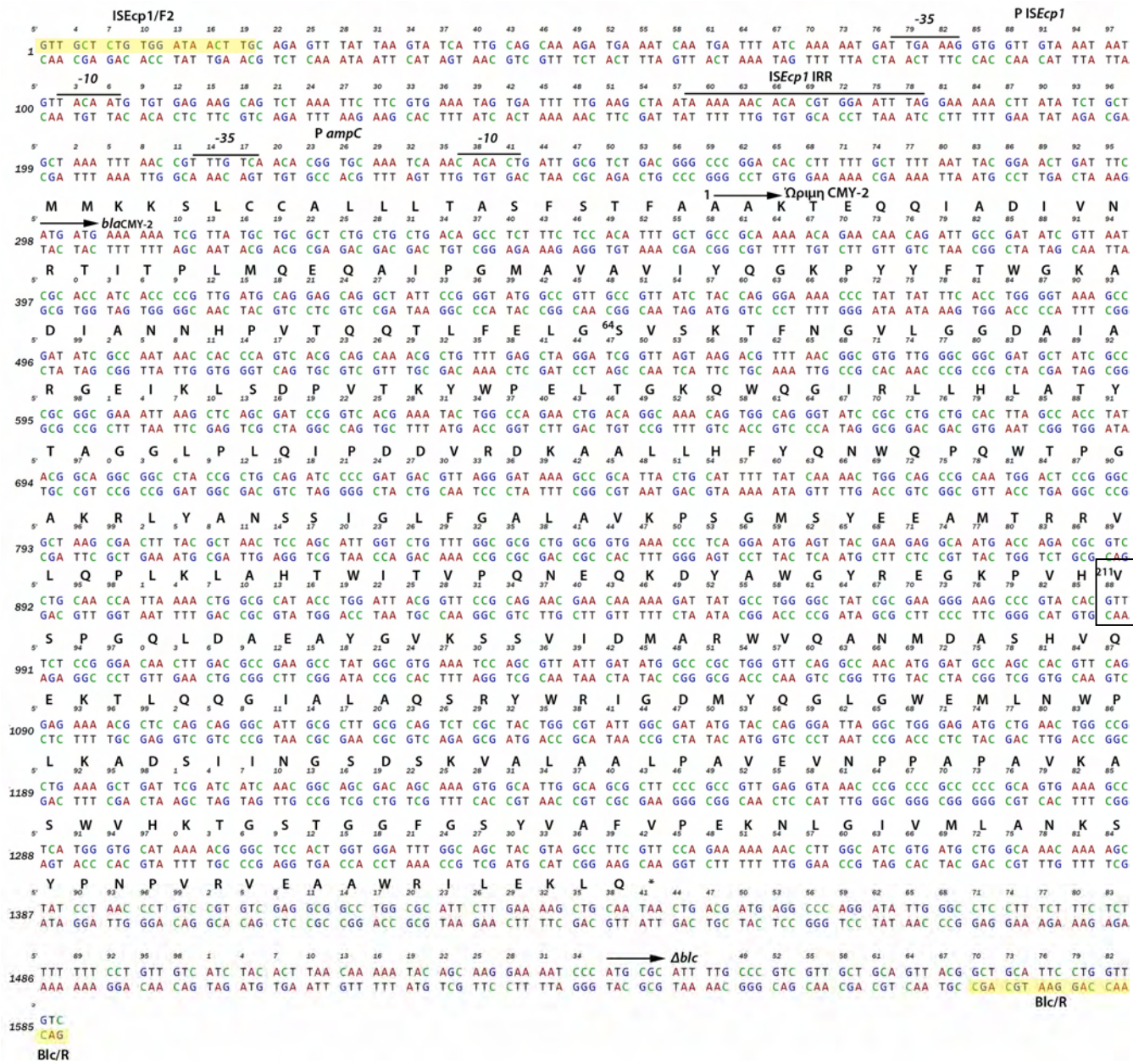
Στην αντίδραση συμπεριλήφθηκαν θετικός μάρτυρας (A1) και αρνητικός (H₂O). 15 μl από την κάθε αντίδραση ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% αγαρόζη για 1 ώρα.

Το ειδικό προϊόν του EC1-00-7490 (1587 bp) απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκε με στήλη (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Απομόνωση του ειδικού προϊόντος της ISEcp1/F-B1c/R PCR.

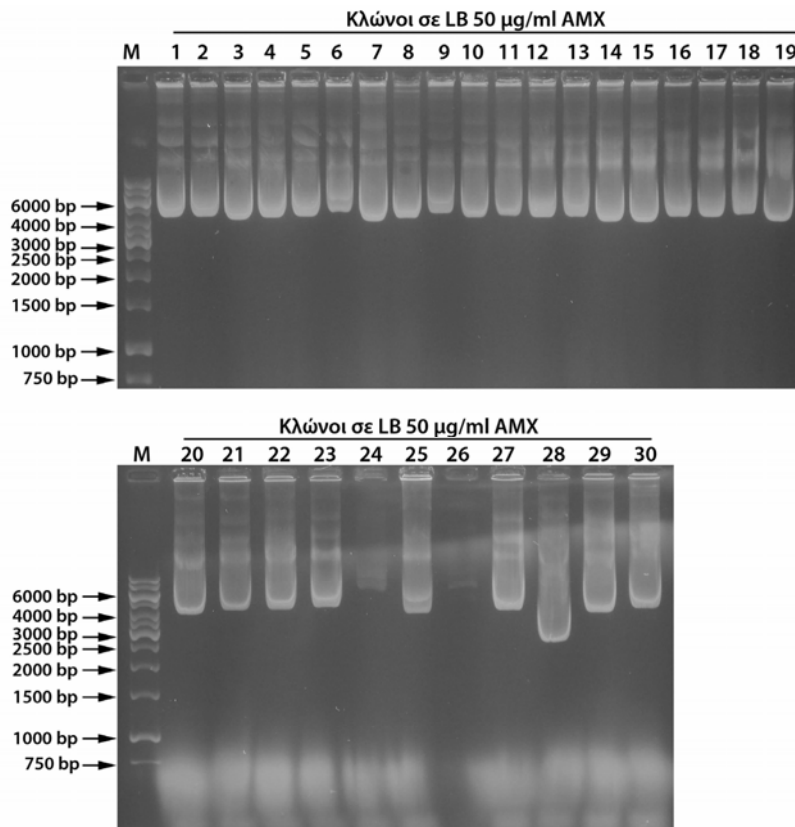
Η αλληλουχία του τμήματος που ενισχύθηκε με την παραπάνω αντίδραση παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.



CMY-30 Gly211
 bla_{CMY-30} 5'-GGT-3'
 CMY-42 Ser211
 bla_{CMY-42} 5'-AGT-3'

Εικόνα 3: Γενετικός τόπος που εκφράζει τη CMY-2 υπό τη δράση του ισχυρού υποκινητή που παρέχεται από το ISEcp1. Η περιοχή αυτή κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό όχημα TOPO PCR11. Φαίνεται επίσης το κωδικόνιο 211 που μεταλλάχθηκε ώστε να προκύψουν τα γονίδια των CMY-30 και CMY-42.

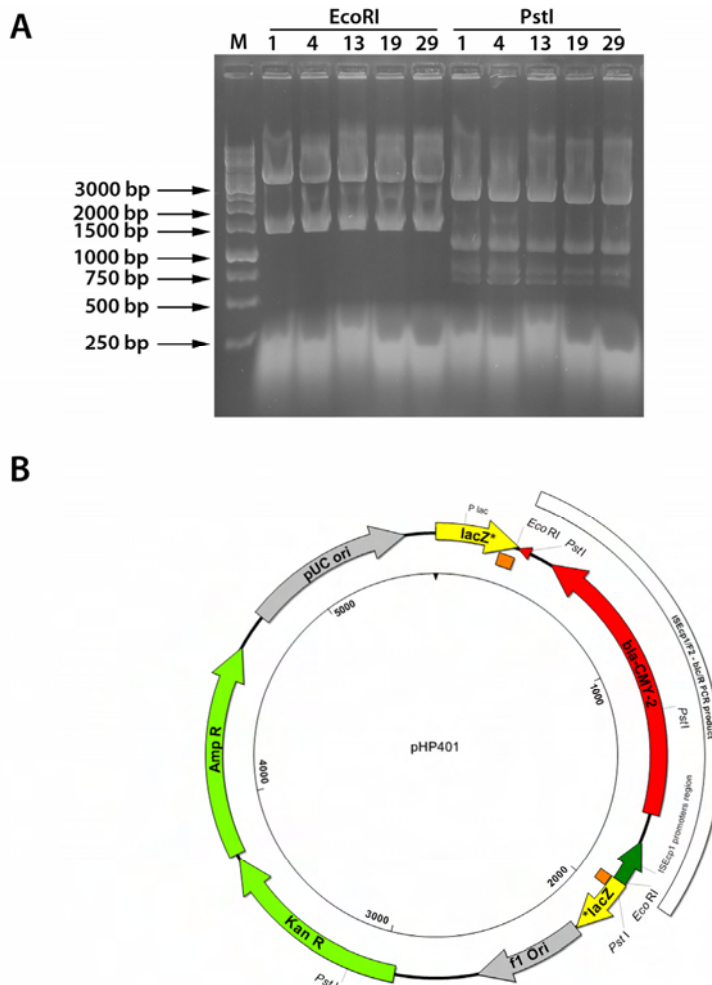
Από την αντίδραση διασύνδεσης στο πλασμιδιακό όχημα TOPO PCRII προέκυψαν περίπου 100 αποικίες ανά τρυβλίο LB με 50 µg/ml αμοξικιλίνη (AMX). Από αυτές 30 ελέγχθηκαν ως προς το πλασμιδιακό τους περιεχόμενο όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.Z.i. Από τις 30 αποικίες οι 27 περιείχαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεγέθους περίπου 5500 bp (3973 bp TOPO PCRII + 1587 bp περιοχή *bla*_{CMY-2}) ενώ ένας μόνο κλώνος έφερε επανακυκλοποιημένο πλασμιδιακό όχημα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ανασυνδυασμένα πλασμίδια TOPO PCRII που περιείχαν την περιοχή έκφρασης της CMY-2 κεφαλοσπορινάσης. Ο κλώνος 28 περιείχε επανακυκλοποιημένο πλασμιδιακό όχημα μεγέθους περίπου 4000 bp.

Οι κλώνοι 1, 4, 13, 19 και 29 χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω μέσω πέψεων με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *PstI* ώστε να εξακριβωθεί το ακριβές μέγεθος της αλληλουχίας που κλωνοποιήθηκε και η κατεύθυνση εισόδου (Εικόνα 5). Όλα τα πλασμίδια έφεραν το αναμενόμενο μέγεθος κλωνοποιημένου τμήματος (Εικόνα 5A) το οποίο είχε εισαχθεί με τη ίδια κατεύθυνση επίσης σε όλα τα παράγωγα με το γονίδιο της

κεφαλοσπορινάσης να εκφράζεται σε αντίθετη φορά με το αντίστοιχο της β-γαλακτοζιδάσης (*lacZ*) (Εικόνα 5B). Επιλέχθηκαν δύο κλώνοι για αλληλούχηση και επιβεβαιώθηκε η ακεραιότητα των κλωνοποιημένων τμημάτων. Ο φαινότυπος ευαισθησίας στα β-λακταμικά αντιβιοτικά του κλώνου pHP401 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που ακολούθησαν περιγράφεται στον Πίνακα 1.



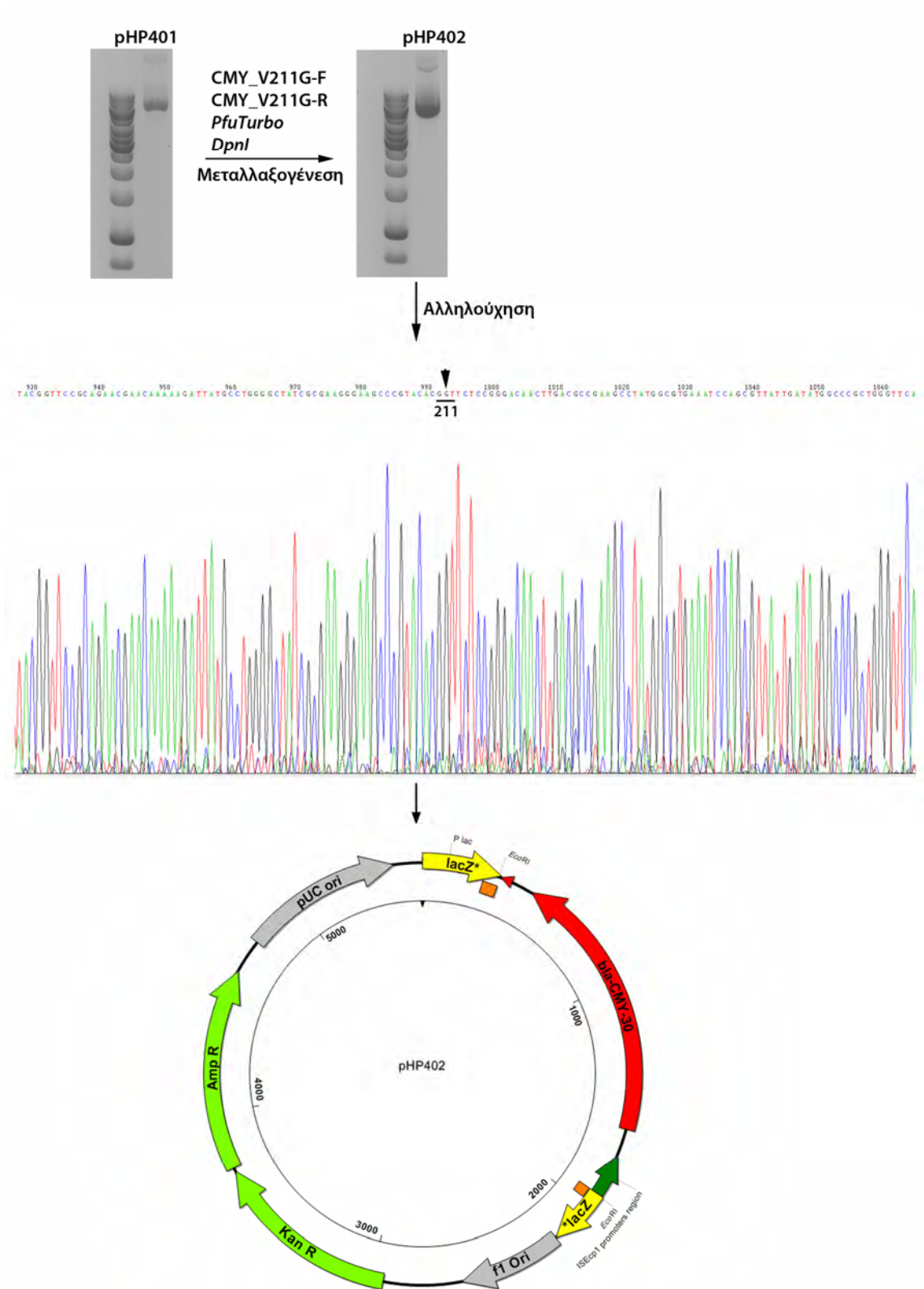
Εικόνα 5: A) Ηλεκτροφορητικό προφίλ προϊόντων πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων TOPO PCRII με τα ένζυμα *EcoRI* και *PstI*. Πέψη με *EcoRI* δημιουργούσε 2 θραύσματα μεγέθους ~4000 bp (TOPO PCRII) και ~1600 bp (κλωνοποιημένο τμήμα) ενώ επίδραση *PstI* παρήγαγε 4 θραύσματα μεγέθους ~2800 bp, 1200 bp, 850 bp και 730 bp. Τα προϊόντα της τελευταίας πέψης δηλώνουν ότι το κλωνοποιημένο τμήμα έχει κατεύθυνση τέτοια ώστε το γονίδιο της *CMY-2* να εκφράζεται με αντίθετη φορά από το *lacZ* (B) εφόσον σε αυτή την περίπτωση πέψη με *PstI* δίνει θραύσματα 2794, 1190, 847 και 728 bp σε αντίθετη κατεύθυνση εισόδου τα αντίστοιχα προϊόντα θα ήταν 3477, 1190, 847 και 46 bp και στην ηλεκτροφόρηση θα φαινόταν 3 ζώνες.

Το πλασμίδιο pHP401 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR ώστε να προκύψει το γονίδιο της CMY-30. Δύο μετασχηματισμένα βακτήρια από τα περίπου 50/τρυβλίο που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία επιλογής ελέγχθηκαν με αλληλούχηση και έφεραν τη μετάλλαξη G αντί T στο δεύτερο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου 211 ενώ ένα από αυτά επιλέχθηκε για τα παρακάτω πειράματα (pHP402, Εικόνα 6). Ο σχετικός φαινότυπος ευαισθησίας στα β-λακταμικά παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

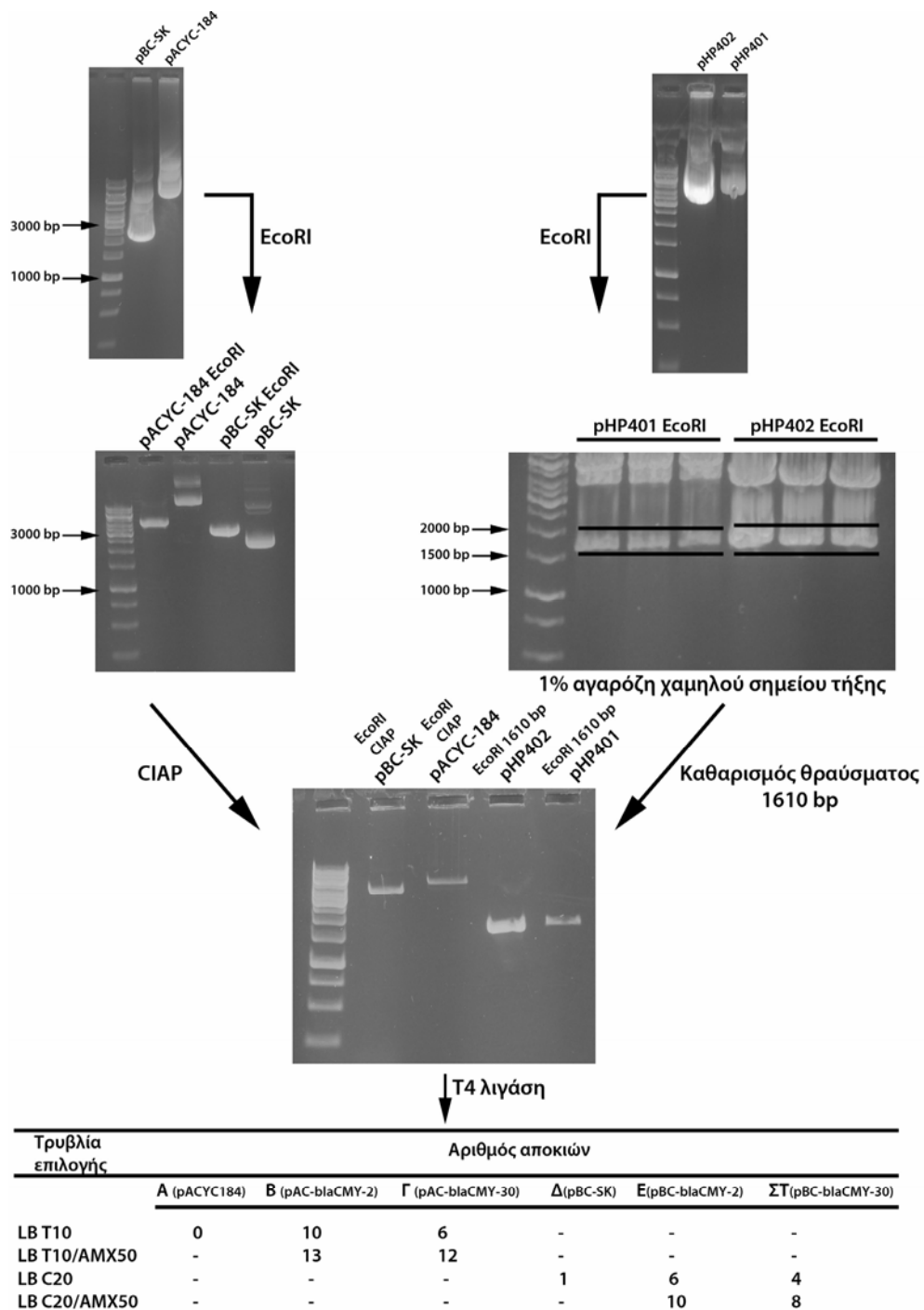
Πίνακας 1: Φαινότυποι ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* DH5a που έφεραν τα TOPO πλασμίδια με τα γονίδια των δύο κεφαλοσπορινασών.

Στέλεχος	Ζώνη αναστολής (mm)												
	AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	CTX	CRO	CAZ	FEP	ATM	FOX	IPM
<i>E. coli</i> DH5a													
pHP401 ^{CMY-2}	0	0	0	0	0	21	12	0	0	30	15	0	30
pHP402 ^{CMY-30}	0	0	0	0	0	22	0	0	0	30	0	0	30

Από τους φαινότυπους ευαισθησίας στα β-λακταμικά παρατηρήθηκε ότι η υποκατάσταση Val211Gly επιδρά στα επίπεδα αντοχής έναντι της κεφοταξίμης και της αζτρεονάμης, δύο μορίων με οξυμίμο πλευρικές αλυσίδες. Όμως εφόσον το πλασμιδιακό όχημα που χρησιμοποιήθηκε φέρει επίσης γονίδιο β-λακταμάσης (το γονίδιο της βΛαΤΑ TEM-1) η οποία υπερπαράγεται καθώς το TOPO PCRII αντιγράφεται σε υψηλούς αριθμούς δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα από τους παραπάνω φαινότυπους. Υποκλωνοποίηση στα πλασμιδιακά οχήματα pACYC184 και pBC-SK αποκάλυψε με μεγαλύτερη ασφάλεια τις όποιες φαινοτυπικές διαφορές που επάγονται από τη Val211Gly υποκατάσταση καθώς τα μόρια αυτά δε φέρουν γονίδιο β-λακταμάσης. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε και περιγράφεται στην ενότητα 2.Z.ii (σελ. 182) παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 6: Μεταλλαξογένεση του *bla*_{CMY-2} στο pHP401 ώστε να προκύψει το *bla*_{CMY-30}. Για τις αντιδράσεις μεταλλαξογένεσης και αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA που είχε απομονωθεί από στήλη.



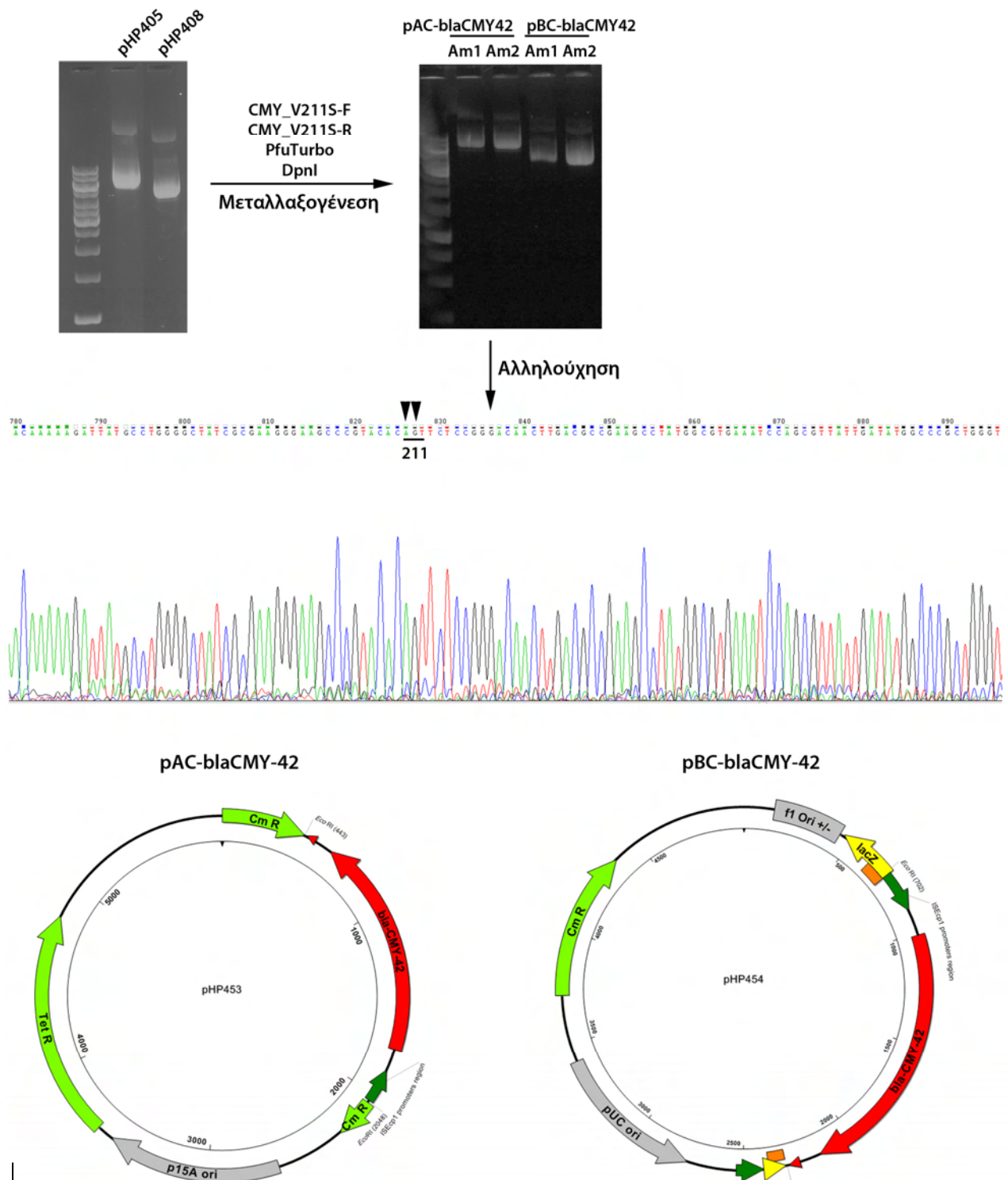
Εικόνα 7: Υποκλωνοποίηση των EcoRI θραυσμάτων των παραγώγων TOPO που φέρουν τους γενετικούς τόπους που εντοπίζονται τα γονίδια *bla_{CMY-2}* και *bla_{CMY-30}* μεγέθους 1610 bp στις αντίστοιχες θέσεις των πλασμιδιακών οχημάτων pACYC184 και pBC-SK. Δίνονται τα αποτελέσματα της επιλογής των μετασηματισμένων κυττάρων με τις αντιδράσεις διασύνδεσης στα κατάλληλα τρυβλία LB άγαρ.

και 3399 bp + 1610 bp = 5009 bp για τα παράγωγα pBC-SK. Εικόνα 8). Η ακεραιότητα και η κατεύθυνση των εισερχομένων τμημάτων επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση. Οι φαινότυποι ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* MC100 που αντέγραφαν τα παραπάνω πλασμίδια και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια της μελέτης δίνονται στον Πίνακα 2.

Τα παράγωγα pAC-bla_{CMY-2} και pBC-bla_{CMY-2} χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρες ώστε να προκύψει το γονίδιο της CMY-42 κεφαλοσπορινάσης με αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR (ενότητα 2.Z.iii, σελ. 183). Αλληλούχηση των μορίων που προέκυψαν από την αντίδραση επιβεβαίωσε την είσοδο των μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 211 που προκαλούν την υποκατάσταση Val211Ser την οποία φέρει η ώριμη CMY-42 σε σύγκριση με την πατρική της CMY-2 (A αντί G στην πρώτη βάση του κωδικονίου και G αντί T στη δεύτερη. Εικόνα 9). Τα επίπεδα αντοχής βακτηρίων *E. coli* MC100 που οφείλονται στην παραγωγή της CMY-42 όταν αυτή εκφράζεται από τα δύο είδη πλασμιδίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Φαινότυποι ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* MC100 που έφεραν τα pACYC184 και pBC-SK παράγωγα ανασυνδυασμένα με τους γενετικούς τόπους των bla_{CMY-2} bla_{CMY-30} και bla_{CMY-42}.

Στέλεχος	Ζώνη αναστολής (mm)												
	AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	CTX	CRO	CAZ	FEP	ATM	FOX	IPM
<i>E. coli</i> MC100													
pHP405 ^{CMY-2} (pAC-bla _{CMY-2})	0	0	0	0	10	25	20	15	0	30	20	0	30
pHP407 ^{CMY-30} (pAC-bla _{CMY-30})	0	0	0	0	10	25	10	10	0	30	10	0	30
pHP453 ^{CMY-42} (pAC-bla _{CMY-42})	0	0	0	0	10	24	10	10	0	30	15	0	30
pHP408 ^{CMY-2} (pBC-bla _{CMY-2})	0	0	0	0	10	20	17	10	0	30	20	0	30
pHP410 ^{CMY-30} (pBC-bla _{CMY-30})	0	0	0	0	10	20	0	0	0	30	0	0	30
pHP454 ^{CMY-42} (pBC-bla _{CMY-42})	0	0	0	0	10	20	0	0	0	30	10	0	30



Εικόνα 9: Πειράματα μεταλλαξογένεσης ώστε να προκύψει το γονίδιο της CMY-42 παραγόμενο υπό ισογονικές συνθήκες με τα αντίστοιχα των CMY-2 και CMY-30. Τα πλασμιδιακά παρασκευάσματα είχαν απομονωθεί με στήλη. Φαίνεται αντιπροσωπευτικό ηλεκτροχρωματογράφημα της περιοχής του κωδικονίου 211 και οι δύο μεταλλαγμένες βάσεις αυτού.

Η παραγωγή των τριών κεφαλοσπορινασών από τα έξι παραπάνω στελέχη επιβεβαιώθηκε με αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση (ενότητα Θ, σελίδα 189). Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των τριών ενζύμων εντοπίζονταν στην περιοχή >9,2. Με την παραπάνω διαδικασία κλωνοποίησης οι ποικιλίες των β-λακταμασών τάξης C που έφεραν βαλίνη, γλυκίνη ή σερίνη στην κατά Ambler θέση 211 παράγονταν υπό ισογονικές συνθήκες. Από τους φαινοτύπους ευαισθησίας προέκυψε ότι οι υποκαταστάσεις Val211Gly (CMY-30) και Val211Ser (CMY-42) αυξάνουν τα επίπεδα αντοχής έναντι των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς και της αζτρεονάμης. Η ποσοτική εκτίμηση του βαθμού αύξησης των επιπέδων αντοχής έγινε με προσδιορισμό των ελαχίστων συγκεντρώσεων αναστολής.

ii. Φαινοτυπικές επιδράσεις των υποκαταστάσεων Val211Gly και Val211Ser στις β-λακταμάσες τύπου CMY-2 ως προς την ευαισθησία σε β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Ο προσδιορισμός των MIC που εμφάνιζαν τα β-λακταμικά κατά την αναστολή των κλώνων *E. coli* MC100 που παρήγαγαν τις ποικιλίες της θέσης 211 (Πίνακας 3) με τη μέθοδο E-test έδειξε ότι παρουσία γλυκίνης ή σερίνης στην συγκεκριμένη θέση οδηγεί σε αυξημένη αντοχή έναντι της κεφοταξίμης, της κεφταζιδίμης και της αζτρεονάμης. Συγκεκριμένα η Val211Gly υποκατάσταση οδηγεί σε περισσότερο από 4 φορές αύξηση στην MIC της κεφταζιδίμης ενώ ανάλογη ήταν και η αύξηση που παρατηρήθηκε στις τιμές MIC της κεφοταξίμης και της αζτρεονάμης (6 φορές αύξηση). Παρόμοια ήταν και η επίδραση της Val211Ser υποκατάστασης, με τη CMY-42 να εμφανίζει αυξημένη αντοχή έναντι της κεφταζιδίμης (>4 φορές αύξηση στην MIC), της κεφοταξίμης (8 φορές αύξηση) και της αζτρεονάμης (3 φορές αύξηση) σε σχέση με τη CMY-2. Τα στελέχη που παρήγαγαν τις CMY-30 και CMY-42 παρέμεναν ανθεκτικά στις πενικιλίνες, στους συνδυασμούς τους με τους αναστολείς αυτοκτονίας και στις κεφαμυκίνες. Παρατηρήθηκε μικρή πτώση στη MIC της πιπερακιλλίνης έναντι του στελέχους που παρήγαγε τη CMY-30 αλλά αυτή αντιστοιχούσε σε μία αραίωση και άρα ήταν μη εκτιμήσιμη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω κατηγορίες αντιβιοτικών (εκτός από την πιπερακιλλίνη και τον συνδυασμό με την ταζοβακτάμη) δεν επέτρεπαν τον προσδιορισμό ενδεχόμενων διαφορών μεταξύ των τριών ενζύμων καθώς

οι MIC τις ξεπερνούσαν. Η ευαισθησία έναντι της κεφεπίμης και της μιπενέμης δεν επηρεάζονταν από τη φύση του αμινοξέος στη θέση 211.

Πίνακας 3. Τιμές MIC (μg/ml) β-λακταμικών αντιβιοτικών για κλώνους *E. coli* που παράγαν τις διάφορες ποικιλίες CMY β-λακταμασών υπό ισογονικές συνθήκες.

Αντιβιοτικό	<i>E. coli</i> pHP405 (Val211)	<i>E. coli</i> pHP407 (Gly211)	<i>E. coli</i> pHP453 (Ser211)	<i>E. coli</i> MC100 (-)
Ampicillin	≥512	≥512	≥512	2
Amoxicillin-CLA ^a		≥512	≥512	≥512
Ticarcillin	≥512	≥512	≥512	4
Ticarcillin-CLA ^a	≥512	≥512	≥512	4
Piperacillin	128	64	128	2
Piperacillin-TAZ ^a	16	16	16	1
Cefoxitin	≥512	≥512	≥512	2
Ceftazidime	128	≥512	≥512	0.12
Cefotaxime	32	192	256	0.032
Cefepime	0.50	0.5	0.75	0.064
Aztreonam	16	96	48	0.032
Imipenem	0.5	0.5	0.5	0.008

^a Στους συνδυασμούς αυτούς το κλαβουλανικό οξύ είχε σταθερή συγκέντρωση 4 μg/ml και η ταζοβακτάμη 8 μg/ml

iii. Καθαρισμός των ενζύμων CMY-2, CMY-30 και CMY-42

Ακολουθώντας τα στάδια καθαρισμού που περιγράφονται στην ενότητα 2.I.ii (σελ. 198) ανακτήθηκαν χρωματογραφήματα που είχαν τη μορφή της εικόνας 10A. Οι κεφαλοσπορινάσες δεν δεσμεύτηκαν στον ανταλλάκτη ανιόντων Q σε pH 8. Με αλλαγή του pH σε 7 στο παρασκεύασμα που συλλέχθηκε στην έξοδο της υγρής φάσης κατά τα στάδια φόρτωσης και πλύσης ήταν δυνατή η δέσμευση των ενζύμων στον ανταλλάκτη κατιόντων S από όπου εκλούσθηκαν με 80 - 150 mM NaCl. Η κλασμάτωση των τριών ενζύμων με τον παραπάνω τρόπο οδήγησε στην απομόνωση ομογενών παρασκευασμάτων υψηλής συγκέντρωσης και καθαρότητας (Εικόνα 10B, Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά ομογενών παρασκευασμάτων των ποικιλιών CMY.

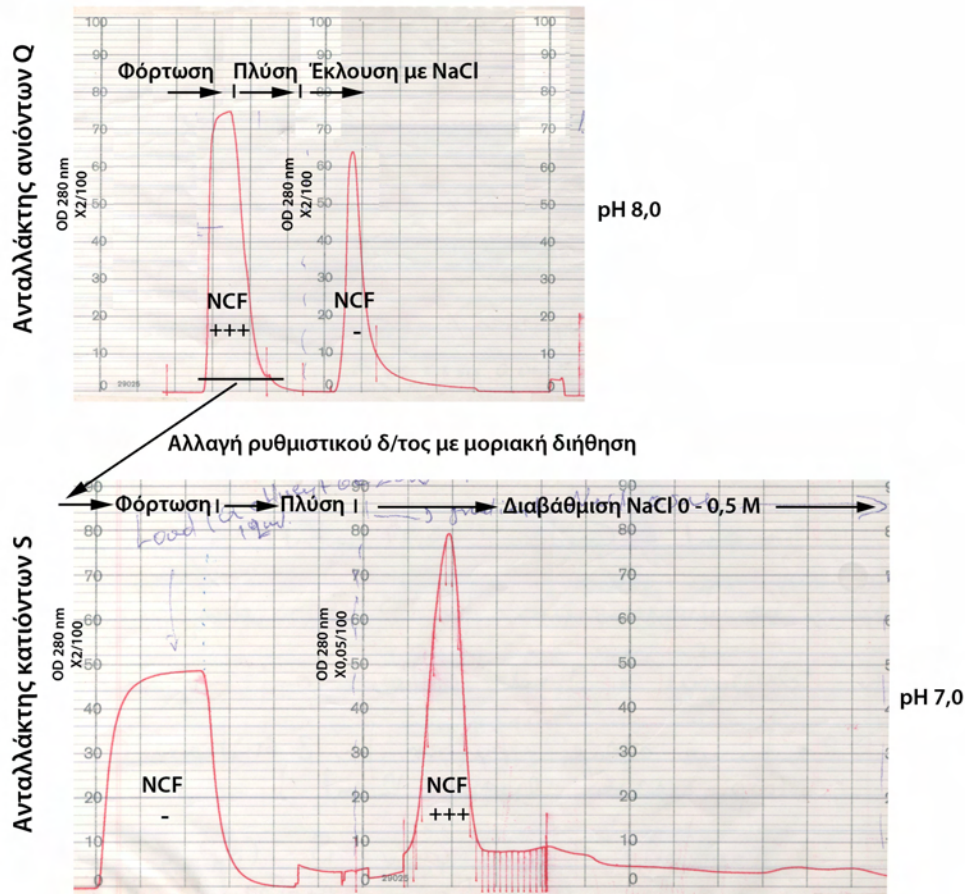
Ένζυμο	Καθαρότητα	^a Ολική πρωτεϊνική περιεκτικότητα (μg/ml)	[CMY] (μg/ml)	^b MM (g/mol)	[CMY] (μM)
CMY-2	92 %	30 - 130	27,6 - 119,6	39854.6	0,693 - 3,00
CMY-30	92 %	15 - 110	13,8 - 101,2	39812.5	0,347 - 2,54
CMY-42	95 %	20 - 100	19 - 95	39842.6	0,477 - 2,38

^a Εύρος συγκεντρώσεων των απομονωθέντων κλασμάτων όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford

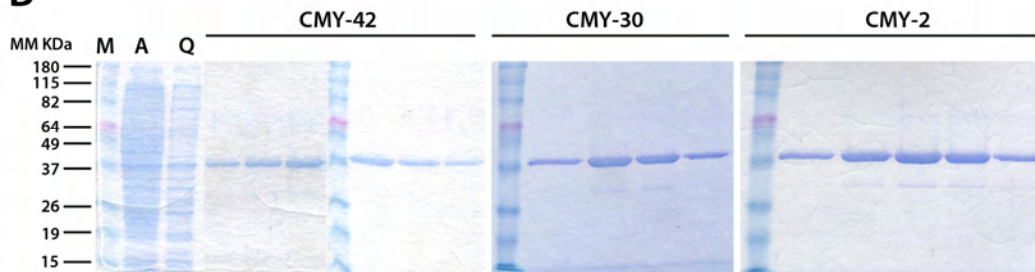
^b Μοριακές μάζες ώριμων πρωτεϊνών. Η επιβεβαίωση των μοριακών μαζών των CMY στα καθαρά παρασκευάσματα έγινε με φασματοσκοπία μάζας από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Η περιεκτικότητα των τελικών παρασκευασμάτων ήταν κατάλληλη για τα πειράματα υδρολύσεων και αναστολών. Όμως για τα πειράματα θερμικής αποδιάταξης απαιτούνταν υψηλότερη πυκνότητα ενζύμων. Έτσι τα παρασκευάσματα με την υψηλότερη συγκέντρωση συμπυκνώθηκαν κατά 2 φορές με υπεριδίηση χρησιμοποιώντας φυγοκεντρικούς σωλήνες με όριο διαχωρισμού 5000 Da. Τα συμπυκνωμένα παρασκευάσματα διατηρούσαν την καθαρότητά τους σε επίπεδα πάνω από 90 %.

A



B



Εικόνα 10: A) Τυπικά χρωματογραφήματα της διαδικασίας καθαρισμού των ενζύμων CMY-2, CMY-30 και CMY-42. Οι καταγραφές αφορούν την οπτική πυκνότητα στα 280 nm στην έξοδο της κάθε στήλης η οποία απεικονίζεται ως εκατοστιαία κλίμακα 2 ή 0,05 μονάδων απορρόφησης. Η παρουσία των κεφαλοσπορινασών στα εξερχόμενα κλάσματα εξακριβώνονταν με δοκιμή νιτροσεφίνης (NCF). Κατά την έκλουση από την στήλη S συλλέγονταν κλάσματα 1 ml. B) Ανάλυση SDS-PAGE των παρασκευασμάτων που προέκυψαν κατά τα στάδια καθαρισμού. M: μάρτυρας πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας, A: Πρωτεϊνικό προφίλ αρχικού παρασκευάσματος που φορτώθηκε στην στήλη Q (10 mg/ml), Q: Σύσταση του παρασκευάσματος που συλλέχθηκε κατά την φόρτωση και πλύση της στήλης Q και περιείχε τις CMY. Στη συνέχεια ακολουθούν τα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά την έκλουση της S για τις CMY-42, CMY-30 και CMY-2. Τα κλάσματα με θετική δοκιμή νιτροσεφίνης είχαν ενωθεί ανά 3 ή 4.

iv. Χαρακτηρισμός βιοχημικών ιδιοτήτων των ενζύμων τύπου CMY-2

α. Φάσμα υποστρωμάτων

Μερικώς κεκαθαυμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα βακτήρια που παρήγαγαν τα ένζυμα CMY χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αρχικών ταχυτήτων υδρόλυσης β-λακταμικών υποστρωμάτων έτσι ώστε να χαρτογραφηθεί των υδρολυτικό τους προφίλ πριν προσδιοριστούν οι κινητικές σταθερές υδρόλυσης. Ο προσδιορισμός των ειδικών ενεργοτήτων των παρασκευασμάτων αυτών (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.Κ.ii) έδειξε ότι οι ποικιλίες με γλυκίνη ή σερίνη στη θέση 211 υδρολύουν οξυίμινο υποστρώματα όπως η κεφοταξίμη και η κεφταζιδίμη εν αντιθέσει με τη CMY-2 που εμφάνιζε πολύ χαμηλή ικανότητα υδρόλυσης (Πίνακας 5). Η υδρόλυση κεφεπίμης ήταν πολύ χαμηλή και στις τρεις περιπτώσεις. Οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς κεφαλοθίνη και νιτροσεφίνη υδρολύονταν από τα τρία ένζυμα με ταχείς ρυθμούς με τις CMY-30 και CMY-42 να παρουσιάζουν ελαφρώς μειωμένη ενεργότητα. Ειδικότερα, η CMY-30 απενεργοποιούσε τη νιτροσεφίνη σχετικά αργά συγκρινόμενη με τα άλλα δύο ένζυμα ενώ οι καμπύλες παρακολούθησης αύξησης της απορρόφησης στα 482 nm έδειξαν ότι η αντίδραση χαρακτηρίζεται από τουλάχιστον 3 φάσεις (ένα αρχικό γρήγορο τμήμα, στη συνέχεια ένα αργό ενώ στο τέλος του χρονικού διαστήματος μέτρησης ανακτούσε ταχύτητα ίδιων επιπέδων με την αρχική). Η βενζυλπενικιλίνη υδρολύονταν επίσης σε υψηλά επίπεδα και από τα τρία ένζυμα.

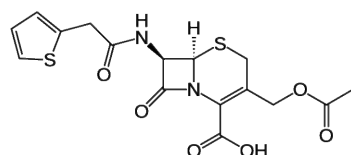
Πίνακας 5: Υδρολυτικό προφίλ των τριών ποικιλιών CMY

Υπόστρωμα	Ειδική ενεργότητα nmol/min/mg ολικής πρωτεΐνης		
	CMY-2 (Val211)	CMY-30 (Gly211)	CMY-42 (Ser211)
Πενικιλίνη G (400 μM)	2259 (72) ^a	1706 (79)	1815 (72)
Κεφαλοθίνη (100 μM)	3125 (100)	2166 (100)	2756 (100)
Νιτροσεφίνη (100 μM)	3541 (113)	1438 (66)	3100 (112)
Κεφοταξίμη (50 μM)	<10 (<0,1)	126 (6)	88 (3)
Κεφταζιδίμη (40 μM)	<10 (<0,1)	105 (5)	152 (7)
Κεφεπίμη (40 μM)	<10 (<0,1)	<10 (<0,1)	<10 (<0,1)

^a Στις παρενθέσεις δίνονται οι σχετικές ενεργότητες ως προς την υδρόλυση κεφαλοθίνης σε ποσοστά %

β. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης

1. Κεφαλοθίνη

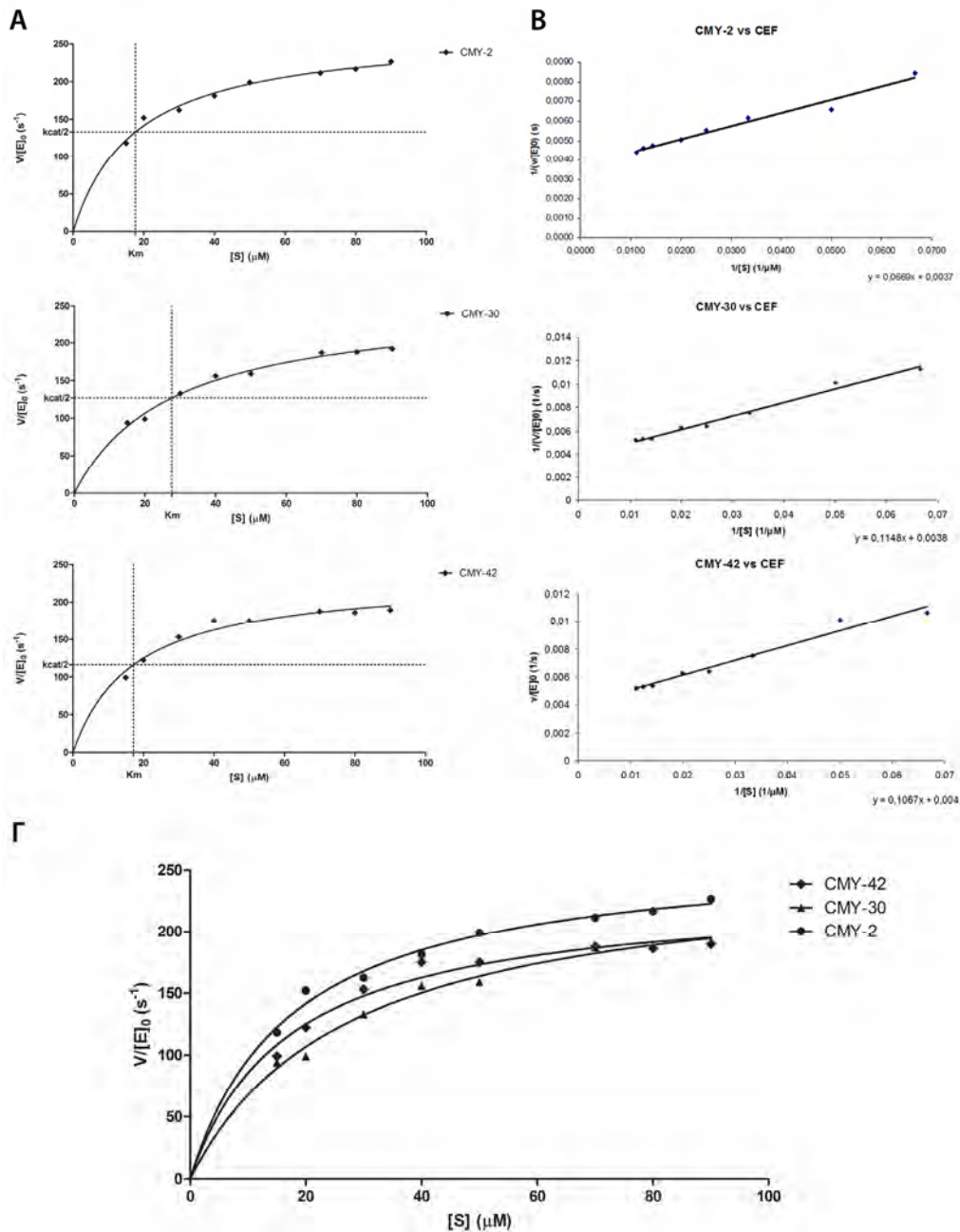


Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών υδρόλυσης της κεφαλοθίνης έλαβε χώρα εκτιμώντας τις αρχικές ταχύτητες καταστροφής του β-λακταμικού δακτυλίου στις συγκεντρώσεις που δίνονται στον Πίνακα 6 χρησιμοποιώντας ποσότητες ενζύμων που επίσης δίνονται στον ίδιο πίνακα μέσω της εξίσωσης *Michaelis-Menten* (ενότητα 2.Κ.iii). Οι προσδιορισμοί για κάθε ένζυμο επαναλήφθηκαν 3 φορές σε ανεξάρτητα πειράματα. Τα τρία ένζυμα υδρόλυαν την κεφαλοθίνη με υψηλούς ρυθμούς ανακύκλωσης (k_{cat}) ενώ η φαινόμενη συγγένεια που παρουσίαζαν για τις ρίζες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (K_m) ήταν εντός του εύρους συγκεντρώσεων κεφαλοθίνης που μπορούσαν να μετρηθούν με φασματοφωτομετρία υπεριώδους (Πίνακας 6, Εικόνα 11). Η υποκατάσταση Val211Gly επηρέαζε την K_m του ενζύμου προκαλώντας 1,5 φορές αύξηση ενώ η k_{cat} δεν επηρεάζονταν σημαντικά. Αντίθετα, η Val211Ser δεν επιδρούσε στην φαινόμενη συγγένεια αλλά προκαλούσε μείωση στην ταχύτητα κατάλυσης η οποία όμως δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Οι σταθερές ειδικότητας των τριών ενζύμων (k_{cat}/K_m) κατά την υδρόλυση κεφαλοθίνης δεν μεταβάλλονταν σημαντικά ενώ προσέγγιζαν το όριο της διάχυσης (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης κεφαλοθίνης στην κατάσταση ισορροπίας^a

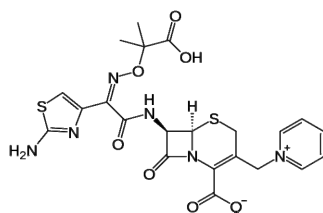
Ένζυμο	[E] (μM)	[CEF] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
CMY-2 ^{Val211}	0,2-0,3·10 ⁻³	15 - 90	267 ± 10	17 ± 3	16·10 ⁶
CMY-30 ^{Gly211}	0,2-0,3·10 ⁻³	15 - 90	256 ± 14	26 ± 4	10·10 ⁶
CMY-42 ^{Ser211}	0,2-0,3·10 ⁻³	15 - 90	225±26	16.2±2	14·10 ⁶

^a Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.

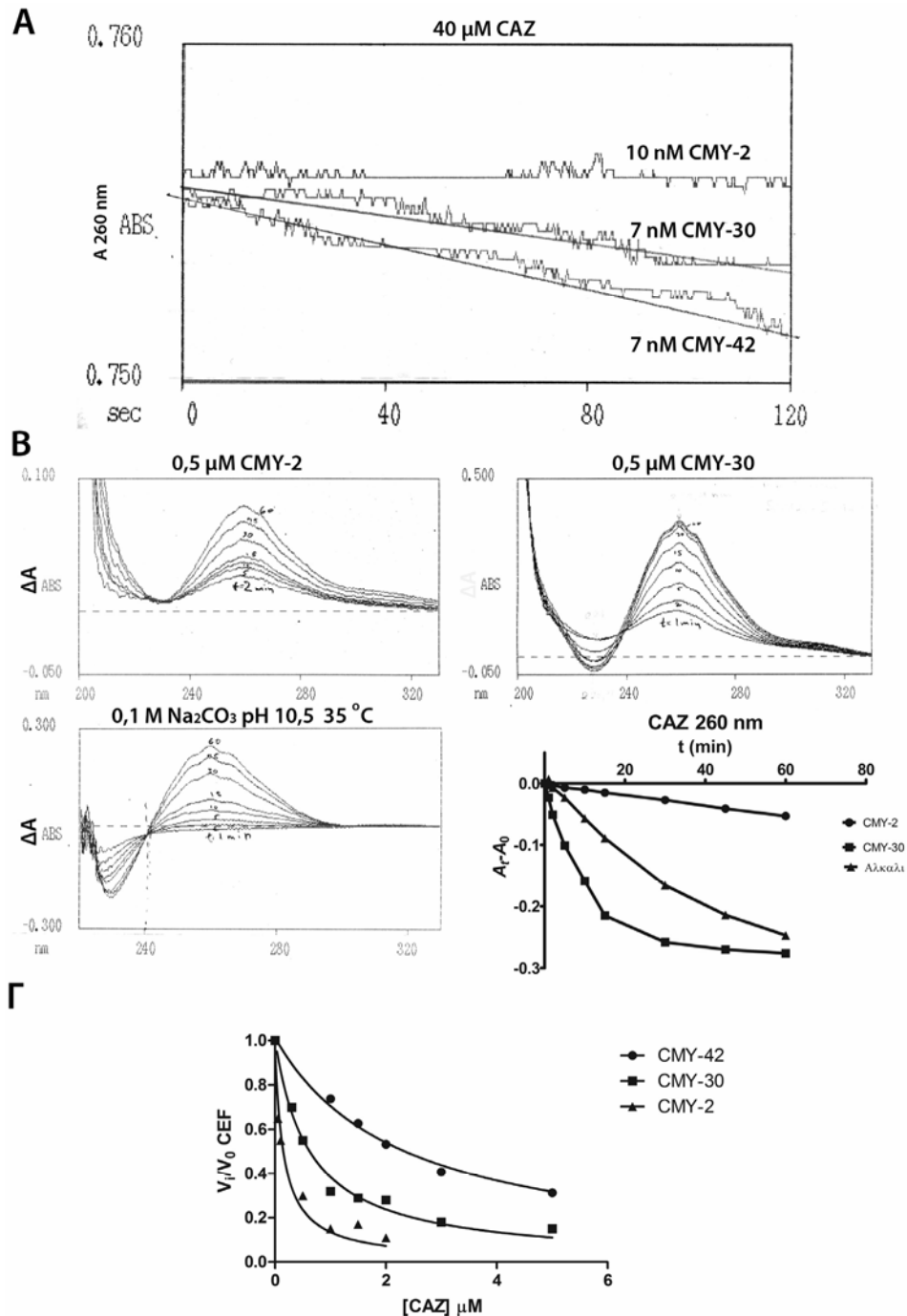


Εικόνα 11: Α) Μεταβολή των μονάδων αρχικής ταχύτητας ως προς την συγκέντρωση κεφαλοθίνης που προσδιορίστηκαν κατά την υδρόλυσή της από τις 3 CMY. Οι καμπύλες προέκυψαν με μη-γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση *Michaelis-Menten*. Σε κάθε γράφημα σημειώνεται η συγκέντρωση υποστρώματος όπου οι αρχικές μονάδες ταχύτητας αντιστοιχούν στη μισή τιμή της σταθεράς κατάλυσης. Η συγκέντρωση αυτή είναι η K_m . Β) Γραφήματα που προέκυψαν από την ευθυγραμμοποίηση των δεδομένων σύμφωνα με την τεχνική *Lineweaver-Burk*. Γ) Συγκριτικό γράφημα όπου διακρίνεται η σχετική ομοιότητα των ιδιοτήτων των τριών ενζύμων κατά την υδρόλυση κεφαλοθίνης.

2. Κεφαταζιδίμη (CAZ)



Οι CMY-30 και CMY-42 εμφάνιζαν αυξημένη υδρολυτική ικανότητα έναντι αυτής της κεφαλοσπορίνης τρίτης γενεάς σε σχέση με την CMY-2 (Εικόνα 12Α). Το ένζυμο με σερίνη στην θέση 211 παρουσίαζε αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης κατά 30%-40% έναντι της ποικιλίας με γλυκίνη στη θέση αυτή. Η CMY-2 παρουσίαζε πολύ μικρή ενεργότητα η οποία ήταν δυνατόν να μετρηθεί μόνο χρησιμοποιώντας υψηλή συγκέντρωση ενζύμου και παρακολουθώντας την πτώση της απορρόφησης για διάστημα 1 ώρας στα 260 nm (Εικόνα 12Β). Μετρώντας την πτώση της απορρόφησης που προκαλούνταν από την ίδια ποσότητα CMY-30 για το αυτό χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε ότι η υδρόλυση της κεφαταζιδίμης έτεινε προς ολοκλήρωση λόγω της κατανάλωσης του υποστρώματος (εικόνα 12Β). Στις συγκεντρώσεις υποστρώματος που μπορούσαν να μετρηθούν δεν παρατηρούνταν αλλαγή στις αρχικές ταχύτητες. Άρα, το ενεργό κέντρο ήταν κορεσμένο με υπόστρωμα και τα ένζυμα χαρακτηρίζονταν από χαμηλές K_m . Οι αρχικές ταχύτητες που προσδιορίστηκαν στις παραπάνω συνθήκες κορεσμού αντιστοιχούσαν στη μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης και άρα οι μονάδες $v/[E]_0$ στον ρυθμό κατάλυσης (k_{cat}). Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι οι CMY-30 και CMY-42 εμφάνιζαν αυξημένες k_{cat} τουλάχιστον κατά 35 και 50 φορές αντίστοιχα σε σχέση με την CMY-2 (Πίνακας 7). Εφόσον το περιοριστικό στάδιο κατά την υδρόλυση της κεφαταζιδίμης και των άλλων κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς από τις AmpC είναι η απαकुλίωση, οι αυξημένοι ρυθμοί κατάλυσης οφείλονται πιθανότατα στην αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης του εστέρα στο στάδιο του ακύλ-ενζύμου. Το σταθερό ομοιοπολικό σύμπλοκο που δημιουργεί η κεφαταζιδίμη με τις βΛτC ουσιαστικά απενεργοποιεί το ένζυμο και σε πειράματα ανταγωνισμού όπου παρακολουθούνταν η υδρόλυση κεφαλοθίνης υπολογίστηκαν σχετικά χαμηλές σταθερές αναστολής (K_i) που δίνουν μία προσέγγιση της φαινόμενης συγγένειας K_m (Πίνακας 7, Εικόνα 2Γ). Παρατηρήθηκε ότι τα ένζυμα CMY-30 και CMY-42 χαρακτηρίζονταν από μειωμένη συγγένεια για το υπόστρωμα αυτό κατά 7 και 15 φορές αντίστοιχα σε σχέση με την CMY-2.



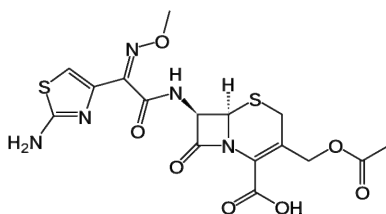
Εικόνα 12: Α) Υδρόλυση 40 μM κεφαταζιδίμης από σχετικά χαμηλές ποσότητες ενζύμων ώστε να προσδιοριστούν οι αρχικές ταχύτητες στην κατάσταση ισορροπίας. Β) Παρακολούθηση μεταβολής του φάσματος UV 50 μM κεφαταζιδίμης παρουσία 0,5 μM CMY-2 και CMY-30 στους 25 $^\circ\text{C}$ σε pH 7 και σε αλκαλικό διάλυμα pH 10,5 στους 35 $^\circ\text{C}$ για διάστημα 1 ώρας. Διακρίνεται η μικρή ταχύτητα υδρόλυσης από την CMY-2 και η τυπική εικόνα καταστροφής του υποστρώματος σε ενζυμικές αντιδράσεις από τη CMY-30. Γ) Βαθμός αναστολής που προκαλούνταν από αυξανόμενες συγκεντρώσεις κεφαταζιδίμης κατά την υδρόλυση κεφαλοθίνης. Οι καμπύλες έχουν προκύψει με συσχέτιση των δεδομένων στην εξίσωση Morrison από όπου προσδιορίστηκαν οι K_i .

Πίνακας 7: Κινητικές σταθερές αλληλεπιδράσεων με την κεφαταξιδίμη

Ένζυμο	[E] (μM)	[CAZ] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
CMY-2 ^{Val211}	10-500·10 ⁻³	20 - 50	≤0.01	0.02±0.003	≤0.5·10 ⁶
CMY-30 ^{Gly211}	5-7·10 ⁻³	20 - 50	0.35 ± 0.05	0.14±0.02	2.5·10 ⁶
CMY-42 ^{Ser211}	5-7·10 ⁻³	20 - 50	0.50±0.02	0.30±0.08	1.7·10 ⁶

^a Μετρήθηκαν ως σταθερές αναστολής K_i

3. Κεφοταξίμη (CTX)

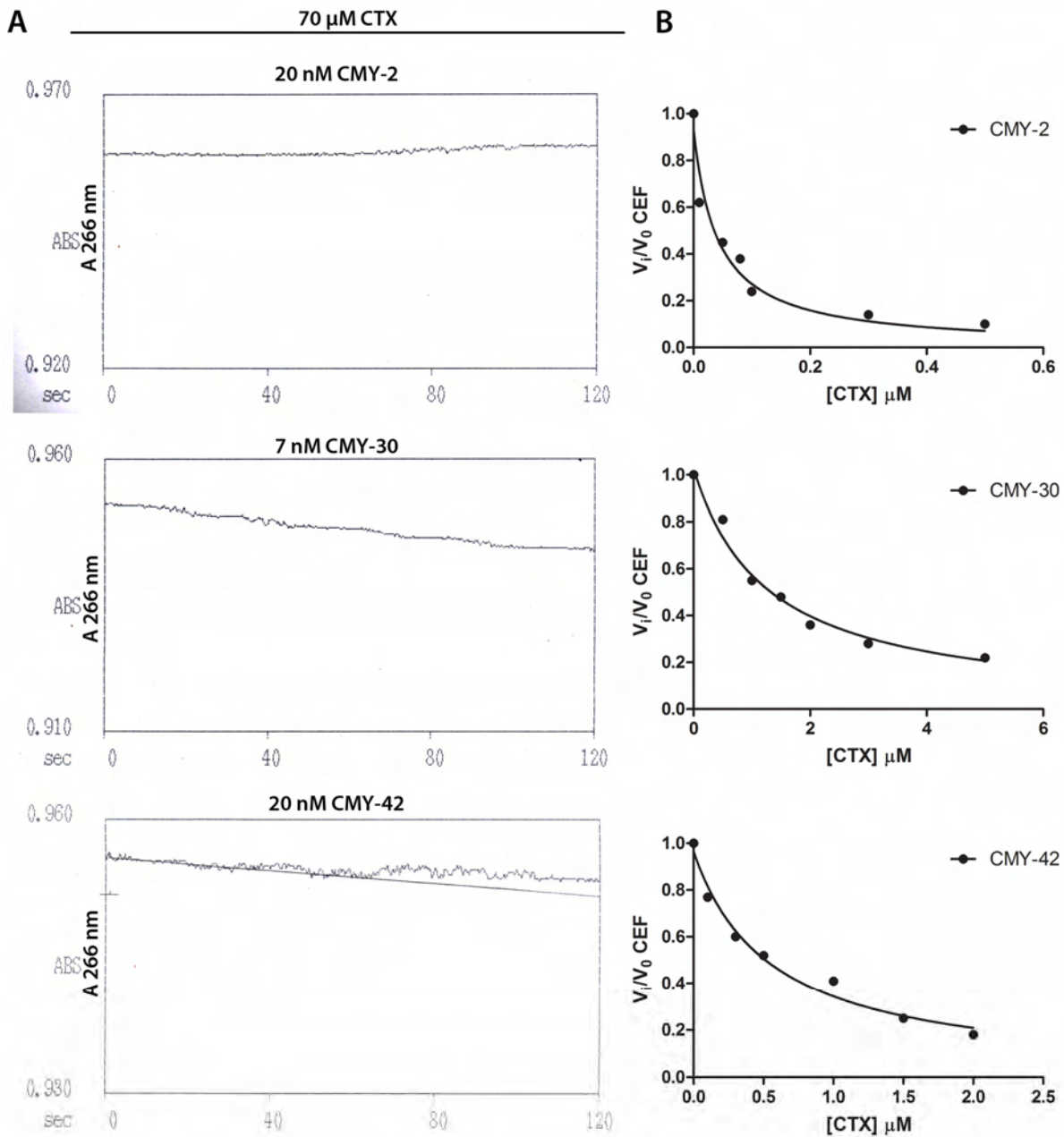


Τα τρία ένζυμα κατά την αλληλεπίδραση με την κεφοταξίμη παρουσίαζαν την ίδια συμπεριφορά με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την απενεργοποίηση της κεφαταξιδίμης. Σε αυτή την περίπτωση όμως το ένζυμο με γλυκίνη στην θέση 211 εμφάνιζε την υψηλότερη ενεργότητα και χαρακτηρίζονταν από υψηλή ταχύτητα υδρόλυσης της τάξης των 1,7 s⁻¹ αυξημένη πάνω από 170 φορές σε σχέση με την αντίστοιχη της ποικιλίας βαλίνης (Πίνακας 8, Εικόνα 13). Όταν το κατάλοιπο 211 ήταν σερίνη η ταχύτητα υδρόλυσης αυξάνονταν μεν (>20 φορές σε σχέση με τη CMY-2) αλλά όχι στα επίπεδα που παρατηρήθηκαν για τη CMY-30 (Πίνακας 8, Εικόνα 13Α). Η συγγένεια των ενζύμων που υδρόλυαν το υπόστρωμα ήταν μειωμένη σε σχέση με το πατρικό ένζυμο με τις K_i των CMY-30 και CMY-42 να είναι αυξημένες κατά 60 και 16 φορές αντίστοιχα (πίνακας 8, εικόνα 13).

Πίνακας 8: Κινητικές σταθερές αλληλεπιδράσεων με την κεφοταξίμη

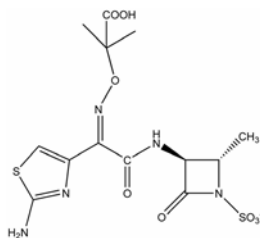
Ένζυμο	[E] (μM)	[CTX] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
CMY-2 ^{Val211}	20·10 ⁻³	20 - 70	<0.01	0.005±0.001	<2·10 ⁶
CMY-30 ^{Gly211}	7·10 ⁻³	20 - 70	1.7±0.1	0.30±0.02	5.7·10 ⁶
CMY-42 ^{Ser211}	20·10 ⁻³	20 - 70	0.20±0.03	0.08±0.03	2.5·10 ⁶

^a Μετρήθηκαν ως σταθερές αναστολής K_i

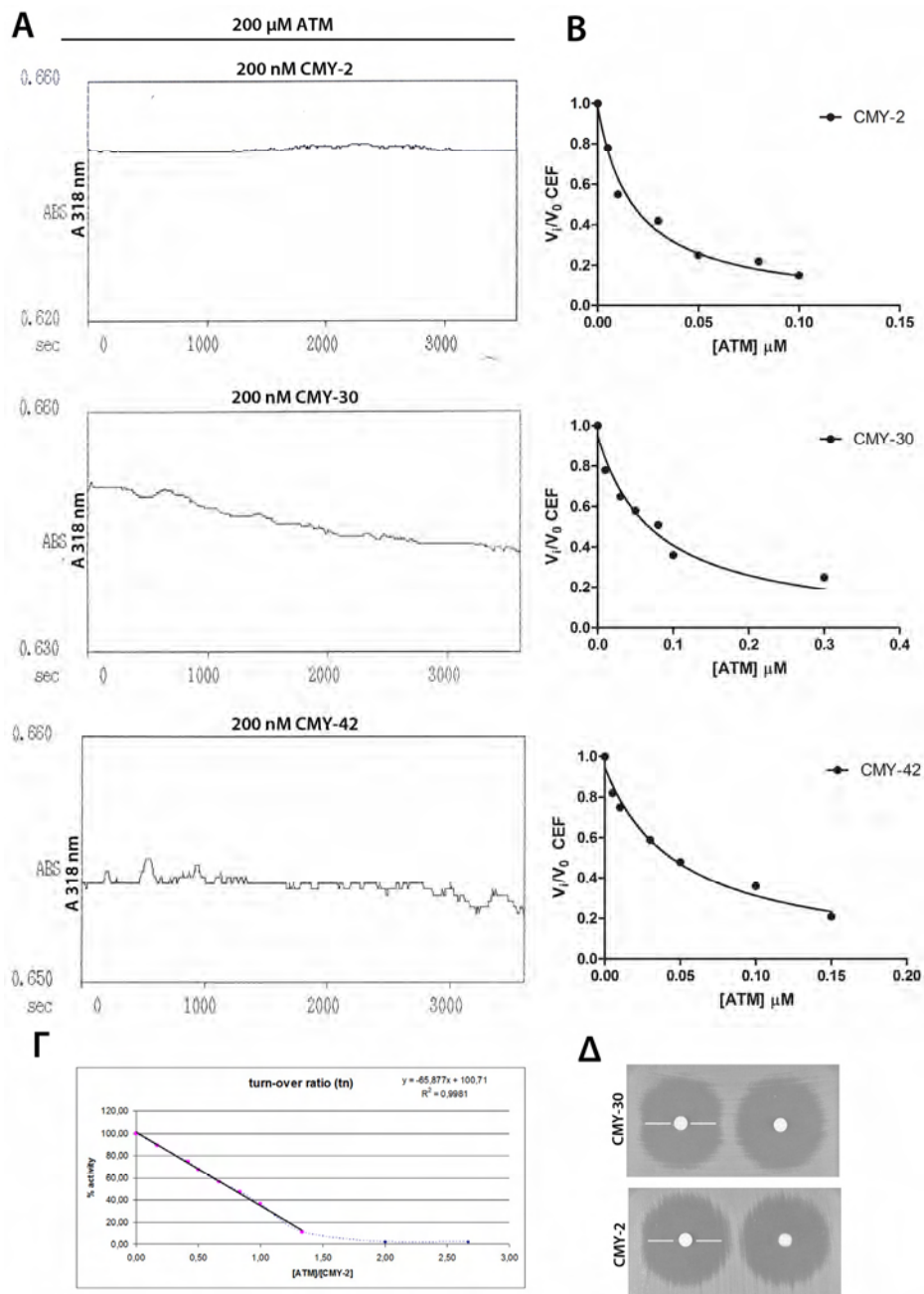


Εικόνα 13: Α) Μεταβολή της απορρόφησης στα 266 nm κατά την αλληλεπίδραση 70 μ M κεφοταξίμης με 20, 7 και 20 nM από τις CMY-2, CMY-30 και CMY-42 αντίστοιχα. Στην περίπτωση της CMY-2 για το χρονικό διάστημα μέτρησης δεν παρατηρήθηκε μετρήσιμη υδρόλυση ενώ η CMY-30 εμφάνιζε υψηλές ταχύτητες. Β) Αναστολή που προκαλείται από την κεφοταξίμη κατά την υδρόλυση κεφαλοθίνης από τα τρία ένζυμα. Διακρίνεται η αναστολή των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις κεφοταξίμης σε σχέση με τη CMY-2.

4. Αζτρεονάμη (ATM)



Η αζτρεονάμη αναστέλει πολύ ισχυρά τις βΛτC ακόμα και σε νανομοριακές συγκεντρώσεις. Οι τρεις ποικιλίες CMY εμφάνιζαν χαμηλές σταθερές αναστολής για το β-λακταμικό αυτό (Πίνακας 9, Εικόνα 14B) με τη CMY-2 να απενεργοποιείται περισσότερο ισχυρά ($K_i = 2$ nM) να ακολουθεί η CMY-42 ($K_i = 6$ nM) ενώ η CMY-30 παρουσίαζε τη μικρότερη συγγένεια ($K_i = 20$ nM). Σε πειράματα προσδιορισμού του πηλίκου συγκεντρώσεων αζτρεονάμης-ενζύμου στο οποίο το ένζυμο παύει να λειτουργεί, (επιάζοντας ένζυμο και αντιβιοτικό σε διάφορες αναλογίες για 1 ώρα και στην συνέχεια αφαιρώντας μία ποσότητα από το μίγμα μετρώντας την ενεργότητα ως προς την υδρόλυση κεφαλοθίνης και συγκρίνοντας τη με αυτήν του ενζύμου που είχε επωαστεί χωρίς αντιβιοτικό) βρέθηκε ότι για τη CMY-2 είναι 1,5 (Εικόνα 14Γ). Όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, το παραπάνω πηλίκο (αριθμός ανακύκλωσης, t_n) δηλώνει πόσοι κύκλοι αντίδρασης απαιτούνται για την πλήρη απενεργοποίηση ενός μορίου ενζύμου. Έτσι, ενώ η CMY-2 απενεργοποιούνταν με 1,5 κύκλους ακυλίωσης από την αζτρεονάμη η CMY-30 στο ίδιο πείραμα δεν αναστέλλονταν ακόμα και σε $[ATM]/[E]=10$ που υποδείκνυε πολύ αυξημένο t_n για την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση. Το πηλίκο αυτό αυξάνεται με τη μείωση της απόδοσης ακυλίωσης και με την αύξηση της ταχύτητας απακυλίωσης. Το γεγονός ότι η αζτρεονάμη σε απευθείας πειράματα ανταγωνισμού ανέστειλε αποδοτικά τη CMY-30 -αν και με μειωμένη συγγένεια- οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το παραπάνω οφείλονταν σε αυξημένη ταχύτητα υδρόλυσης του ακύλ-ενζύμου. Πράγματι σε βιολογική δοκιμάσια όπου εκτιμήθηκε η ικανότητα 700 ng ενζύμου να διαταράσσει τη ζώνη αναστολής που προκαλεί η αζτρεονάμη σε ένα ευαίσθητο βακτήριο *E. coli* DH5a παρατηρήθηκε ότι η CMY-30 διαθέτει κάποια ενεργότητα υδρόλυσης αυτής της β-λακτάμης (εικόνα 14Δ). Απευθείας παρακολούθηση της πτώσης της απορρόφησης στα 318 nm για 1 ώρα χρησιμοποιώντας πολύ υψηλή ποσότητα ενζύμου κατέστησε δυνατή μία εκτίμηση του ρυθμού με τον οποίο η CMY-30 υδρολύει το αντιβιοτικό ο οποίος προσδιορίστηκε σε $0,017$ s⁻¹ (Εικόνα 14A, Πίνακας 9). Μικρή πτώση στην απορρόφηση παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα CMY-42 η οποία ήταν μειωμένη κατά 6 φορές σε σχέση με τη CMY-30 (Εικόνα 14A, Πίνακας 9).



Εικόνα 14: Α) Παρακολούθηση πτώσης της απορρόφησης στα 318 nm. Διακρίνεται η υδρολυτική ικανότητα της CMY-30 σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα. Β) Μέτρηση σταθερών αναστολής κατά την αδρανοποίηση των CMY από την αζτρεονάμη. Γ) Μέτρηση του πηλίκου t_n κατά την αναστολή της CMY-2 από την αζτρεονάμη. Η εναπομείνουσα ενεργότητα μηδενίζεται σε $[\text{ATM}]/[\text{CMY-2}]=1,5$. Για αναλογίες αζτρεονάμης/CMY-30 ως 10 και επώαση 1 ώρας δεν παρατηρούνταν αναστολή λόγω της υδρόλυσης του αντιβιοτικού από το ένζυμο. Δ) Βιολογική δοκιμασία όπου διακρίνεται η δυνατότητα της CMY-30 να υδρολύει την αζτρεονάμη προκαλώντας διαταραχή στη ζώνη αναστολής δίσκου του αντιβιοτικού κατά την επίδραση σε ευαίσθητο *E. coli* που είχε καλλιεργηθεί σε τρυβλίο ΜΗ άγαρ.

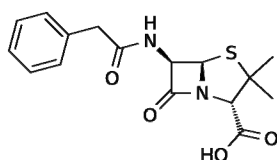
Πίνακας 9: Κινητικές σταθερές αλληλεπιδράσεων με την αζτρεονάμη

Ένζυμο	[E] (μM)	[ATM] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
CMY-2 ^{Val211}	0,2	200 - 250	^β MM	0.002±0.001	-
CMY-30 ^{Gly211}	0,2	200 - 250	0.017±0.004	0.02±0.005	1.2·10 ⁶
CMY-42 ^{Ser211}	0,2	200 - 250	0.003±0.001	0.006±0.002	0,5·10 ⁶

^a Μετρήθηκαν ως σταθερές αναστολής K_i ^β Μη μετρήσιμη

Συνεπώς η αύξηση της MIC της αζτρεονάμης που παρατηρήθηκε στους κλώνους που παρήγαγαν τις ποικιλίες Gly211 και Ser211 οφείλεται σε αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης του αντιβιοτικού.

5. Πενικιλίνη G (PEN G)



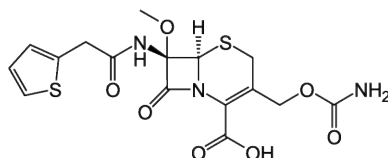
Οι CMY-2, CMY-30 και CMY-42 υδρόλυαν τη βενζυλπενικιλίνη με την ίδια ταχύτητα η οποία δεν μεταβάλλονταν με τις συγκεντρώσεις υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις. Οι σταθερές k_{cat} και K_m εκτιμήθηκαν όπως και παραπάνω (Πίνακας 10, Εικόνα 15A).

Πίνακας 10: Κινητικές σταθερές αλληλεπιδράσεων με την πενικιλίνη

Ένζυμο	[E] (μM)	[PEN G] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
CMY-2 ^{Val211}	3·10 ⁻³	150 - 400	24 ± 3	0.6±0.08	40·10 ⁶
CMY-30 ^{Gly211}	3·10 ⁻³	150 - 400	23 ± 3	0.6±0.1	38·10 ⁶
CMY-42 ^{Ser211}	3·10 ⁻³	150 - 400	21±2	0.5±0.1	42·10 ⁶

^a Μετρήθηκαν ως σταθερές αναστολής K_i

6. Κεφοξιτίνη (FOX)

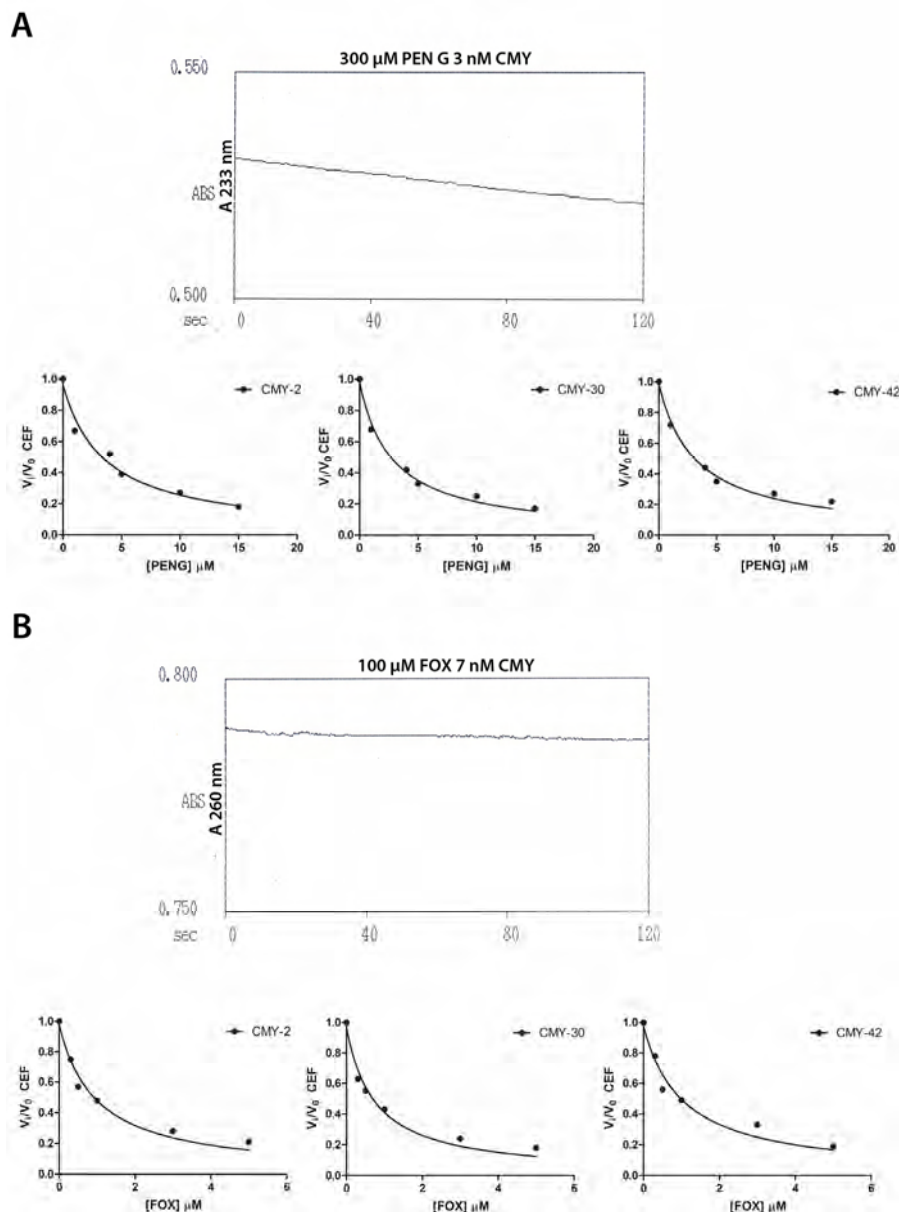


Τα τρία ένζυμα εμφάνιζαν την ίδια συμπεριφορά και ως προς την υδρόλυση της κεφοξιτίνης με τις μετρούμενες σταθερές υδρόλυσης να μην παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 11, Εικόνα 15B).

Πίνακας 11: Κινητικές σταθερές αλληλεπιδράσεων με την κεφοζιτίνη

Ένζυμο	[E] (μM)	[FOX] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
CMY-2 ^{Val211}	7·10 ⁻³	20 - 100	0.35 ± 0.04	0.15 ± 0.02	2.3·10 ⁶
CMY-30 ^{Gly211}	7·10 ⁻³	20 - 100	0.28 ± 0.02	0.17 ± 0.02	1.6·10 ⁶
CMY-42 ^{Ser211}	7·10 ⁻³	20 - 100	0.32±0.06	0.15±0.01	2.1·10 ⁶

^a Μετρήθηκαν ως σταθερές αναστολής K_i

**Εικόνα 15:** Αλληλεπίδραση των ποικιλιών CMY με την πενικιλίνη G (A) και την κεφοζιτίνη (B).

Πίνακας 12: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα κινητικών σταθερών των τριών ποικιλιών 211 κατά την υδρόλυση β-λακταμικών αντιβιοτικών.

β-λακτάμη	CMY-42 (Ser211)			CMY-2 (Val211)			CMY-30 (Gly211)		
	K_m or K_i (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m or K_i (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m or K_i (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
<i>Βενζολπενικιλίνη</i>	0.5±0.1	21±2	42	0.6±0.08	24 ± 3	40	0.6±0.1	23 ± 3	38
<i>Κεφαλοθίνη</i>	16.2±2	225±26	14	17 ± 3	267 ± 10	16	26 ± 4.0	256 ± 14	10
<i>Κεφοξιτίνη</i>	0.15±0.01	0.32±0.06	2.1	0.15 ± 0.02	0.35 ± 0.04	2.3	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.02	1.6
<i>Κεφοταξιδίμη</i>	0.30±0.08	0.50±0.02	1.7	0.02±0.003	≤0.01	≤0.5	0.14±0.02	0.35±0.05	2.5
<i>Κεφοταξίμη</i>	0.08±0.03	0.20±0.03	2.5	0.005±0.001	<0.01	<2	0.30±0.02	1.7±0.1	5.7
<i>Αζτρεονάμη</i>	0.006±0.002	0.003±0.001	0.5	0.002±0.001	-	-	0.017±0.004	0.02±0.005	1.2

γ. Αναστολή από β-λακτάμες

Εκτός από την αζτρεονάμη, οι AmpC αναστέλλονται και από άλλα β-λακταμικά με την κλοξακιλλίνη και τα συγγενικά με αυτή μόρια να προκαλούν τη μέγιστη αναστολή ενώ κάποια ενεργότητα εμφανίζουν και οι σουλφόνες πενικιλίνης RO 48-1220 και ταζοβακτάμη. Το προφίλ αναστολής που χαρακτήριζε τις ποικιλίες 211 των ενζύμων CMY ακολουθούσε την σειρά κλοξακιλλίνη>αζτρεονάμη>RO 48-1220>ταζοβακτάμη η οποία είναι χαρακτηριστική για τα ένζυμα της κατηγορίας. Οι τιμές IC₅₀ και οι σταθερές αναστολής που μετρήθηκαν δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ενζύμων με τη CMY-30 να εμφανίζει σχετικά μειωμένη ευαισθησία στην απενεργοποίηση από τα παραπάνω μόρια (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Προφίλ αναστολής από β-λακταμικά μόρια

Αναστολέας	CMY-2 (Val211)		CMY-30 (Gly211)		CMY-42 (Ser211)	
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)
Κλοξακιλλίνη	1,5	0,21	11	2,3	1,0	0,20
RO 48-1120	700	100	900	200	200	70
Ταζοβακτάμη	5600	800	12000	>1000	4600	700

δ. Αναστολή από βορονικά οξέα

Από τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών υδρόλυσης προέκυψε ότι τα ένζυμα CMY με γλυκίνη η σερίνη στη θέση 211 παρουσιάζουν αυξημένες σταθερές κατάλυσης κατά την υδρόλυση της κεφοταξίμης, της κεφταζιδίμης και της αζτρεονάμης σε σχέση με την CMY-2 οι οποίες αντιστοιχούν σε αυξημένους ρυθμούς των ταχυτήτων απαकुλίωσης. Ο προσδιορισμός των σταθερών φαινόμενης συγγένειας έδειξε ότι ενδεχομένως οι υποκαταστάσεις Val211Gly και Val211Ser να έχουν επιπλέον επιπτώσεις στην λειτουργία του ενζύμου. Τα ένζυμα με ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος εμφανίζονταν να έχουν μικρότερη συγγένεια κατά την αλληλεπίδραση τους με τα παραπάνω β-λακταμικά τα οποία φέρουν οξυμίμο R1 πλευρικές αλυσίδες. Η αύξηση των K_m ενδέχεται όμως να οφείλεται στους αυξημένους ρυθμούς υδρόλυσης του εστέρα στο στάδιο του ακύλ-ενζύμου. Με σκοπό να αξιολογηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η

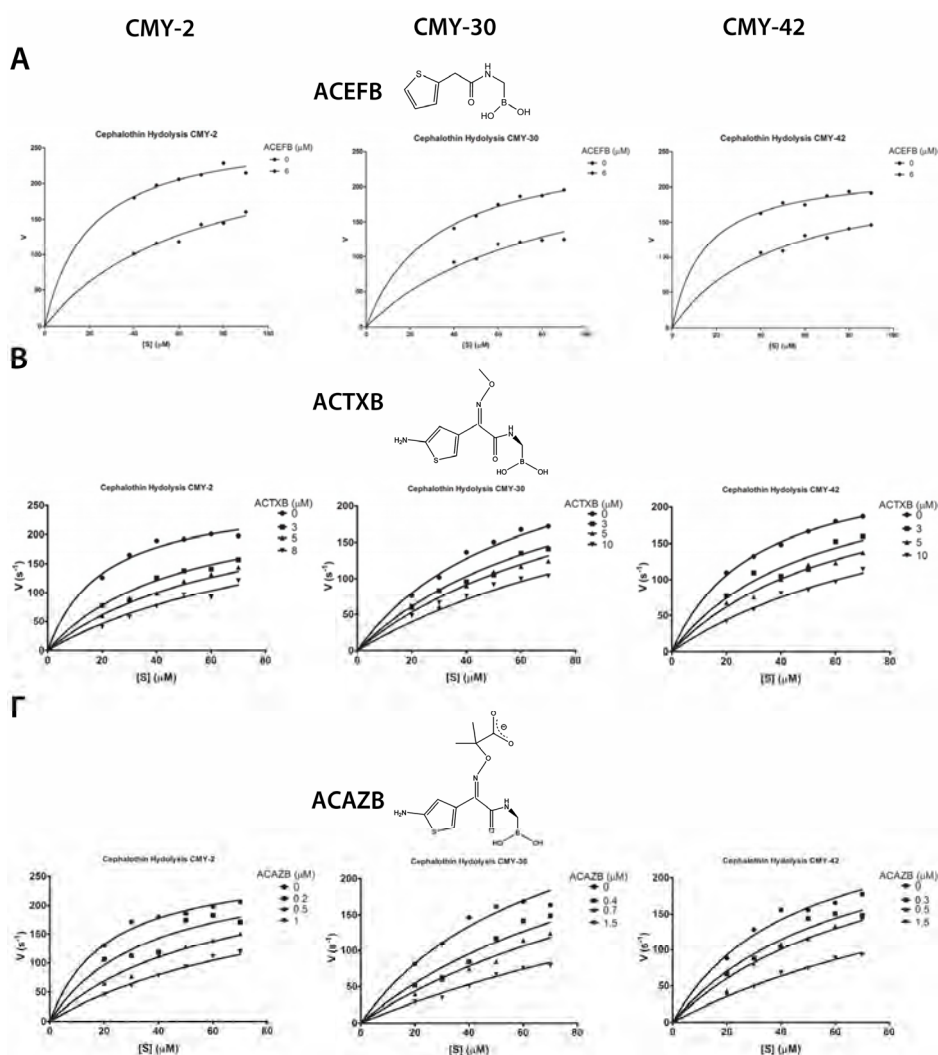
συγγένεια των οξυίμινο υποστρωμάτων με τα ένζυμα αυτά μετρήθηκε η αναστολή που προκαλείται από βορονικά οξέα που φέρουν τις πλευρικές αλυσίδες των παραπάνω μορίων. Χρησιμοποιήθηκαν γλύκυλ- (μη-χειρόμορφα, ACAZB και ACTXB) και κάρβοξυ-φαινυλαλανύλ- (χειρόμορφα, CCAZB και CCTXB) βορονικά οξέα που φέρουν την R1 πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης (πανομοιότυπη με την R1 της αζτρεονάμης) και της κεφοταξίμης. Στις μετρήσεις συμπεριλήφθηκε επίσης και το μη-χειρόμορφο βορονικό ανάλογο της κεφαλοθίνης (ACEFB) η οποία όπως αναφέρθηκε υδρολύονταν το ίδιο αποδοτικά και από τα τρία ένζυμα. Τα μόρια αυτά δημιουργούν παροδικούς ομοιοπολικούς δεσμούς με το οξυγόνο της Ser64 (καταλυτική σερίνη των β-λακταμασών τάξης C) μέσω του ηλεκτρονιόφιλου ατόμου βορίου προκαλώντας αναστολή του ενζύμου ενώ τα σύμπλοκα που δημιουργούνται είναι ανάλογα των καταστάσεων μετάπτωσης της απακυλίωσης.

Οι μετρούμενες σταθερές αναστολής (ενότητα 2.Κ.ν) έδειξαν ότι το βορονικό ανάλογο της κεφαλοθίνης ανάστελλε στον ίδιο βαθμό και τα τρία ένζυμα με τις όποιες παρατηρούμενες διαφορές να μην είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 14, Εικόνες 16 και 17). Αντίθετα, τα βορονικά οξέα με οξυίμινο πλευρικές αλυσίδες παρουσίαζαν διαφορετική συμπεριφορά κατά την αναστολή των τριών ενζύμων. Οι δύο υποκαταστάσεις προκαλούσαν μείωση της συγγένειας έναντι των R1 πλευρικών αλυσίδων της κεφταζιδίμης και της κεφοταξίμης (αύξηση των K_i). Οι παρατηρούμενες διαφορές δεν ήταν του ίδιου μεγέθους με αυτές που σημειώθηκαν κατά την αναστολή από οξυίμινο β-λακταμικά, ήταν όμως στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 14). Στην περίπτωση των αναλόγων της κεφταζιδίμης, τα δύο ένζυμα εκτεταμένου φάσματος παρουσίαζαν τον ίδιο βαθμό μείωσης της συγγένειας ενώ στην περίπτωση των αναλόγων κεφοταξίμης η μείωση ήταν μεγαλύτερη για την CMY-30 από ότι για την CMY-42 (Πίνακας 14, Εικόνες 16 και 17). Επίσης, συγκρίνοντας τις σταθερές αναστολής των δύο αναλόγων της κεφταζιδίμης, προέκυψε ότι η προσθήκη της μέτα-κάρβοξυβενζύλ υποκατάστασης (ανάλογο του δακτυλίου διυδροθειαζίνης στο ακύλ-ένζυμο της κεφταζιδίμης) προκαλεί μεγάλη αύξηση της συγγένειας κατά την αλληλεπίδραση με την CMY-2 ενώ στα δύο ΕΦ ένζυμα η αύξηση αυτή είναι σχετικά περιορισμένη (Πίνακας 14).

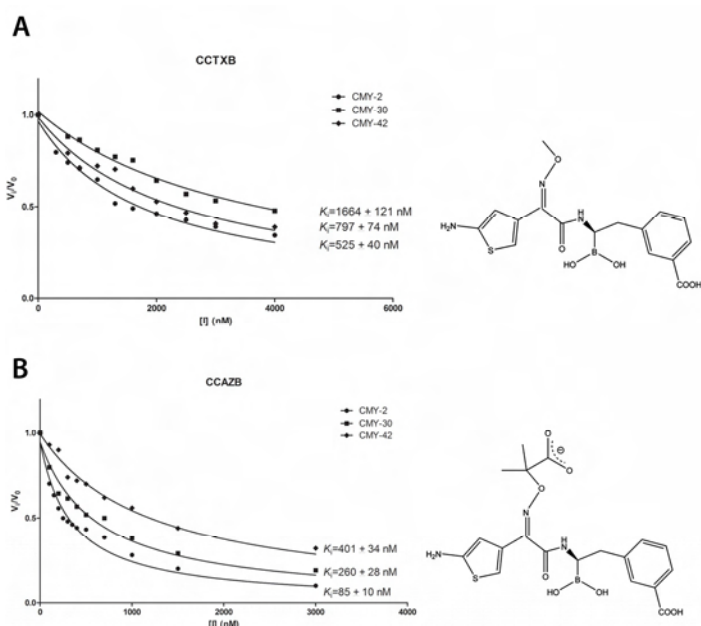
Πίνακας 14: Αναστολή από βορονικά οξέα ανάλογα των κεφαλοσπορινών

Βορονικό οξύ	K_i (μM)		
	CMY-2 (Val211)	CMY-30 (Gly211)	CMY-42 (Ser211)
ACEFB	2,7 \pm 0,6	3,2 \pm 0,5	3,04 \pm 0,5
ACAZB	0.27 \pm 0.06	0.65 \pm 0.12	0.64 \pm 0.11
CCAZB	0.08 \pm 0.01	0.30 \pm 0.03	0.40 \pm 0.03
ACTXB	2.2 \pm 0.3	7.1 \pm 1.5	4.2 \pm 0.9
CCTXB	0.53 \pm 0.04	1.7 \pm 0.1	0.80 \pm 0.07

α



Εικόνα 16: Μεταβολή των αρχικών ταχυτήτων υδρόλυσης της κεφαλοθίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση υποστρώματος παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ACEFB (A), ACTXB (B) και ACAZB (Γ). Από τις καμπύλες αυτές προσδιορίστηκαν οι σταθερές αναστολής μέσω μη-γραμμικής παλινδρόμησης στην εξίσωση που χαρακτηρίζει τη μεικτή αντιστρεπτή αναστολή. Οι CMY-30 και CMY-42 αναστέλλονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυμίμο βορονικών οξέων σε σχέση με την CMY-2.



Εικόνα 17: Αναστολή που προκαλούνταν από τα χειρόμορφα βορονικά οξέα με οξυμίμο πλευρικές αλυσίδες (A: ανάλογο κεφοταξίμης, B: ανάλογο κεφαζιδίμης). Η απενεργοποίηση της CMY-2 ήταν περισσότερο ισχυρή και σε αυτή την περίπτωση. Σε κάθε καμπύλη δίνονται οι τιμές K_i που ικανοποιούσαν την εξίσωση Morrison για το συγκεκριμένο πείραμα \pm το τυπικό σφάλμα της μέτρησης.

ε. Πειράματα θερμικής αποδιάταξης

Ο προσδιορισμός των θερμοκρασιών τήξης των τριών ενζύμων CMY όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.ΚΑ (σελίδα 226) έδειξε ότι τα ένζυμα με ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος χαρακτηρίζονται από χαμηλή θερμική σταθερότητα σε σχέση με το ένζυμο που δεν υδρόλυε τα οξυμίμο υποστρώματα. Η CMY-30 εμφάνιζε την χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης ($T_m = 52,3 \pm 0,10$ °C) ακολουθούσε η CMY-42 ($T_m = 54,0 \pm 0,14$ °C) ενώ η CMY-2 ήταν η περισσότερο σταθερή κεφαλοσπορινάση ($T_m = 55,3 \pm 0,17$ °C). Η τεχνική DSF παρουσίαζε υψηλή επαναληψιμότητα με τις διαφορές στις προσδιοριζόμενες θερμοκρασίες τήξης μεταξύ των τριών ενζύμων να παραμένουν σε κάθε πείραμα σταθερές, ενώ διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των ενζύμων δεν είχαν επίδραση σε αυτές (Εικόνα 18Α).

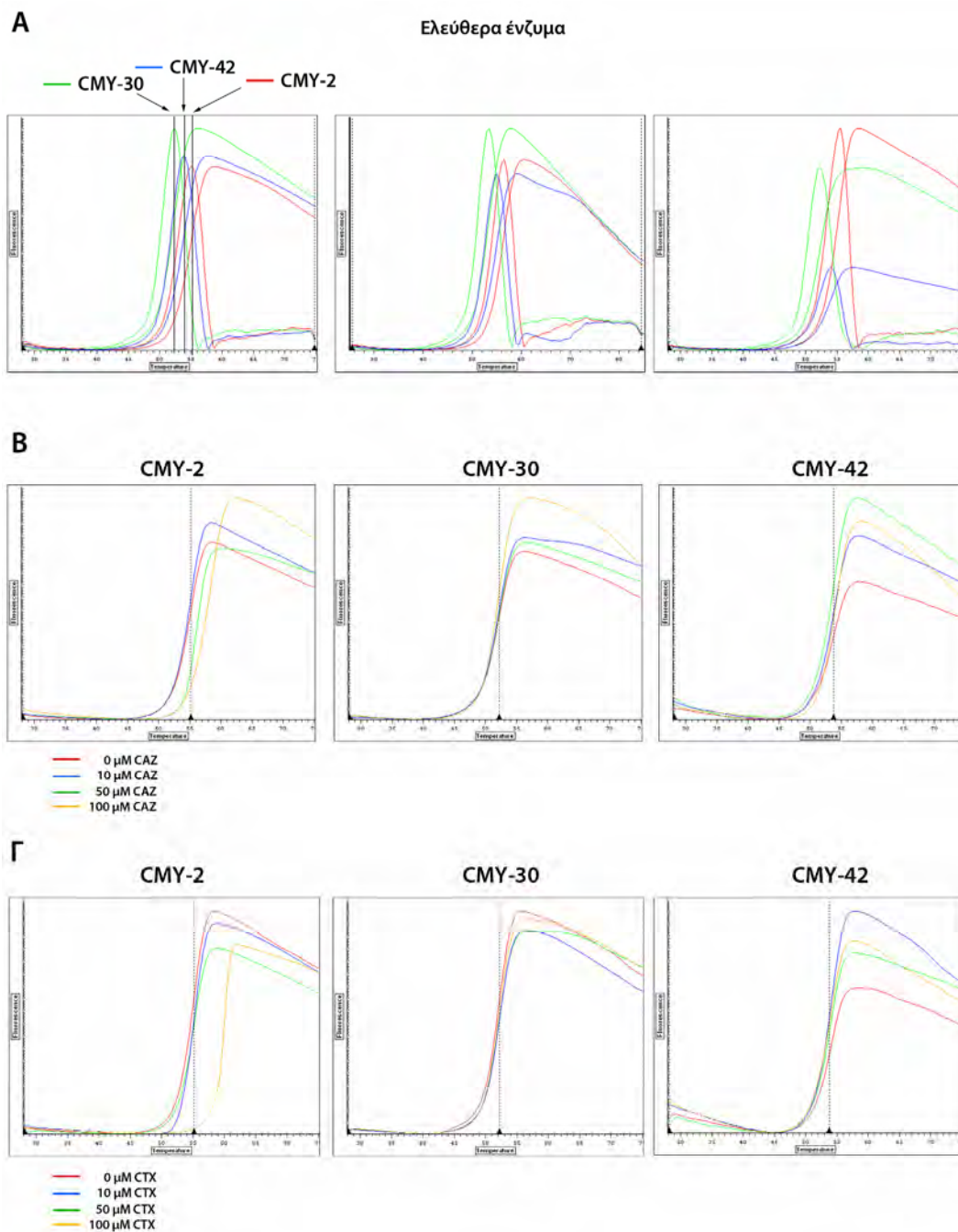
Εκτιμώντας την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων κεφαζιδίμης στις θερμοκρασίες τήξης των τριών ενζύμων παρατηρήθηκε ότι τα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος δεν επηρεάζονται. Αντίθετα η CMY-2 σταθεροποιούνταν σε συγκεντρώσεις κεφαζιδίμης >50 μ M (Εικόνα 18B, Πίνακας 15). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και με την κεφοταξίμη (Εικόνα 18Γ, Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Θερμοκρασίες τήξης ελεύθερων και συμπλοκοποιημένων ενζύμων

Προσδέτης	CMY-2		CMY-30		CMY-42	
	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
-	55,3±0,17 ^a	-	52,3±0,10	-	54,0±0,14	-
10 μ M CAZ	-	0,0±0,0 ^b	-	0,1±0,1	-	0,2±0,2
50 μ M CAZ	-	0,9±0,1	-	0,1±0,1	-	0,3±0,3
100 μ M CAZ	-	3,1±0,1	-	0,1±0,1	-	0,2±0,2
10 μ M CTX	-	0,0±0,0	-	0,2±0,0	-	0,1±0,1
50 μ M CTX	-	0,4±0,0	-	0,2±0,0	-	-0,1±0,1
100 μ M CTX	-	4,5±0,4	-	0,1±0,1	-	0,6±0,2
10 μ M ATM	-	7,3±0,1	-	0,1±0,1	-	5,4±0,7
50 μ M ATM	-	7,4±0,2	-	4,3±0,1	-	6,3±0,2
100 μ M ATM	-	7,3±0,1	-	4,3±0,1	-	6,2±0,3
10 μ M ACAZB	-	1,9±0,2	-	1,2±0,2	-	1,4±0,2
50 μ M ACAZB	-	3,9±0,1	-	2,4±0,2	-	3,3±0,1
100 μ M ACAZB	-	4,7±0,3	-	3,0±0,2	-	4,2±0,2
10 μ M CCAZB	-	0,3±0,3	-	0,1±0,1	-	0,1±0,1
50 μ M CCAZB	-	2,1±0,2	-	1,3±0,1	-	1,9±0,2
100 μ M CCAZB	-	3,3±0,3	-	1,8±0,2	-	2,6±0,3
10 μ M ACTXB	-	1,3±0,2	-	0,4±0,0	-	1,0±0,2
50 μ M ACTXB	-	3,1±0,1	-	1,4±0,0	-	2,4±0,0
100 μ M ACTXB	-	3,4±0,2	-	1,8±0,2	-	2,9±0,1
10 μ M CCTXB	-	0,3±0,3	-	-0,1±0,1	-	0,3±0,1
50 μ M CCTXB	-	1,2±0,2	-	0,1±0,1	-	1,0±0,1
100 μ M CCTXB	-	1,5±0,2	-	0,2±0,0	-	1,0±0,2

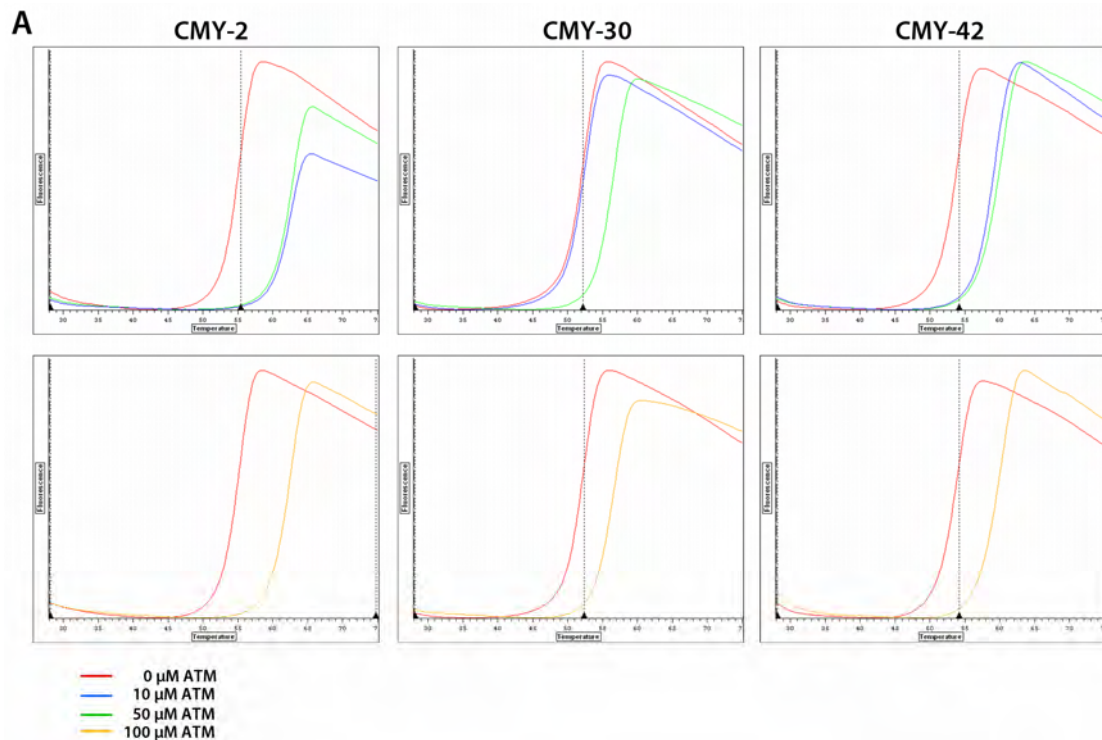
^a Οι θερμοκρασίες τήξης των ελεύθερων ενζύμων που δίνονται αποτελούν μέσους όρους \pm τυπική απόκλιση που προέκυψαν από τις τιμές που προσδιορίστηκαν σε 10 ανεξάρτητα πειράματα.

^b Οι μεταβολές των θερμοκρασιών τήξης αντιστοιχούν στις διαφορές $T_m^{\text{Συμπλόκων}} - T_m^{\text{Ελεύθερου ενζύμου}}$ και οι τιμές που δίνονται είναι μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 18: Α) Προσδιορισμός των θερμοκρασιών τήξης των τριών ενζύμων CMY. Η CMY-30 ήταν επαναλαμβανόμενα πιο ασταθής κατά 3 °C σε σχέση με την CMY-2 και η CMY-42 κατά 1 °C. Στο δεξί μέρος δίνονται οι καμπύλες αποδιάταξης χρησιμοποιώντας μικρότερη ποσότητα CMY-42 με τις διαφορές μεταξύ των τριών ενζύμων να παραμένουν σταθερές. Β) Επίδραση 10, 50 και 100 μM κεφαζιδίμης. Η διακεκομμένη γραμμή δηλώνει την T_m του ελεύθερου ενζύμου για το συγκεκριμένο πείραμα. Η κεφαζιδίμη σταθεροποιούσε τη CMY-2 σε συγκεντρώσεις > 50 μM. Γ) Επίδραση κεφοταξίμης υπό τις ίδιες συνθήκες.

Το γεγονός ότι οι CMY-30 και CMY-42 δεν σταθεροποιούνταν από τις παραπάνω συγκεντρώσεις των οξυμίμο β-λακταμικών κεφαταζιδίμη και κεφοταξίμη στις συνθήκες του πειράματος πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη υδρολυτική ικανότητα των ενζύμων. Αντίθετα η ακυλίωση της CMY-2 από τα παραπάνω μόρια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης σε συγκεντρώσεις κορεσμού. Η αζτρεονάμη προκαλούσε σημαντική αύξηση στις θερμοκρασίες τήξης των τριών ενζύμων (Εικόνα 19, Πίνακας 15).

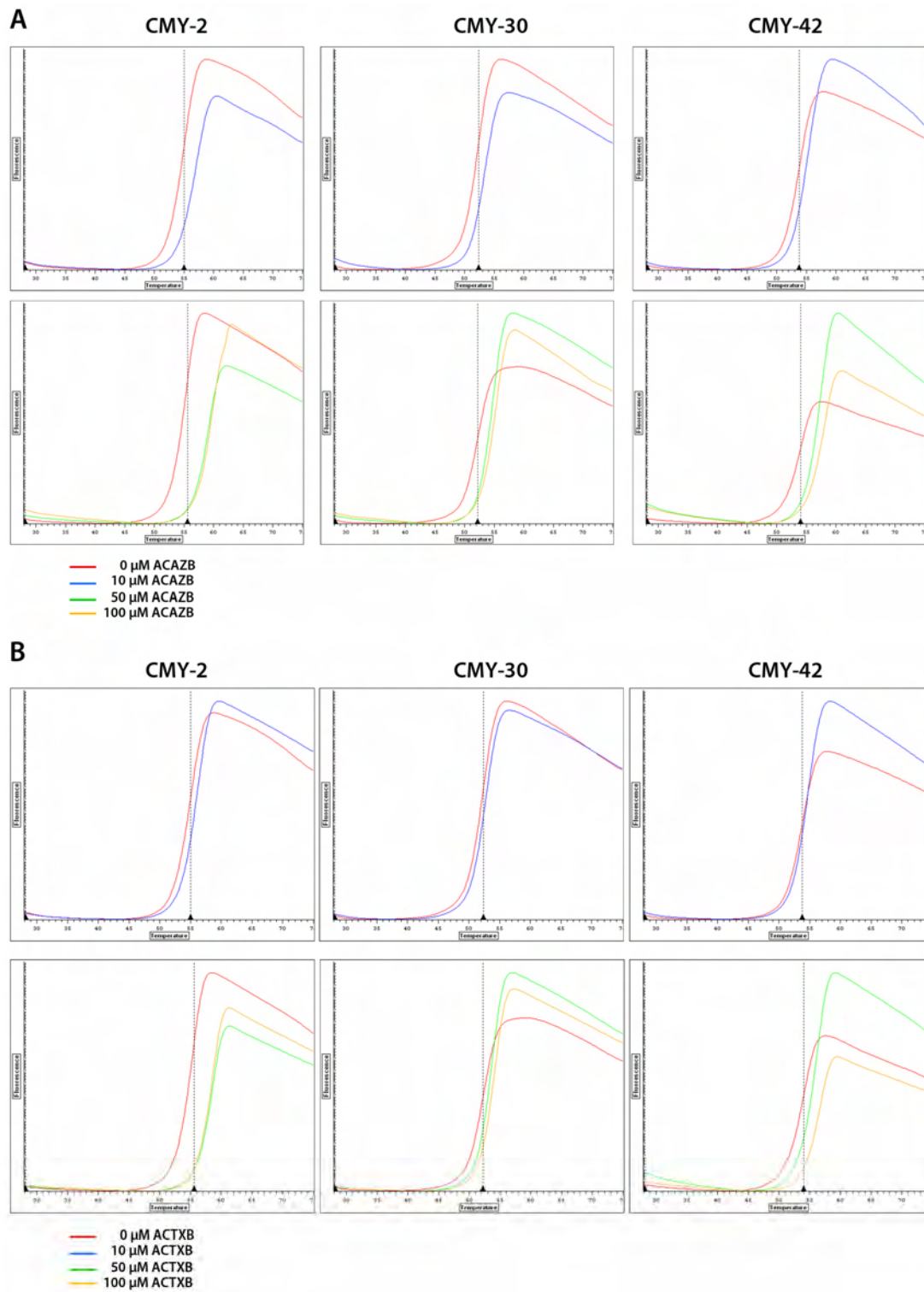


Εικόνα 19: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αζτρεονάμης στην θερμική αποδιάταξη των τριών ενζύμων. Ο βαθμός σταθεροποίησης που προκαλείται από 100 μM αζτρεονάμης εκτιμήθηκε σε ανεξάρτητα πειράματα.

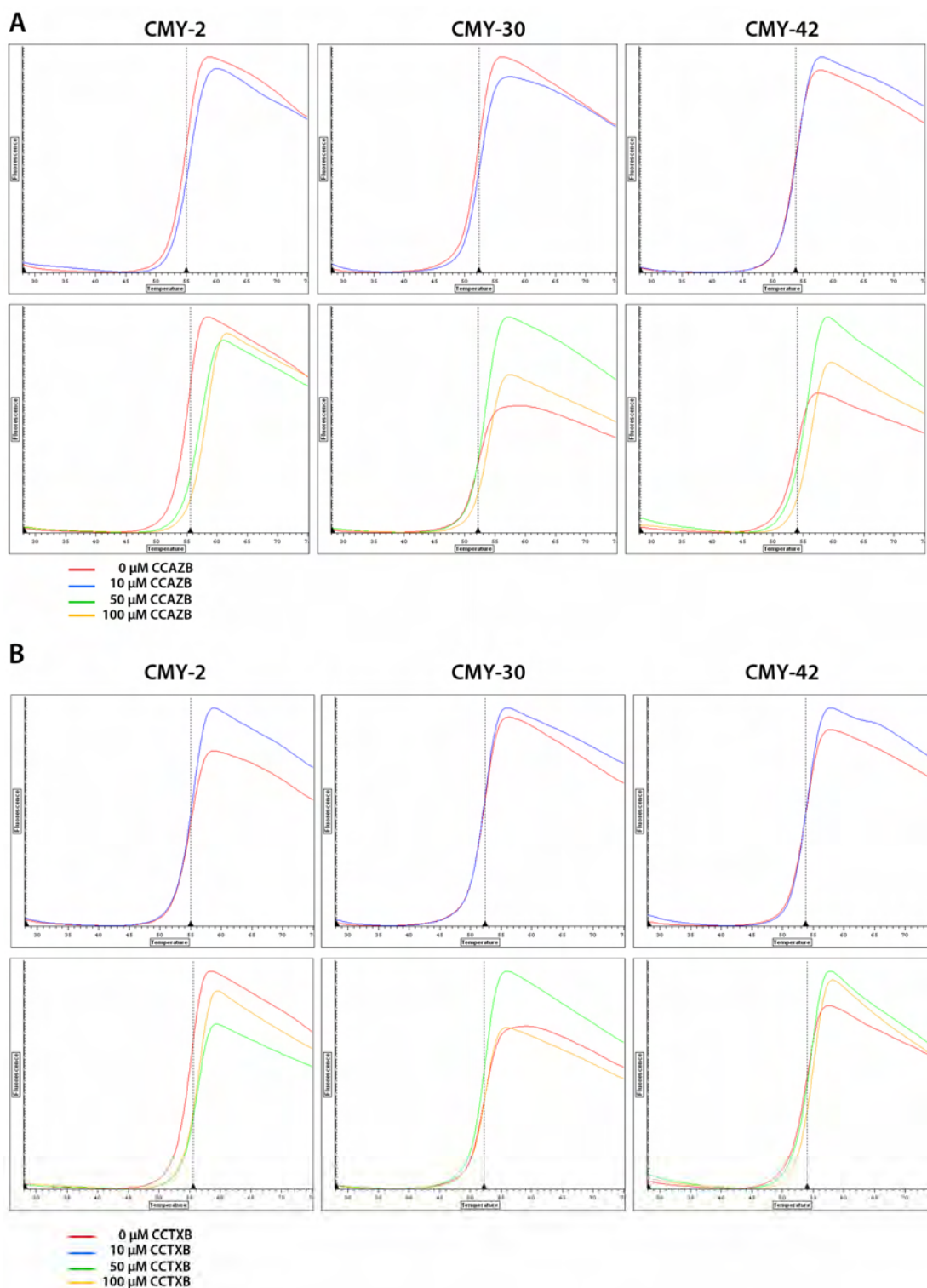
Ο βαθμός σταθεροποίησης της CMY-2 από το μόριο αυτό δεν μεταβάλλονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης γεγονός που δηλώνει ότι είχε συμπλοκοποιηθεί πλήρως ήδη από τα 10 μM αζτρεονάμης (Πίνακας 15, Εικόνα 22Δ). Στην περίπτωση της CMY-42 παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στη μεταβολή των T_m από τα 10 ως τα 50 μM και στη συνέχεια επιτεύχθηκε πλατώ (Πίνακας 15, Εικόνα 22Δ). Την ίδια συμπεριφορά παρουσίασε και η CMY-30 με τη διαφορά ότι στα 10 μM δεν παρατηρήθηκε σταθεροποίηση πιθανότατα λόγω της αυξημένης υδρόλυσης που εμφανίζει το ένζυμο έναντι του υποστρώματος αυτού ενώ 50 και 100 μM αζτρεονάμης ήταν αρκετά ώστε στις

συνθήκες του πειράματος να παρατηρηθεί πλήρης ακυλίωση της ποσότητας του ενζύμου (Πίνακας 15, Εικόνα 22Δ). Τα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος στις συγκεντρώσεις που είχε επιτευχθεί κορεσμός εμφάνιζαν μικρότερο βαθμό σταθεροποίησης από αυτό το οξύιμο β-λακταμικό σε σχέση με την CMY-2 με την CMY-30 να παρουσιάζει τη μικρότερη μεταβολή (πίνακας 15, εικόνα 22Δ). Οι θερμοκρασίες τήξης στα παραπάνω πειράματα εξαρτώνται από τρεις παραμέτρους i) την συγγένεια που παρουσιάζει το ένζυμο για τον προσδέτη και την απόδοση ακυλίωσης, ii) την ενδεχόμενη ικανότητα υδρόλυσης του ακύλ-ενζύμου και iii) τη θερμική σταθερότητα του ομοιοπολικού αυτού συμπλόκου. Εφόσον στις συγκεντρώσεις αζτρεονάμης όπου τα ενεργά κέντρα των τριών ενζύμων ήταν κορεσμένα με προσδέτη παρατηρήθηκε μειωμένη σταθεροποίηση στις CMY-30 και CMY-42, μπορεί να υποστηριχθεί ότι τα ακύλ-ένζυμα που σχηματίζουν οι δύο κεφαλοσπορινάσες με το μόριο αυτό είναι περισσότερο ασταθή σε σχέση με την αντίστοιχη ρίζα της CMY-2. Επιπλέον το παραπάνω υποδηλώνει ότι η διαφορά των θερμοκρασιών τήξης των τριών ενζύμων διευρύνεται ακόμη περισσότερο στην περίπτωση που αυτά έχουν ακυλωθεί από την αζτρεονάμη από ότι όταν είναι σε ελεύθερη κατάσταση (για παράδειγμα ενώ η CMY-30 σε ελεύθερη κατάσταση είναι κατά 3 °C πιο ασταθής από τη CMY-2 όταν τα ένζυμα ακυλιώνονται πλήρως από αζτρεονάμη η διαφορά αυξάνεται στους 6 °C).

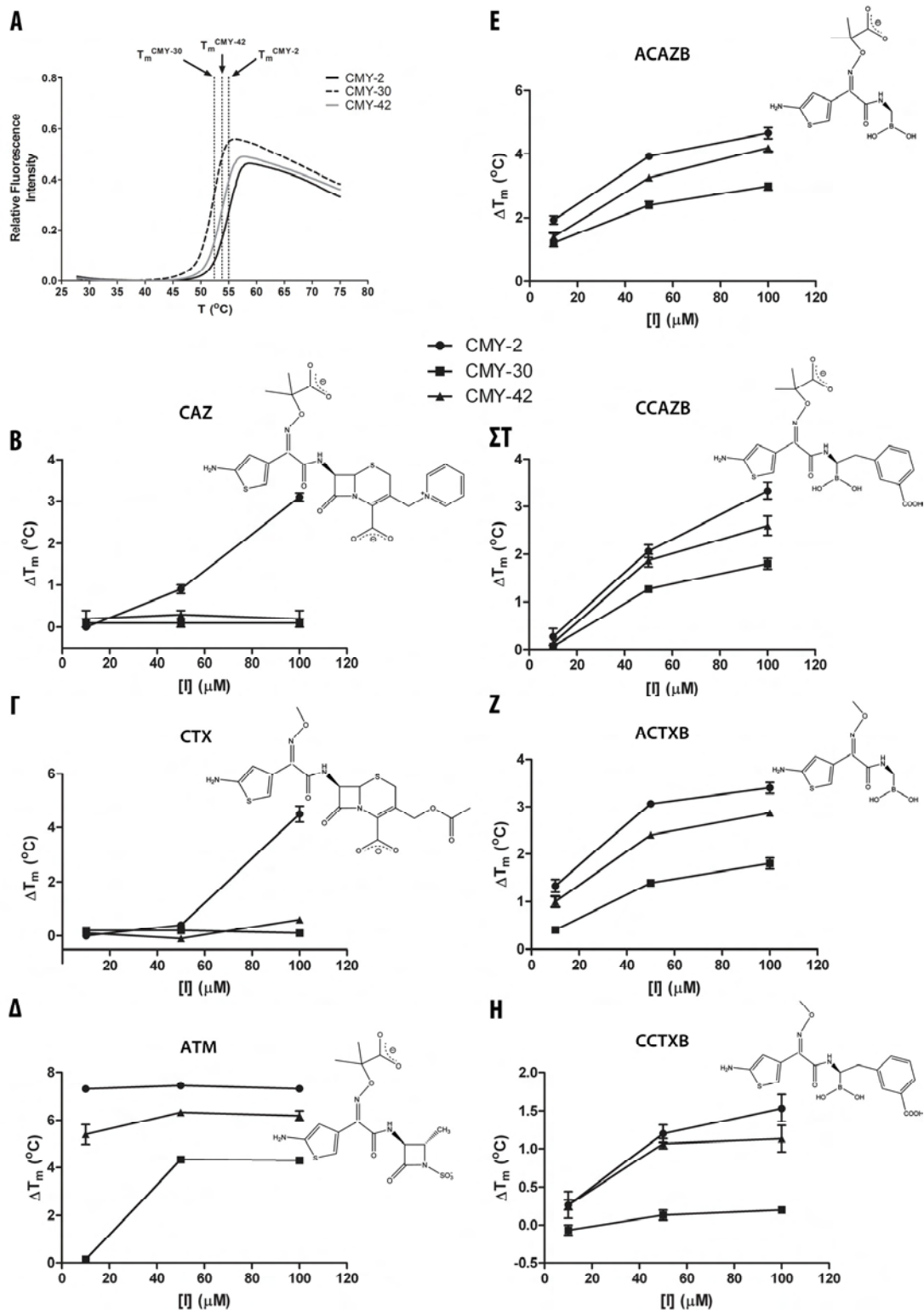
Τα βορονικά οξέα που έφεραν τις πλευρικές αλυσίδες της κεφταζιδίμης και της αζτρεονάμης προκαλούσαν επίσης αύξηση στις θερμοκρασίες τήξης των τριών ενζύμων ειδικά σε συγκεντρώσεις >10 μM (Εικόνα 20: μη-χειρόμορφα ανάλογα, Εικόνα 21: χειρόμορφα ανάλογα). Η επίδραση των τεσσάρων βορονικών αναλόγων στις τρεις ποικιλίες της θέσης 211 ακολουθούσε το ίδιο μοτίβο με αυτό που παρατηρήθηκε για την αζτρεονάμη με τη CMY-2 να σταθεροποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό, ακολουθούσε η CMY-42 ενώ η CMY-30 εμφάνιζε τις μικρότερες μεταβολές στη θερμοκρασία τήξης ειδικά στην περίπτωση των αναλόγων της κεφοταξίμης (Πίνακας 15, Εικόνα 22E-H). Στην περίπτωση των αλληλεπιδράσεων αυτών ο βαθμός αύξησης των θερμοκρασιών αποδιάταξης εξαρτάται από τη συγγένεια των μορίων για το ενεργό κέντρο των ενζύμων και την σταθερότητα του παροδικού ομοιοπολικού συμπλόκου που σχηματίζουν με τις CMY. Έτσι, εφόσον σε συγκεντρώσεις κορεσμού παρατηρήθηκε μικρότερος βαθμός σταθεροποίησης για τα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος, μπορεί να υποστηριχθεί ότι τα αντίστοιχα σύμπλοκα είναι περισσότερο ασταθή από αυτά της CMY-2.



Εικόνα 20: Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μη-χειρόμορφων βορονικών οξέων. Α) ανάλογο κεφοταξίμης, Β) ανάλογο κεγατιδίμης. Η επίδραση συγκέντρωσης 10 μM προσδιορίστηκε σε ανεξάρτητα πειράματα.



Εικόνα 21: Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων χειρόμορφων βορονικών οξέων. Α) ανάλογο κεφοταζίμης, Β) ανάλογο κεφταζιδίμης. Η επίδραση συγκέντρωσης 10 μM προσδιορίστηκε σε ανεξάρτητα πειράματα. Η σταθεροποίηση που προκαλούν τα μόρια αυτά είναι μικρότερου βαθμού από αυτή των αντίστοιχων μη-χειρόμορφων μορίων.



Εικόνα 22: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων θερμικής αποδιάταξης. Α) Ελεύθερα ένζυμα, Β-Η) Μεταβολή των θερμοκρασιών τήξης παρουσία 10, 50 και 100 μM οξυμίμο υποστρωμάτων.

Συνεπώς και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε ότι οι οξυίμινο πλευρικές αλυσίδες προκαλούν μικρότερη σταθεροποίηση στις κεφαλοσπορινάσες εκτεταμένου φάσματος από ότι στο ένζυμο που δεν υδρολύει τα β-λακταμικά που φέρουν τις παραπάνω υποκαταστάσεις. Συγκρίνοντας τους βαθμούς αύξησης των θερμοκρασιών τήξης μεταξύ χειρόμορφων και μη-χειρόμορφων βορονικών οξέων παρατηρήθηκε ότι τα τελευταία προκαλούν μικρότερη σταθεροποίηση και στα τρία ένζυμα. Όμως, οι εκτιμώμενες σταθερές αναστολής των χειρόμορφων αναλόγων έδειξαν ότι τα μόρια αυτά εμφανίζουν αυξημένη συγγένεια έναντι των τριών ενζύμων CMY σε σχέση με τα αντίστοιχα μη-χειρόμορφα μόρια. Κατά συνέπεια το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην υψηλότερη αστάθεια των συμπλόκων ενζύμου-βορονικού οξέος και άρα οι μετακάρβοξυ-βενζύλ υποκαταστάσεις των χειρόμορφων μορίων αντισταθμίζουν την σταθεροποίηση που προκαλούν οι οξυίμινο πλευρικές αλυσίδες κατά την πρόσδεσή τους στις CMY.

ν. Δομική βάση της διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων από τις Val211Gly και Val211Ser υποκαταστάσεις

Με σκοπό να συσχετισθούν οι παρατηρούμενες βιοχημικές ιδιότητες των ενζύμων CMY-2, CMY-30 και CMY-42 με τυχόν δομικές αλλαγές κατά την διάρκεια της κατάλυσης που επάγονται από τις δύο παραπάνω υποκαταστάσεις προσομοιώθηκαν ελεύθερα ένζυμα, ακυλ-ένζυμα αυτών με την κεφταζιδίμη και ομοιοπολικά τους σύμπλοκα με το μη χειρόμορφο βορονικό ανάλογο της κεφταζιδίμης (CB4) το οποίο προσομοιάζει την ρίζα οξυανιόντος της κατάστασης μετάπτωσης της απακυλίωσης. Το sp^3 υβριδισμένο άτομο βορίου στο βορονικό ανάλογο όταν είναι συνδεδεμένο στο άτομο οξυγόνου της καταλυτικής σερίνης χαρακτηρίζεται από περίσσεια αρνητικού φορτίου το οποίο κατανέμεται στις δύο υδροξυλομάδες του βορονικού οξέος. Το παραπάνω σε συνδυασμό με την τετραεδρική συμμετρία του ατόμου μπορεί να υποθεθεί ότι καθιστά το σύμπλοκο ανάλογο με την τετραεδρική ρίζα οξυανιόντος που εμφανίζεται κατά το στάδιο κατάλυσης της απακυλίωσης. Έτσι οι προσομοιώσεις ακυλ-ενζύμου κεφταζιδίμης και συμπλόκων CMY/CB4 κατέστησαν δυνατή την αναπαραγωγή του σταδίου της απακυλίωσης.

Για κάθε σύμπλοκο προσομοιώθηκαν δύο κατηγορίες ριζών με τη μία να αφορά τη φορτισμένη μορφή της Lys67 και την άλλη την ουδέτερη μορφή. Κάθε σύστημα παρουσίαζε παρόμοια συμπεριφορά και σταθεροποιήθηκε σε διάστημα 1 - 2 ns από την έναρξη της προσομοίωσης όπως εκτιμήθηκε από τις μεταβολές της δυναμικής ενέργειας, των RMSD και της συνολικής προσβάσιμης σε διαλύτη επιφάνειας της πρωτεΐνης (ASA). Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές ASA των τριών ενζύμων βρέθηκε ότι η CMY-30 παρουσίαζε μεγαλύτερη επιφάνεια στο διαλύτη από ότι τα άλλα δύο ένζυμα. Συγκρίνοντας τις αντίστοιχες τιμές για τα ενεργά κέντρα των ενζύμων παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές δεν ήταν τόσο εκτεταμένες γεγονός που υποδείκνυε ότι η Val211Gly υποκατάσταση προκαλούσε αλλαγές σε περιοχές απομακρυσμένες από το ενεργό κέντρο. Οι όποιες αλλαγές της ASA στο ενεργό κέντρο οφείλονταν σε αύξηση της υδρόφιλης επιφάνειας της περιοχής δέσμευσης των R1 πλευρικών αλυσίδων των κεφαλοσπορινών ενώ στις προσομοιώσεις ουδέτερης Lys67 παρατηρήθηκε αύξηση και στην R2 θέση δέσμευσης στο ελεύθερο ένζυμο και στο ακυλ-ένζυμο της CMY-30. Αύξηση στην ASA στην R2 επικράτεια παρουσίασε και η CMY-42 η οποία ήταν μικρότερου βαθμού (Πίνακας 17).

Η ανάλυση του δικτύου δεσμών υδρογόνου του ενεργού κέντρου των τριών κεφαλοσπορινασών (Πίνακας 18) ανέδειξε κάποιες διαφορές μεταξύ των ενζύμων που υδρόλυαν οξυμίμο υποστρώματα και της CMY-2. Εξετάστηκε η ισχύς των δεσμών υδρογόνου που δημιουργεί το υδροξύλιο της καταλυτικής Ser64 με την Tyr150 (a) και την Lys67 (b), αυτών που σχηματίζει η Tyr150 με την Lys67 (c) και την Lys315 (d), μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας της Lys67 και της αντίστοιχης της Asn152 (f) ή του οξυγόνου του καρβονυλίου του σκελετού της Ala220 (e), μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των Asn152 και Gln120 (g) και των Lys315 και Thr316 (k). επίσης, στα σύμπλοκα κεφαζιδιμής και βορονικού οξέος εκτιμήθηκε η ισχύς των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει το οξυγόνο του καρβονυλίου στο ακύλ-ένζυμο και του υδροξυλίου στο βορονικό οξύ με τις αμίδες των Ser64 (h) και Ser318 (i) της οπής οξυανιόντος. Τέλος, στις προσομοιώσεις του βορονικού οξέος μετρήθηκαν οι δεσμοί υδρογόνου ανά δευτερόλεπτο που σχηματίζει το βορονικό υδροξύλιο που βρίσκονταν εκτός της οπής οξυανιόντος με την Tyr150 (j). Το οξυγόνο της ομάδας αυτής είναι αντίστοιχο με αυτό του υδρολυτικού νερού στην τετραεδρική ρίζα οξυανιόντος της κατάστασης μετάπτωσης της απακυλίωσης.

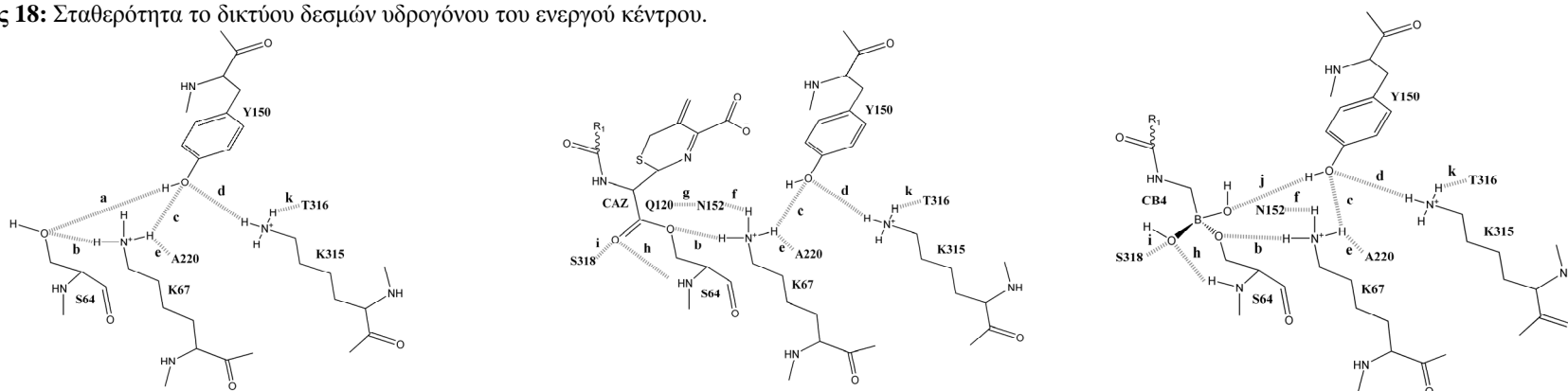
Πίνακας 16: Ιδιότητες των συστημάτων κατά τις προσομοιώσεις

System	RMSD (nm)	ASA (nm ²)	R _g (nm)	S ²	τ _{eq} (ps)	ASASA ^{h/philic} (nm ²)	ASASA ^{h/phobic} (nm ²)
CMY-2/apo/K67 P^d	0.11 (0.02)	172.7 (2.3)	1.99 (0.006)	0.91 (0.12)	2183 (521)	12.5 (0.5)	6.6 (0.4)
CMY-2/apo/K67 N^e	0.11 (0.02)	169.5 (2.2)	1.97 (0.005)	0.90 (0.12)	2179 (521)	11.5 (0.5)	5.8 (0.3)
CMY-30/apo/K67 P	0.11 (0.01)	172.1 (2.2)	1.96 (0.006)	0.91 (0.10)	2147 (558)	13.7 (0.5)	6.9 (0.4)
CMY-30/apo/K67 N	0.13 (0.02)	176.9 (1.2)	1.99 (0.005)	0.90 (0.13)	2198 (504)	12.0 (0.6)	6.1 (0.4)
CMY-42/apo/K67 P	0.11 (0.01)	173.0 (2.2)	1.97 (0.006)	0.91 (0.11)	2100 (502)	12.7 (0.5)	6.6 (0.4)
CMY-42/apo/K67 N	0.12 (0.02)	171.5 (1.6)	1.98 (0.005)	0.90 (0.13)	2150 (525)	12.1 (0.5)	5.9 (0.3)
CMY-2/CAZ/K67 P	0.10 (0.01)	167.9 (1.0)	1.96 (0.005)	0.91 (0.11)	2186 (520)	12.4 (0.7)	6.5 (0.3)
CMY-2/CAZ/K67 N	0.12 (0.02)	168.9 (1.4)	1.96 (0.005)	0.90 (0.11)	2189 (510)	12.5 (0.6)	6.3 (0.4)
CMY-30/CAZ/K67 P	0.13 (0.01)	174.3 (2.0)	1.97 (0.005)	0.91 (0.13)	2184 (514)	13.4 (0.6)	7.1 (0.3)
CMY-30/CAZ/K67 N	0.10 (0.01)	172.4 (1.1)	1.96 (0.007)	0.91 (0.12)	2193 (520)	12.8 (0.6)	6.6 (0.4)
CMY-42/CAZ/K67 P	0.12 (0.01)	170.9 (1.8)	1.96 (0.005)	0.90 (0.11)	2199 (518)	12.6 (0.4)	6.8 (0.3)
CMY-42/CAZ/K67 N	0.12 (0.01)	170.5 (1.1)	1.96 (0.007)	0.90 (0.12)	2184 (511)	12.5 (0.5)	6.6 (0.3)
CMY-2/CB4/K67 P	0.09 (0.01)	167.6 (2.1)	1.96 (0.005)	0.91 (0.11)	2192 (515)	11.9 (0.5)	6.1 (0.3)
CMY-2/CB4/K67 N	0.10 (0.01)	167.1 (1.2)	1.96 (0.006)	0.91 (0.11)	2201 (518)	12.5 (0.6)	6.2 (0.4)
CMY-30/CB4/K67 P	0.12 (0.01)	173.5 (1.2)	1.97 (0.005)	0.90 (0.12)	2092 (504)	12.8 (0.4)	6.5 (0.3)
CMY-30/CB4/K67 N	0.12 (0.01)	173.0 (1.9)	1.96 (0.004)	0.91 (0.12)	2184 (523)	12.6 (0.6)	6.6 (0.3)
CMY-42/CB4/K67 P	0.11 (0.01)	169.5 (1.2)	1.96 (0.005)	0.91 (0.11)	2153 (529)	12.2 (0.5)	6.3 (0.4)
CMY-42/CB4/K67 N	0.13 (0.01)	168.0 (1.9)	1.96 (0.005)	0.91 (0.11)	2194 (535)	12.4 (0.5)	6.2 (0.4)

Για κάθε ιδιότητα του συστήματος δίνονται μέσοι όροι που των τιμών που χαρακτηρίζουν τις διαμορφώσεις που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ενώ στην περίπτωση του χρόνου συσχέτισης τ_{eq} ο μέσος όρος αφορά τις τιμές για κάθε αμινοξύ της πρωτεΐνης. Στις παρενθέσεις δίνονται οι τυπικές αποκλίσεις.

Πίνακας 17: Υδρόφιλες και υδρόφοβες επιφάνειες πρόσβασης στις θέσεις δέσμευσης R1 και R2 των ενεργών κέντρων

System	R1 Site ASA^{h/philic} (Å²)	R1 Site ASA^{h/phobic} (Å²)	R2 Site ASA^{h/philic} (Å²)	R2 Site ASA^{h/phobic} (Å²)
CMY-2/apo/K67 P^a	333 (24)	618 (49)	346 (35)	815 (49)
CMY-2/apo/K67 N^b	328 (28)	590 (46)	290 (26)	663 (40)
CMY-30/apo/K67 P	401 (26)	730 (50)	354 (27)	825 (49)
CMY-30/apo/K67 N	399 (20)	697 (35)	350 (24)	817 (41)
CMY-42/apo/K67 P	350 (25)	662 (50)	332 (27)	810 (51)
CMY-42/apo/K67 N	361 (17)	630 (29)	330 (24)	789 (31)
CMY-2/CAZ/K67 P	361 (22)	716 (56)	279 (27)	563 (34)
CMY-2/CAZ/K67 N	359 (18)	749 (40)	274 (20)	485 (29)
CMY-30/CAZ/K67 P	392 (18)	694 (46)	268 (20)	559 (31)
CMY-30/CAZ/K67 N	401 (29)	688 (38)	427 (23)	897 (41)
CMY-42/apo/K67 P	370 (21)	715 (50)	300 (38)	532 (51)
CMY-42/apo/K67 N	365 (18)	700 (38)	380 (29)	765 (47)
CMY-2/CB4/K67 P	353 (23)	586 (31)	228 (27)	510 (32)
CMY-2/CB4/K67 N	327 (21)	630 (29)	278 (30)	561 (47)
CMY-30/CB4/K67 P	411 (33)	705 (51)	225 (21)	515 (29)
CMY-30/CB4/K67 N	422 (28)	714 (39)	230 (20)	544 (36)
CMY-42/apo/K67 P	362 (22)	689 (33)	220 (22)	550 (38)
CMY-42/apo/K67 N	345 (26)	655 (48)	261 (24)	520 (32)

Πίνακας 18: Σταθερότητα του δικτύου δεσμών υδρογόνου του ενεργού κέντρου.**Σύστημα****Δεσμοί υδρογόνου ανά ps^a**

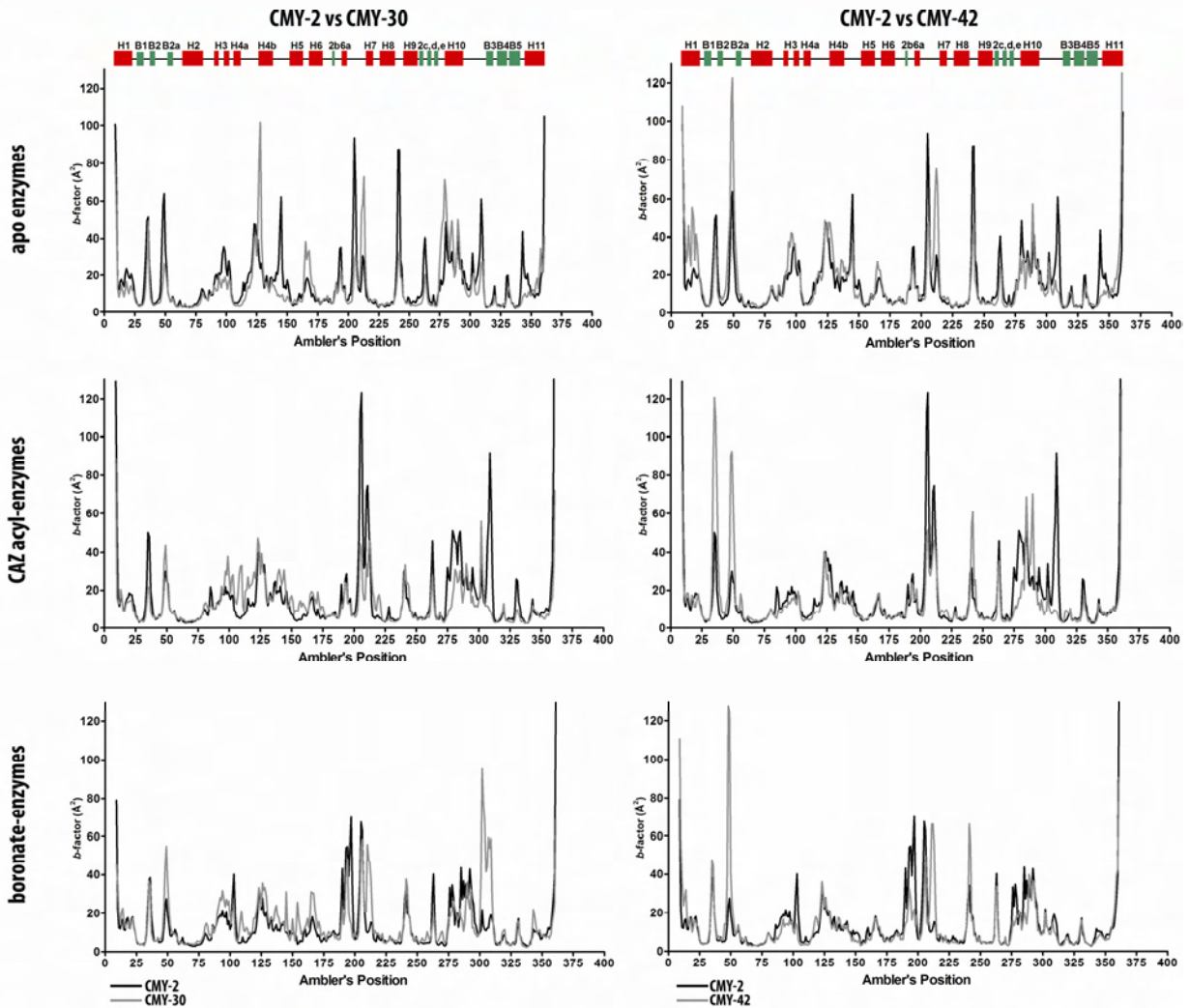
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
CMY-2/apo/K67 P^d	0.077	0.013	0.189	0.243	0.713	0.842	0.214	----	----	----	0.000
CMY-2/apo/K67 N^e	0.324	0.644	0.059	0.178	0.272	0.684	0.097	----	----	----	0.145
CMY-30/apo/K67 P	0.000	0.401	0.000	0.020	0.132	0.774	0.030	----	----	----	0.008
CMY-30/apo/K67 N	0.236	0.058	0.155	0.465	0.889	0.926	0.028	----	----	----	0.036
CMY-42/apo/K67 P	0.000	0.008	0.005	0.125	0.869	0.889	0.070	----	----	----	0.000
CMY-42/apo/K67 N	0.351	0.525	0.109	0.345	0.356	0.655	0.110	----	----	----	0.125
CMY-2/CAZ/K67 P	0.000	0.029	0.742	0.168	0.062	0.649	0.680	0.958	0.970	----	0.000
CMY-2/CAZ/K67 N	0.000	0.256	0.872	0.472	0.317	0.956	0.014	0.950	0.986	----	0.000
CMY-30/CAZ/K67 P	0.000	0.637	0.223	0.000	0.013	0.653	0.044	0.896	0.978	----	0.000
CMY-30/CAZ/K67 N	0.000	0.696	0.961	0.107	0.000	0.954	0.019	0.868	0.966	----	0.000
CMY-42/CAZ/K67 P	0.000	0.026	0.015	0.001	0.697	0.779	0.025	0.630	0.960	----	0.000
CMY-42/CAZ/K67 N	0.000	0.184	0.558	0.539	0.344	0.738	0.038	0.545	0.670	----	0.000
CMY-2/CB4/K67 P	0.000	0.899	0.004	0.594	0.942	0.821	0.785	0.987	0.994	0.137	0.080
CMY-2/CB4/K67 N	0.000	0.127	0.656	0.168	0.632	0.938	0.033	0.133	0.325	0.689	0.184
CMY-30/CB4/K67 P	0.000	0.931	0.029	0.410	0.946	0.910	0.770	0.988	0.991	0.958	0.521
CMY-30/CB4/K67 N	0.000	0.000	0.769	0.054	0.000	0.963	0.000	0.002	0.765	0.970	0.025
CMY-42/CAZ/K67 P	0.000	0.860	0.025	0.384	0.796	0.942	0.154	0.956	0.982	0.780	0.312
CMY-42/CAZ/K67 N	0.000	0.985	0.821	0.250	0.000	0.954	0.008	0.142	0.332	----	0.000

Υπολογίστηκαν ως μέσοι όροι του συνόλου των δεσμών που δημιουργεί η κάθε αλληλεπιδρούσα ομάδα με την άλλη χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του GROMACS αναφορικά με την επιτρεπόμενη γεωμετρία για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου.

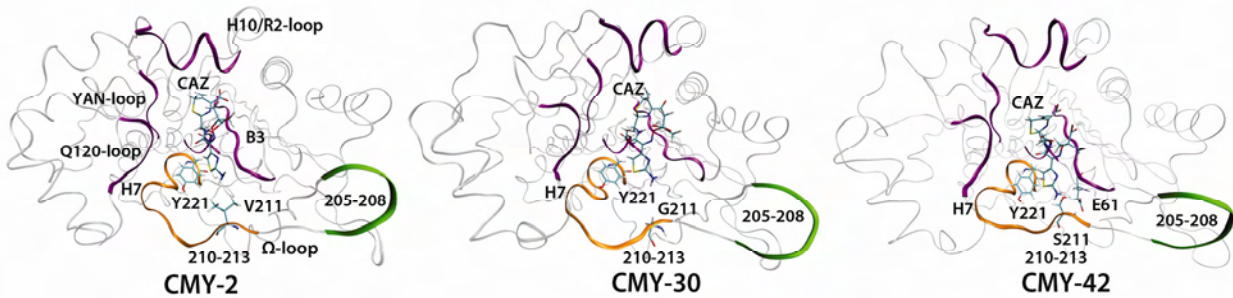
Η κατάσταση πρωτονίωσης της Lys67 επηρέαζε σημαντικά την ισχύ των παραπάνω δεσμών υδρογόνου. Αναφορικά με τα ελεύθερα ένζυμα και το ακύλ-ένζυμο της κεφταζιδίμης, φαίνεται ότι η ουδέτερη μορφή της Lys67 στις προσομοιώσεις της παρούσας μελέτης αναπαρήγαγε περισσότερο πιστά της παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις στις κρυσταλλογραφικές δομές των ενζύμων AmpC σε ελεύθερη κατάσταση και σε ακύλ-ένζυμα με οξυμμένο υποστρώματα. Στις προσομοιώσεις των συμπλόκων των βορονικών οξέων όταν η Lys67 ήταν ουδέτερη, το υδροξύλιο που ήταν αντίστοιχο του οξυανιόντος δεν αλληλεπιδρούσε με τις αμίδες των Ser64 και Ser318. Συνυπολογίζοντας την ανολογία των συμπλόκων αυτών με την ρίζα μετάπτωσης της απακυλίωσης και τον μηχανισμό του σταδίου αυτού στις κεφαλοσπορινάσες (παρουσιάστηκε στο γενικό μέρος), η Lys67 στις ρίζες αυτές πρέπει να είναι πρωτονιωμένη. Η περαιτέρω ανάλυση των προσομοιώσεων ελεύθερων ενζύμων και ακύλ-ενζύμων αφορούσε αυτές στις οποίες η Lys67 ήταν ουδέτερη ενώ για τα βορονικά οξέα επιλέχθηκαν οι προσομοιώσεις στις οποίες η Lys67 ήταν θετικά φορτισμένη. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ ενζύμων εκτεταμένου φάσματος και CMY-2 στην πλειονότητά τους δεν ήταν κοινές για τις CMY-30 και CMY-42, οπότε δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το πώς οι αλλαγές αυτές επιδρούν στην λειτουργία των ενζύμων. Οι μόνες ομοιότητες που παρουσιάστηκαν αφορούσαν τον δεσμό υδρογόνου μεταξύ της Tyr150 και Lys315 ο οποίος ήταν λιγότερο συχνός στις προσομοιώσεις των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος και αυτόν μεταξύ της Tyr150 και του υδροξυλίου του βορονικού οξέος που είναι ανάλογο του υδρολυτικού νερού ο οποίος ήταν περισσότερο ισχυρός στα ένζυμα Val211 και Ser211 από ότι στην CMY-2 (Πίνακας 18).

Εκτίμηση των θερμικών παραγόντων του πρωτεϊνικού σκελετού αποκάλυψε όμως μία κοινή δυναμική συμπεριφορά των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος. Τόσο η CMY-30 όσο και η CMY-42 στην περιοχή 210-213 της θηλειάς Ω εμφανίζονταν περισσότερο ευέλικτες από τη CMY-2 παρουσιάζοντας υψηλότερους παράγοντες *b* στις προσομοιώσεις ελευθέρων ενζύμων και συμπλόκων με το βορονικό οξύ ενώ η περιοχή 203-205 ήταν περισσότερο σταθερή στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος (Εικόνα 23A). Αντίθετα, στις προσομοιώσεις του ακύλ-ενζύμου της κεφταζιδίμης, η περιοχή γύρω από το αμινοξύ 211 ήταν περισσότερο σταθερή στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος από ότι στην CMY-2 (Εικόνα 23A) αλλά τώρα η Tyr221 και το αμινοτελικό άκρο της H7 έλικας

A



B

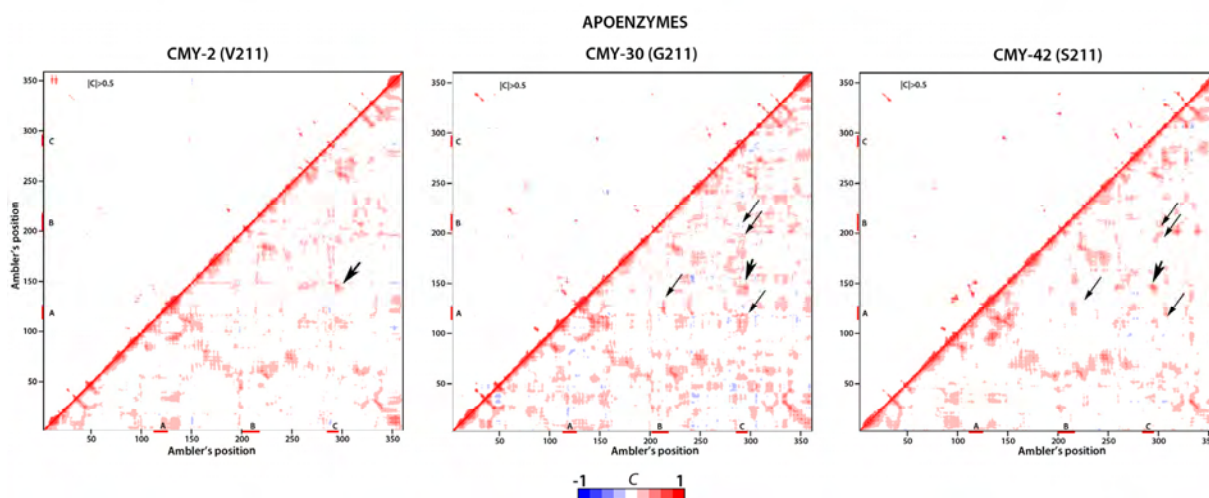


Εικόνα 23: A) Προφίλ των θερμικών παραγόντων των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού των τριών ενζύμων σε ελεύθερη και συμπλοκοποιημένη κατάσταση όπως προέκυψαν από την ανάλυση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Σε κάθε στήλη συγκρίνονται το προφίλ των ριζών της CMY-2 με αυτά της CMY-30 (αριστερά) και της CMY-42 (δεξιά). Στην κορυφή κάθε στήλης φαίνεται η δευτεροταγής δομή των ενζύμων. B) Τριτοταγής δομή των ακύλ-ενζύμων κεφταζιδίμης (μέσες δομές) όπου φαίνονται τα τμήματα της θηλείας Ω οι κινήσεις των οποίων επηρεάζονται από τις δύο υποκαταστάσεις (πορτοκαλί: αύξηση θερμικών κινήσεων, πράσινο μείωση θερμικών κινήσεων).

παρουσίαζαν μεγαλύτερη ευελιξία στις CMY-30 και CMY-42. Η θηλειά που συνδέει τις B2 και B2α β-αλυσίδες στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος ήταν συνήθως λιγότερο σταθερή με την CMY-42 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη ευελιξία. Το προφίλ των παραγόντων *b* έδειξε επίσης ότι ο πρωτεϊνικός σκελετός στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος ήταν περισσότερο ευέλικτος ειδικά στην περιοχή γύρω από την Gln120 (θηλειά 120) και στην περιοχή της θηλειάς R2 και της H10 α-έλικας (Εικόνα 23A).

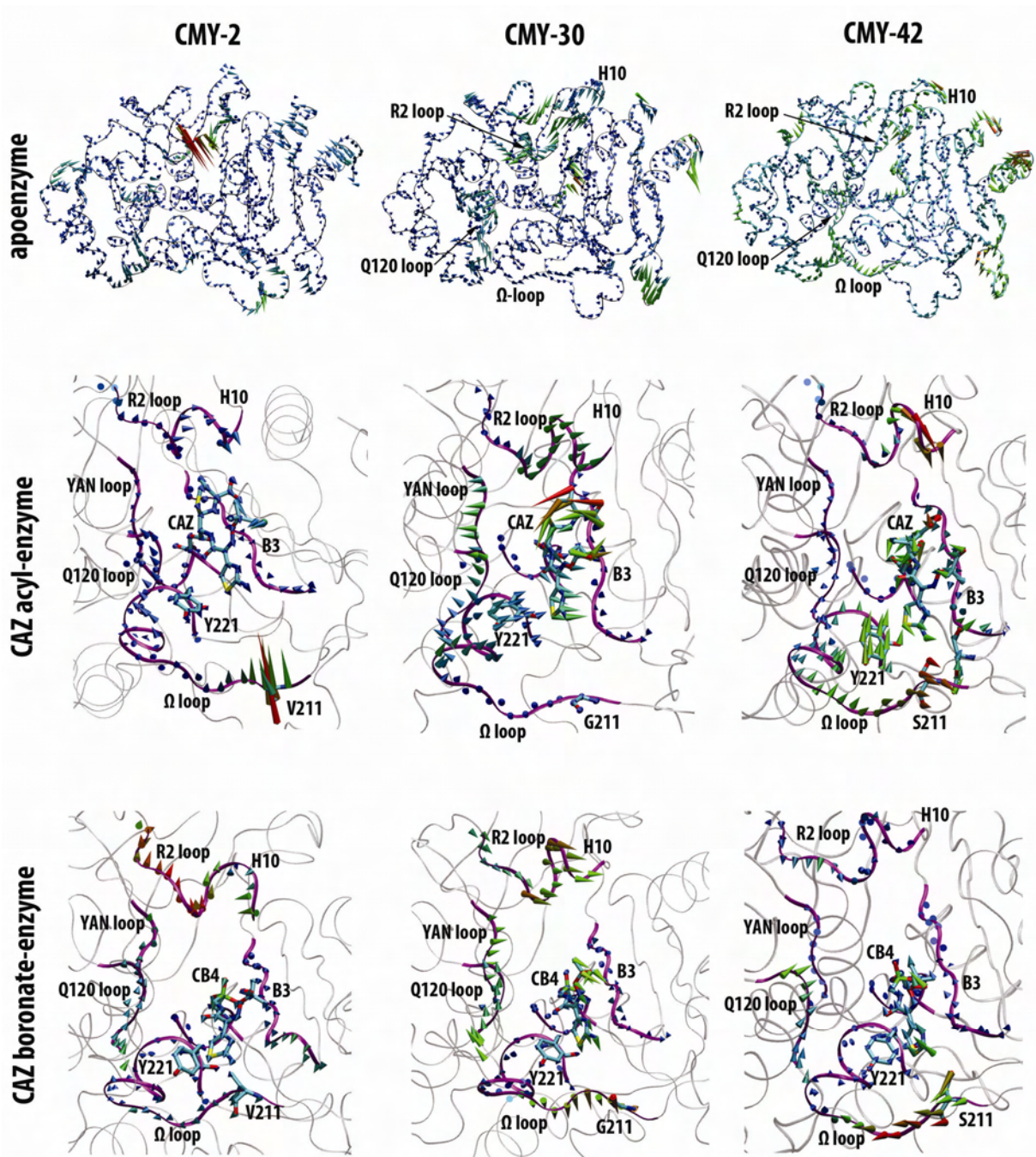
Ανάλυση των ελαχιστοποιημένων μέσων δομών που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις ανέδειξε πιθανές αιτίες για τις παραπάνω επιδράσεις των υποκαταστάσεων Val211Gly και Val211Ser. Στην περίπτωση του ενζύμου με βαλίνη στην θέση 211 η Tyr221 περιοριζόταν και δεν μπορούσε να εκτελέσει κινήσεις ενώ στο ένζυμο με γλυκίνη στην θέση αυτή οι βαθμοί ελευθερίας του αμινοξέος 221 αυξάνονταν εξαιτίας της μη ύπαρξης πλευρικής αλυσίδας. Παράλληλα, η δυνατότητα για πολλές διαμορφώσεις των πεπτιδικών δεσμών που συμμετέχει γλυκίνη ενδεχομένως προκάλεσε επίσης αύξηση στην συχνότητα των κινήσεων του σκελετού στο συγκεκριμένο σημείο. Το ίδιο συνέβαινε και στην περίπτωση του ενζύμου με σερίνη στην θέση 211 η πλευρική αλυσίδα της οποίας απομακρύνονταν από την αντίστοιχη της Tyr221 και εμφάνιζε στιγμές αλληλεπίδρασης με αυτή του Glu61 (Εικόνα 23B). Οι υψηλότεροι βαθμοί ελευθερίας της θηλειάς Ω και της H7 έλικας λόγω της διάρρηξης της επιφάνειας 211-221 στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος αποτυπώνονταν στη μεγαλύτερη ευελιξία των δομών αυτών η οποία εξαρτώνταν από το είδος του μορίου που ήταν δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο.

Η ανάλυση συνδιακύμανσης ώστε να ερμηνευθούν οι παρατηρούμενες ατομικές μετατοπίσεις αποκάλυψε επίσης κοινά μοτίβα στα ένζυμα με ικανότητα υδρόλυσης οξυίμινο υποστρωμάτων. Στις τρεις κεφαλοσπορινάσες η θηλειά Ω, η θηλειά 120 και η H10 α-έλικα/R2 θηλειά εκτελούσαν κινήσεις προς την ίδια κατεύθυνση όπως έδειξε η διασυσχέτιση των μετατοπίσεων των αμινοξικών καταλοίπων (Εικόνα 24). Στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος η συνδεδεμένη αυτή κίνηση ήταν περισσότερο έντονη με την σταθερά διασυσχέτισης των μετατοπίσεων της θηλειάς Ω και της 120 θηλειάς να πλησιάζει τη μονάδα στην περίπτωση της CMY-30 (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Χάρτες διασυσχέτισης αμινοξέος-αμινοξέος με τους οποίους αποτυπώνεται η σχέση των μετατοπίσεων του πρωτεϊνικού σκελετού μεταξύ των διαφόρων περιοχών στα ελεύθερα ένζυμα των τριών CMY. Θετική σταθερά συσχέτισης δηλώνει κίνηση προς την ίδια κατεύθυνση και αρνητική μετατοπίσεις προς αντίθετες κατευθύνσεις. Με βέλη σημειώνονται οι περιοχές που εμφάνισαν έντονη συζευγμένη κίνηση στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος. A: θηλειά 120 (αμινοξέα 112-125), B: θηλειά Ω/H7 έλικα (αμινοξέα 200-221), Γ: H10/R2 θηλειά (αμινοξέα 285-295). Τα μεγάλα βέλη δηλώνουν την συσχέτιση των κινήσεων μεταξύ της R2 θηλειάς και της περιοχής του καταλυτικού μοτίβου Y₁₅₀AN που ήταν έντονη και στα 3 ένζυμα.

Οι ατομικές μετατοπίσεις των βαρέων ατόμων ελεύθερων και συμπλοκοποιημένων ενζύμων στα κύρια ιδιοδιανύσματα που προέκυψαν από την ανάλυση PCA έδειξαν ότι πράγματι οι δομές αυτές εμφάνιζαν έντονη συζευγμένη κίνηση στα ένζυμα CMY-30 και CMY-42. Στα ελεύθερα ένζυμα η H10 έλικα/R2 θηλειά πραγματοποιούσε έντονες κινήσεις εντός και εκτός του ενεργού κέντρου στην CMY-2 ενώ στις CMY-30 και CMY-42 οι κύριες μετατοπίσεις της αφορούσαν κίνηση παράλληλα προς το ενεργό κέντρο (Εικόνα 25). Η κίνηση αυτή γίνονταν παράλληλα με τις μετατοπίσεις της θηλειάς 120 και της θηλειάς Ω οι οποίες ήταν περισσότερο έντονες στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος (Εικόνα 25). Στα ακυλένζυμα της κεφταζιδίμης οι παραπάνω δομές που δημιουργούν τα όρια του ενεργού κέντρου κινούνταν επίσης ταυτόχρονα, με τις μετατοπίσεις τους να σχετίζονται με αυτές του δεσμευμένου υποστρώματος. Οι κινήσεις της κεφταζιδίμης ήταν επίσης συζευγμένες με αυτές της πλευρικής αλυσίδας της Tyr221. Αντίθετα στην CMY-2 η κεφταζιδίμη και το ενεργό κέντρο ήταν σχετικά ακίνητα με την μόνη κίνηση που παρατηρήθηκε να αφορά αυτή της



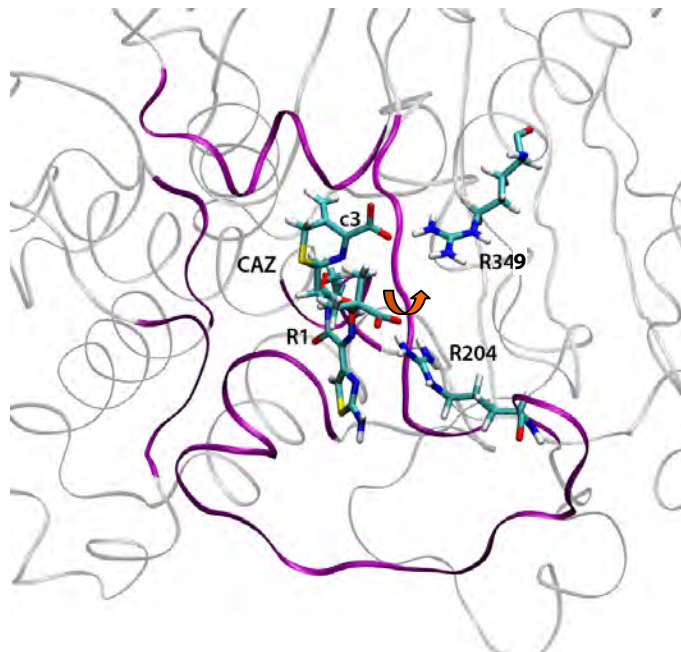
Εικόνα 25: Διαγράμματα στα οποία αποτυπώνονται οι κύριες ατομικές κινήσεις που παρατηρήθηκαν στις προσομοιώσεις. Παρουσιάζονται οι κινήσεις του πρώτου ιδιοδιανύσματος που εξηγούσαν >20% των ατομικών μετατοπίσεων. Φαίνονται οι συζευγμένες κινήσεις μεταξύ θηλειάς Ω/H7 έλικας – Q120 θηλειάς – R2 θηλειάς/H10 έλικας. Επίσης είναι εμφανής η αύξηση των δονήσεων των δεσμευμένων μορίων και η συσχέτιση της κίνησής τους με τα αμινοξέα της θέσης 211 και την Tyr221.

πλευρικής αλυσίδας της βαλίνης 211 λόγω της δράσης του δακτυλίου αμινοθειαζόλης της R1 πλευρικής αλυσίδας (Εικόνα 25). Η κίνηση αυτή απουσίαζε από το σύμπλοκο της CMY-2 με το βορονικό ανάλογο της κεφταζιδίμης. Εφόσον η κύρια δομική διαφορά μεταξύ κεφταζιδίμης και του βορονικού αναλόγου της είναι η ύπαρξη του δακτυλίου διυδροθειαζίνης, στην κεφταζιδίμη μπορεί να υποτεθεί ότι η έντονη κίνηση που εμφάνισε η πλευρική αλυσίδα της Val211 στο ακυλένζυμο της CMY-2 οφείλεται στη άσκηση "πίεσης" από τον δακτύλιο αυτό στη θηλειά Ω μέσω της R1 πλευρικής αλυσίδας. Στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος η τάση αυτή μεταφερόταν στην Tyr221 η οποία, μέσω των μετατοπίσεων της, επέτρεπε στην κεφταζιδίμη να κινηθεί. Η μεγαλύτερη ευελιξία του ενεργού κέντρου των CMY-30 και CMY-42 αποτυπώθηκε και στις κινήσεις που εκτελούσαν τα σύμπλοκα των ενζύμων με το βορονικό οξύ του οποίου η R1 πλευρική αλυσίδα μπορούσε να κινηθεί στον χώρο μεταξύ των αμινοξέων 211 και 221 (Εικόνα 25).

Τα κοινά δυναμικά χαρακτηριστικά των παραπάνω δομών στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος πιθανότατα οδηγούν στις παρατηρούμενες βιοχημικές ιδιότητες. Με σκοπό να εξακριβωθούν ενδεχόμενες επιπτώσεις των αλλαγών αυτών κατά την αλληλεπίδραση τους με τα δεσμευμένα υποστρώματα, αναλύθηκαν οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις των καρβοξυλίων της κεφταζιδίμης στο στάδιο του ακύλ-ενζύμου με κατάλοιπα του ενεργού κέντρου. Το C4 καρβοξύλιο της κεφταζιδίμης αλληλεπιδρά μέσω γέφυρας ιόντος με το γουανίδιο της πλευρικής αλυσίδας της Arg349. Η αλληλεπίδραση αυτή κατά το στάδιο ακυλίωσης είναι σημαντική για την πορεία της αντίδρασης όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, ενώ το καρβοξύλιο της οξυμίμο αλυσίδας μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Arg204 της θηλειάς Ω (Εικόνα 26). Επειδή υπάρχει η δυνατότητα για περιστροφή γύρω από τον δεσμό οξυγόνου της οξυμίμο υποκατάστασης και του άνθρακα στον οποίο δεσμεύεται το καρβοξύλιο ενδέχεται να υφίστανται και αλληλεπιδράσεις μεταξύ της R1 αλυσίδας με την Arg349.

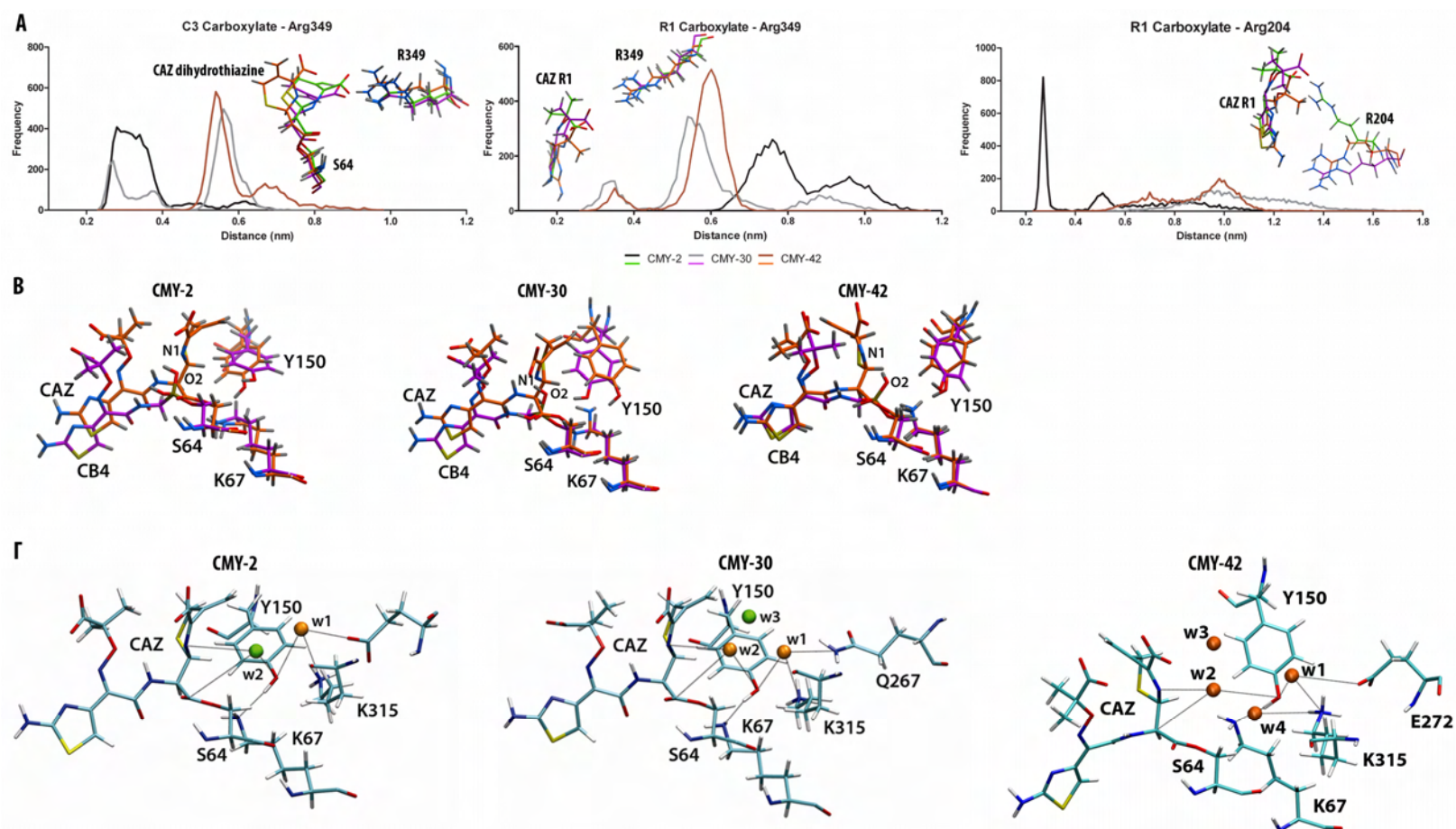
Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι το C4 καρβοξύλιο της κεφταζιδίμης στην CMY-2 αλληλεπιδρούσε ισχυρά με την Arg349 ενώ στην CMY-30 υπήρχαν δομές όπου δεν δημιουργούνταν η γέφυρα αλατιού (Εικόνα 27A). Στην CMY-42 κατά το διάστημα των 5 ns δεν παρατηρήθηκε αυτή η αλληλεπίδραση (Εικόνα 27A). Στο ένζυμο αυτό ο δακτύλιος διυδροθειαζίνης είχε μετατοπιστεί αρκετά από τη B3 αλυσίδα πάνω από την οποία προβάλλει η πλευρική αλυσίδα της Arg349. Στην CMY-30 η αλληλεπίδραση αυτή

ήταν λιγότερο συχνή από ότι στην CMY-2 λόγω των κινήσεων που πραγματοποιούσε ο δακτύλιος διυδροθειαζίνης.



Εικόνα 26: Ιοντικές αλληλεπιδράσεις της κεφταζιδίμης με το ενεργό κέντρο της CMY-2 στη ρίζα ακύλ-ενζύμου.

Αντίθετα, στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος η Arg349 αλληλεπιδρούσε σε κάποιες σπάνιες δομές της προσομοίωσης με το καρβοξύλιο της R1 πλευρικής αλυσίδας κάτι που δεν συνέβαινε στην CMY-2 (Εικόνα 27A). Η ευελιξία της κεφταζιδίμης αποτυπώνονταν δηλαδή και στην δυνατότητα για περιστροφικές κινήσεις της κάρβοξυδιμεθύλ ομάδας της R1 πλευρικής αλυσίδας. Το καρβοξύλιο της R1 στην CMY-2 εμφάνιζε ισχυρή αλληλεπίδραση με την Arg204 ενώ στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος οι δύο δομές ήταν αρκετά απομακρυσμένες λόγω της περιστροφής της R1 σε συνδυασμό με την τοποθέτηση της αργινίνης σε αυτά (Εικόνα 27A). Εκτιμώντας τα παραπάνω αποτελέσματα συνολικά, φαίνεται ότι στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις της κεφταζιδίμης εξασθενούν σημαντικά. Οι διαφορές όμως που παρατηρήθηκαν στις σταθερές αναστολής των βορονικών αναλόγων της κεφταζιδίμης δεν ήταν τόσο εκτεταμένες. Δομική ανάλυση των ακύλ-ενζύμων και των συμπλόκων με το βορονικό οξύ αποκάλυψε ότι στις CMY-30 και CMY-42 ο δακτύλιος της αμινοθειαζόλης σχημάτιζε δεσμούς υδρογόνου με την Ser212 στην πρώτη περίπτωση και



Εικόνα 27: Α) Κατανομές συχνότητας αποστάσεων μεταξύ των καρβοξυλίων της κεφαζιδίμης και καταλοίπων αργινίνης του ενεργού κέντρου των τριών ενζύμων. Απόσταση μικρότερη των 0.4 nm αντιστοιχεί στη δημιουργία ιοντικών δεσμών μεταξύ των δύο ομάδων. Φαίνεται η εξασθένιση των ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυλίων της διυδροθειαζίνης και της οξίμινο πλευρικής αλυσίδας με τις Arg349 και Arg204 αντίστοιχα στα ΕΦ ένζυμα. Β) Σύγκριση των πιο συχνών δομών των ακύλ-ενζύμων κεφαζιδίμης με τα σύμπλοκα των βορονικών αναλόγων αυτής (CB4). Τα κοινά άτομα της CAZ και του CB4 (αλλά και τα άτομα του συνόλου του ενεργού κέντρου) τοποθετούνταν σχεδόν με τον ίδιο τρόπο στα ΕΦ ένζυμα. Γ) Υδατικό περιβάλλον στην β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού στα ακύλ-ένζυμα κεφαζιδίμης. Απεικονίζονται στιγμιότυπα των προσομοιώσεων όπου το σύνολο των θέσεων υδάτωσης κάθε ενζύμου έχει κατειληφθεί από μόρια νερού. Φαίνεται μόνο το άτομο οξυγόνου των μορίων αυτών το οποίο έχει χρωματιστεί σύμφωνα με τον χρόνο παραμονής (residence time, τ). Είναι πράσινο $\tau = 0 - 50$ ps και πορτοκαλί $\tau = 50 - 1000$ ps.

την Ser211 στην δεύτερη, ενώ στην CMY-2 αντίστοιχοι δεσμοί υδρογόνου δεν παρατηρήθηκαν. Η περιορισμένη ελάττωση της συγγένειας που παρατηρήθηκε στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος έναντι των οξυμίμο υποστρωμάτων πιθανότατα οφείλεται στην εξασθένηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων λόγω της μεγαλύτερης ευελιξίας του ενεργού κέντρου σε συνδυασμό με την μείωση της συχνότητας των ιοντικών αλληλεπιδράσεων η οποία όμως αντισταθμίζονταν από τους παραπάνω δεσμούς υδρογόνου. Οι προσομοιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν επέτρεπαν τον ακριβή υπολογισμό των ενεργειών αλληλεπίδρασης (απαιτούνται προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής όπου συνυπολογίζονται και οι ενέργειες διαλυτοποίησης).

Σύγκριση των περισσότερο συχνών διαμορφώσεων του ενεργού κέντρου στο ακύλ-ένζυμο της κάθε CMY με τη μέση δομή του αντίστοιχου συμπλόκου του βορονικού οξέος αποκάλυψε έναν πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου οι CMY-30 και CMY-42 αποκτούν αυξημένη ενεργότητα κατά την υδρόλυση των οξυμίμο υποστρωμάτων. Τόσο τα άτομα του πρωτεϊνικού σκελετού του ενεργού κέντρου όσο και το σύνολο των βαρέων ατόμων του διέφεραν λιγότερο ως προς τη θέση τους από τα αντίστοιχα άτομα του ενεργού κέντρου στο σύμπλοκο CMY/βορονικού στην περίπτωση των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος σε σύγκριση με τη CMY-2 (Πίνακας 19, Εικόνα 27B). Η παραπάνω ομοιότητα παρατηρήθηκε και για τα κοινά άτομα της κεφταζιδιμης με το βορονικό ανάλογο, στην περίπτωση δέ της CMY-42 η θέση τους ταυτίζονταν σχεδόν απόλυτα (Εικόνα 27B). Υπενθυμίζοντας ότι το σύμπλοκο του βορονικού αναλόγου της κεφταζιδιμης αντιστοιχεί στην κατάσταση μετάπτωσης της απακυλίωσης αυτής, η παραπάνω παρατήρηση οδηγεί στην υπόθεση ότι στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος το ενεργό κέντρο στην ρίζα ακύλ-ενζύμου παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα με το ενεργό κέντρο της ρίζας απακυλίωσης. Δηλαδή, η αύξηση της υδρολυτικής ικανότητας επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της συχνότητας με την οποία εμφανίζονται οι διαμορφώσεις που βρίσκονται πλησιέστερα στην κατάσταση μετάπτωσης. Η δυνατότητα για απόκτηση αυτών των διαμορφώσεων από τα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος οφείλεται στη μεγαλύτερη ευελιξία τους σε σημεία του ενεργού κέντρου που είναι σημαντικά για την τοποθέτηση της κεφταζιδιμης σε δομές που θα προσομοιάζουν το σύμπλοκο υδρολυτικής προσβολής.

Πράγματι, στις υπερτοποθετημένες δομές των συμπλόκων κεφταζιδίμης και βορονικού παρατηρήθηκε ότι η απόσταση μεταξύ του οξυγόνου του υδροξυλίου του βορονικού οξέος που είναι ανάλογο αυτού του υδρολυτικού νερού στην τετραεδρική ρίζα απαकुλίωσης και του αζώτου του δακτυλίου διυδροθειαζίνης ήταν μεγαλύτερη στις CMY-30 και CMY-42 από ότι στην CMY-2 (Πίνακας 19). Έχει υποθεθεί ότι η σχετικά αδυναμία υδρόλυσης των οξυμίμο υποστρωμάτων από τις οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση της δημιουργίας της τετραεδρικής ρίζας της απαकुλίωσης από το άζωτο του ανοιγμένου β-λακταμικού δακτυλίου στο στάδιο του ακυλενζύμου το οποίο δεν επιτρέπει την πρόσβαση του υδρολυτικού νερού. Έτσι φαίνεται ότι οι διαφορετικές δυναμικές ιδιότητες των CMY-30 και CMY-42 οδηγούν στην λιγότερο παρεμποδισμένη πρόσβαση μορίων νερού στην β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού του ακύλ-ενζύμου.

Πίνακας 19: Σύγκριση των περισσότερων συχνών διαμορφώσεων του ακύλ-ενζύμου της κεφταζιδίμης με την κατάσταση μετάπτωσης της απαकुλίωσης.

	Cluster	%N	RMSD από το σύμπλοκο CB4 (Å) ^a	$d_{\text{CAZ N1-CB4 O2}}$ (Å)
CMY-2	1	52.1	2.31/1.55	1.40
	2	21.3	2.10/1.45	1.20
	3	15.0	2.21/1.49	1.60
	4	4.7	2.30/1.65	1.45
	5	3.7	2.00/1.20	2.10
CMY-30	1	66.1	1.75/1.03	2.10
	2	23.8	1.68/0.78	1.92
	3	6.3	1.86/1.01	1.50
	4	1.7	1.52/0.73	1.88
	5	1.0	1.89/0.96	1.68
CMY-42	1	55.9	1.83/1.11	2.70
	2	23.9	1.61/1.26	4.08 ^b
	3	6.8	1.60/1.28	3.51 ^b
	4	4.3	1.66/1.32	4.34 ^b
	5	0.3	2.03/1.47	2.10

a: Η μέση ελεχιστοποιημένη δομή κάθε συμπλόκου με το CB4 χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση RMS η οποία έγινε επί της θέσης των βαρέων ατόμων του ενεργού κέντρου (πρώτη τιμή) και αυτής των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού του ενεργού κέντρου (δεύτερη τιμή).

b: Στις διαμορφώσεις αυτές του ακύλ-ενζύμου της CMY-42 (35% του συνόλου των διαμορφώσεων) το οξυγόνο της ακυλομάδας του εστερικού δεσμού βρίσκονταν εκτός της οπής οξυανιόντος.

Ανάλυση του υδατικού περιβάλλοντος στην β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού αποκάλυψε ότι πράγματι στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος υπάρχει δυνατότητα για είσοδο περισσότερων μορίων νερού τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλότερους

χρόνους παραμονής (Εικόνα 27Γ). Έτσι, ενώ στην CMY-2 στην β-επιφάνεια αναγνωρίστηκαν 2 θέσεις υδάτωσης οι οποίες δεν καταλαμβάνονταν ποτέ ταυτόχρονα από μόρια νερού (με αυτήν που βρίσκεται πιο κοντά στον εστερικό δεσμό [w1] να χαρακτηρίζεται από χρόνο παραμονής μικρότερο από 50 ps λόγω της παρεμπόδισης που υφίσταται από τον δακτύλιο διυδροθειαζίνης), στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος ανιχνεύθηκαν περισσότερες αντίστοιχες θέσεις με μεγαλύτερους χρόνους παραμονής (Εικόνα 27B). Στην CMY-30 η μετατόπιση της Tyr150 (η θέση αυτή στο ένζυμο Gly211 εμφάνιζε αυξημένες δονήσεις, Εικόνα 25 YAN-loop, Εικόνα 27B) και αυτές του δακτυλίου διυδροθειαζίνης περιόριζαν σε μικρότερο βαθμό την είσοδο μορίων νερού ενώ στην CMY-42 αυτό επιτυγχάνονταν με την αλλαγή στην θέση του δακτυλίου διυδροθειαζίνης (Εικόνα 27B). Το ακυλένζυμο της CMY-42 χαρακτηρίζονταν από άφθονη παρουσία μορίων νερού στην β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού, λόγω της τοποθέτησης του δακτυλίου διυδροθειαζίνης, η οποία τοποθέτηση όμως είχε ένα τίμημα: στο 35% των διαμορφώσεων του ακύλ-ενζύμου της CMY-42 το καρβονύλιο της κεφταζιδίμης βρίσκονταν εκτός της οπής οξυανιόντος (Πίνακας 19) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της κατάστασης μετάπτωσης. Έτσι λοιπόν αν και το ένζυμο με σερίνη στην θέση 211 παρουσίαζε πρακτικά μη-παρεμποδισμένη προσέγγιση των υδρολυτικών νερών δεν είχαν όλες οι διαμορφώσεις ικανότητα για κατάλυση, γεγονός που αποτυπώθηκε στην περιορισμένη αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης της κεφταζιδίμης ($0,5 \text{ s}^{-1}$ στην CMY-42 έναντι $0,35 \text{ s}^{-1}$ στην CMY-30).

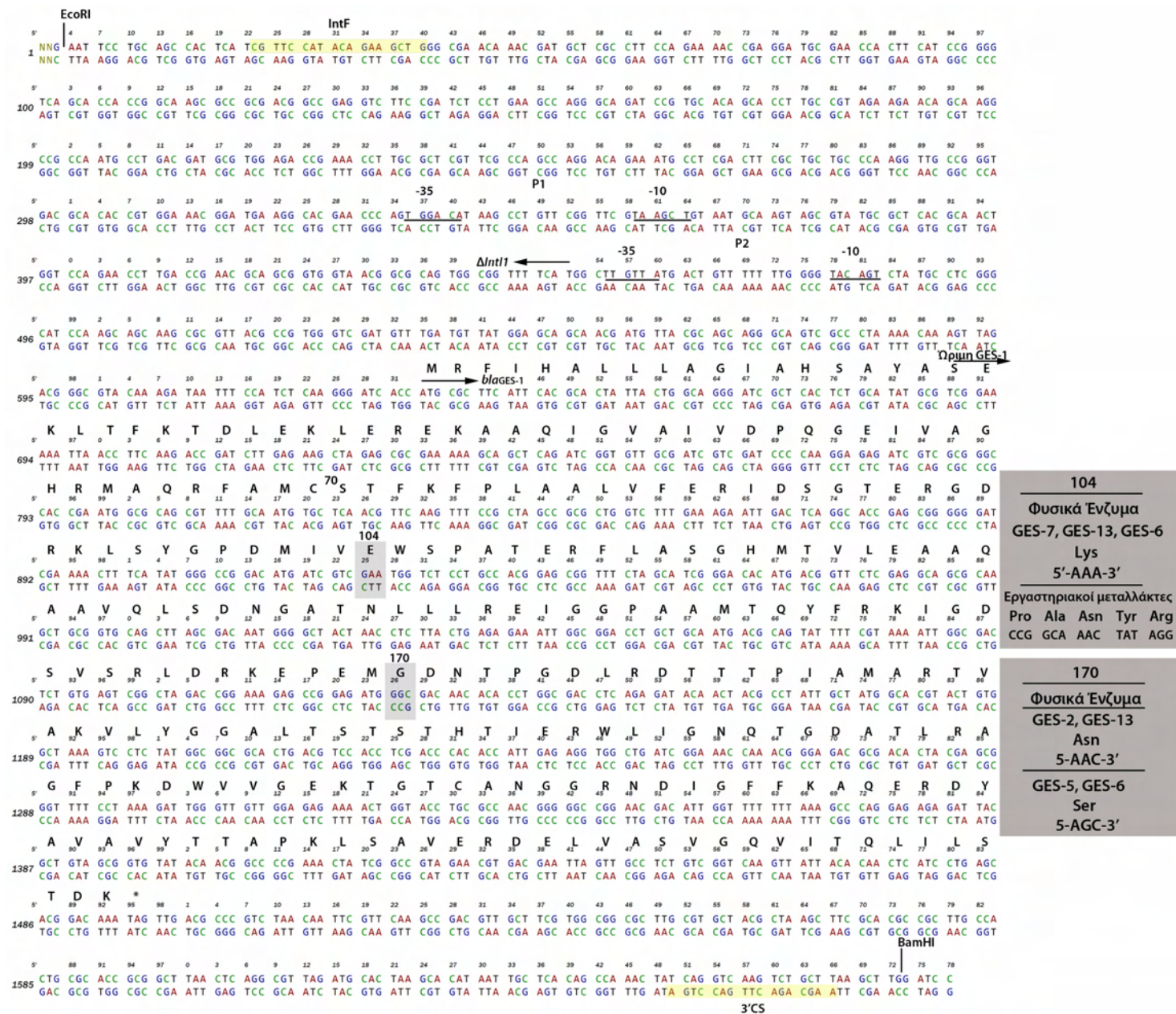
B. Επίδραση των φυσικών μεταλλάξεων που απαντούν στις θέσεις 104 και 170 στο φάσμα υποστρωμάτων των ενζύμων τύπου GES.

i. Κλωνοποίηση των γονιδίων bla_{GES-1} bla_{GES-2} bla_{GES-5} bla_{GES-7} bla_{GES-13} και bla_{GES-6} στα πλασμιδιακά οχήματα pACYC-184 και pBC-SK(+/-)

Το γονίδιο της GES-1 β-λακταμάσης ήταν κλωνοποιημένο στο πλασμιδιακό όχημα υψηλού αριθμού αντιγράφων pBC-SK (+/-). Το παράγωγο αυτό προέκυψε μέσω διασύνδεσης στις θέσεις EcoRI και BamHI στο pBC-SK του τμήματος που είχε κλωνοποιηθεί στο πλασμιδιακό όχημα pMON-38201 και αντιστοιχούσε στο προϊόν PCR που ανακτήθηκε με τους εκκινητές IntF - 3'CS κατά την ενίσχυση περιοχής του ιντεγκρονίου τάξης I που απαντούσε στο χρωμόσωμα της *P. aeruginosa* 555 και έφερε το γονίδιο της GES-1 ως μοναδική κασσέτα (GeneBank: AF329699). Η αλληλουχία του κλωνοποιημένου γενετικού τόπου που φέρει το παράγωγο C10 παρουσιάζεται στην Εικόνα 1. Η παραγωγή της GES-1 σε στελέχη *E. coli* DH5a που αντέγραφαν το C10 ελέγχονταν σε μεταγραφικό επίπεδο από τους υποκινητές P1 και P2 που παρέχονται από το ιντεγκρόνιο και οδηγούν σε συνεχή έκφραση του γονιδίου. Στην Εικόνα 1 φαίνεται επίσης η αμινοξική αλληλουχία της GES-1. Επισημαίνεται ότι η αρίθμηση κατά Ambler των αμινοξέων στις βΛτΑ δεν αντιστοιχεί στην πραγματική αρίθμηση των ώριμων πρωτεϊνών. Το παραπάνω σύστημα αρίθμησης αφορά την πρωτοταγή δομή της PC1 πενικιλινάσης (πρώιμο μόριο) και εφαρμόζεται συμβατικά σε όλες τις υπόλοιπες βΛτΑ ώστε να αποφεύγονται συγχύσεις αναφορικά με τα σημαντικά για την λειτουργία του ενζύμου αμινοξέα. Στα ένζυμα τύπου GES η καταλυτική σερίνη 70 αντιστοιχεί στη θέση 46 της ώριμης πρωτεΐνης. Χρησιμοποιώντας το παραπάνω πλασμίδιο ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις μεταλλαξογόνου PCR ενότητα (2.H.i, σελίδα 185) ανακτήθηκαν τα γονίδια των φυσικών ενζύμων GES που διαφέρουν στις θέσεις 104 και 170 (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Φυσικές ποικιλίες GES που διαφέρουν στις θέσεις 104 και 170

GES	170	104
GES-1	γλυκίνη (Gly)	γλουταμικό οξύ (Glu)
GES-2	ασπαραγίνη (Asn)	γλουταμικό οξύ (Glu)
GES-5	σερίνη (Ser)	γλουταμικό οξύ (Glu)
GES-7	γλυκίνη (Gly)	λυσίνη (Lys)
GES-13	ασπαραγίνη (Asn)	λυσίνη (Lys)
GES-6	σερίνη (Ser)	λυσίνη (Lys)

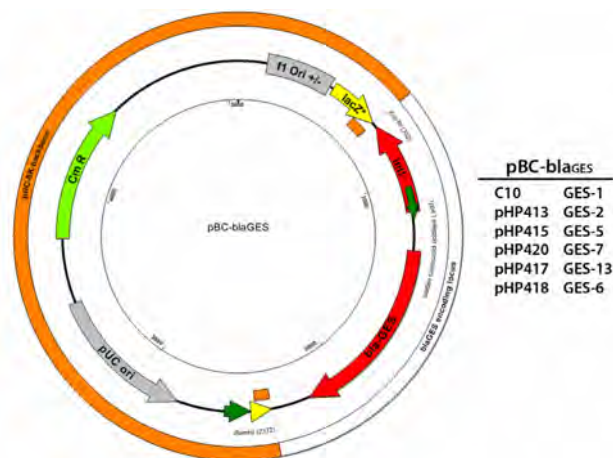


Εικόνα 1: Γενετικός τόπος που παρήγαγε τις GES και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα κλωνοποίησης. Στο περιθώριο δίνονται οι μεταλλάξεις που εισήχθησαν στα κωδικόνια 104 και 170 του γονιδίου της GES-1 ώστε να προκύψουν τα αντίστοιχα των φυσικών και εργαστηριακών ενζύμων (ενότητα Γ) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Οι εργαστηριακοί μεταλλάκτες της θέσης 104 έφεραν και τα 3 διαφορετικά αμινοξέα που απαντούν στη θέση 170 στις φυσικές GES.

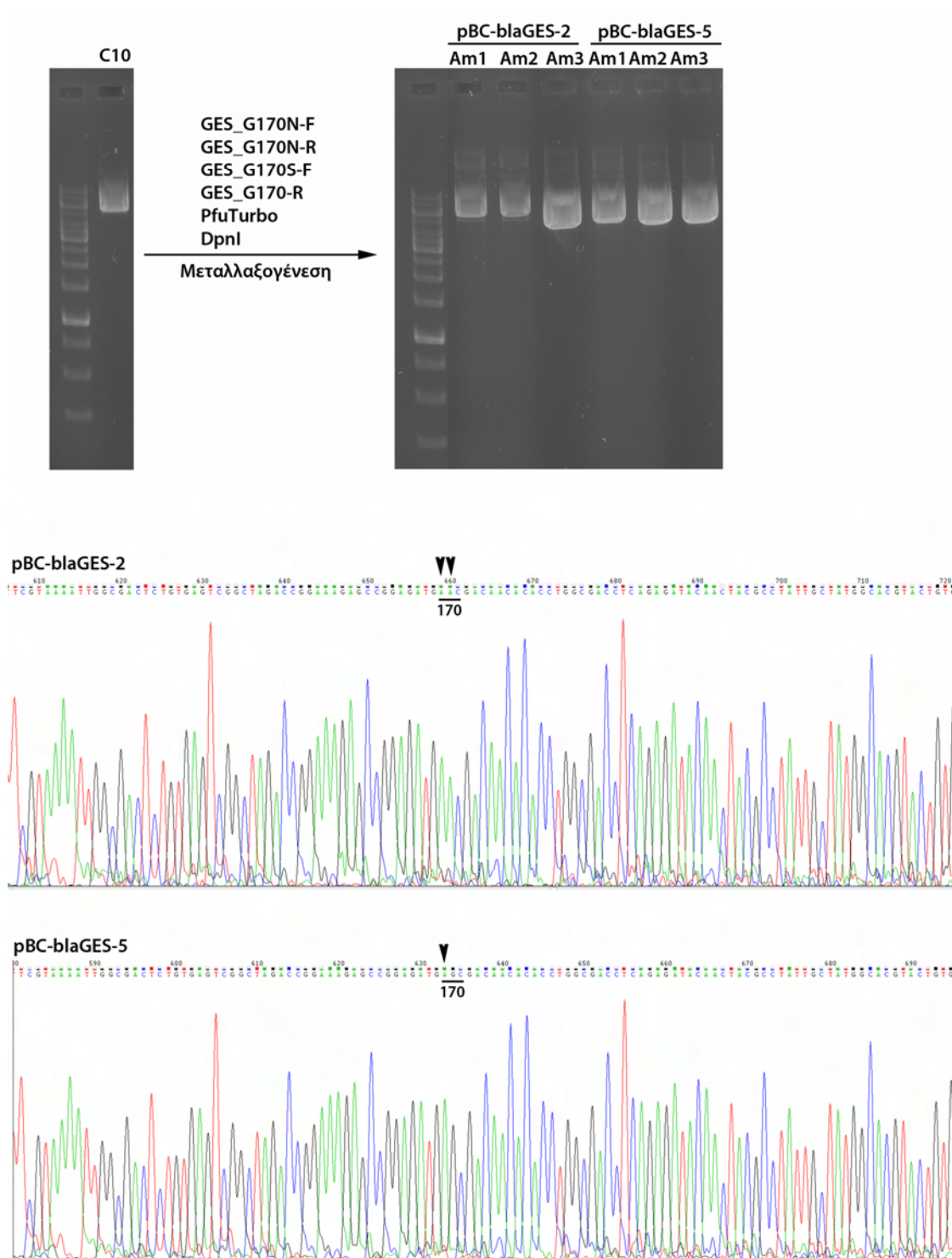
Αρχικά οι δύο πρώτες βάσεις του κωδικονίου 170 (GG) αντικαταστάθηκαν από δύο βάσεις αδενίνης ώστε να προκύψει το *bla*_{GES-2} ενώ αντίστοιχη μετάλλαξη στην πρώτη μόνο βάση έδωσε το *bla*_{GES-5} (Εικόνα 3). Τα μεταλλαγμένα παράγωγα pBC-SK που προέκυψαν από τις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα ώστε να προκύψουν τα γονίδια των GES-13 και GES-6 β-λακταμασών αντίστοιχα μέσω της μετάλλαξης A αντί G στο πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου 104 ενώ εισαγωγή της ίδιας αντικατάστασης στο γονίδιο της GES-1 επί του παραγώγου C10 έδωσε πλασμίδια που κωδικοποιούσαν για την GES-7 (Εικόνα 4). Η επιβεβαίωση των εισαγόμενων μεταλλάξεων και η απουσία τυχαίων αλλαγών στη ρυθμιστική ή στην κωδική περιοχή των γονιδίων έγινε με αλληλούχηση όπως περιγράφεται στην ενότητα 1.Η.ι. Οι φαινότυποι ευαισθησίας επιλεγμένων κλώνων που έφεραν τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων (εικόνα 2) περιγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Φαινότυποι ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* DH5a που έφεραν τα pBC-SK παράγωγα με τους γενετικούς τύπους των *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-7}, *bla*_{GES-13} και *bla*_{GES-6}.

Στέλεχος	Ζώνη αναστολής (mm)													
	AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	CTX	CRO	CAZ	FEP	ATM	FOX	IPM	MER
<i>E. coli</i> DH5a														
C10 ^{GES-1}	0	13	0	14	15	20	20	20	10	30	27	24	32	>35
pHP413 ^{GES-2}	0	26	0	22	22	27	25	25	21	>35	34	28	30	>35
pHP415 ^{GES-5}	0	10	0	13	14	21	32	30	22	>35	>35	16	25	28
pHP420 ^{GES-7}	0	12	0	0	14	20	17	17	0	28	17	23	>35	>35
pHP417 ^{GES-13}	0	19	0	13	15	28	17	15	0	30	20	28	32	34
pHP418 ^{GES-6}	0	10	0	0	10	16	27	23	12	>35	32	<10	27	28

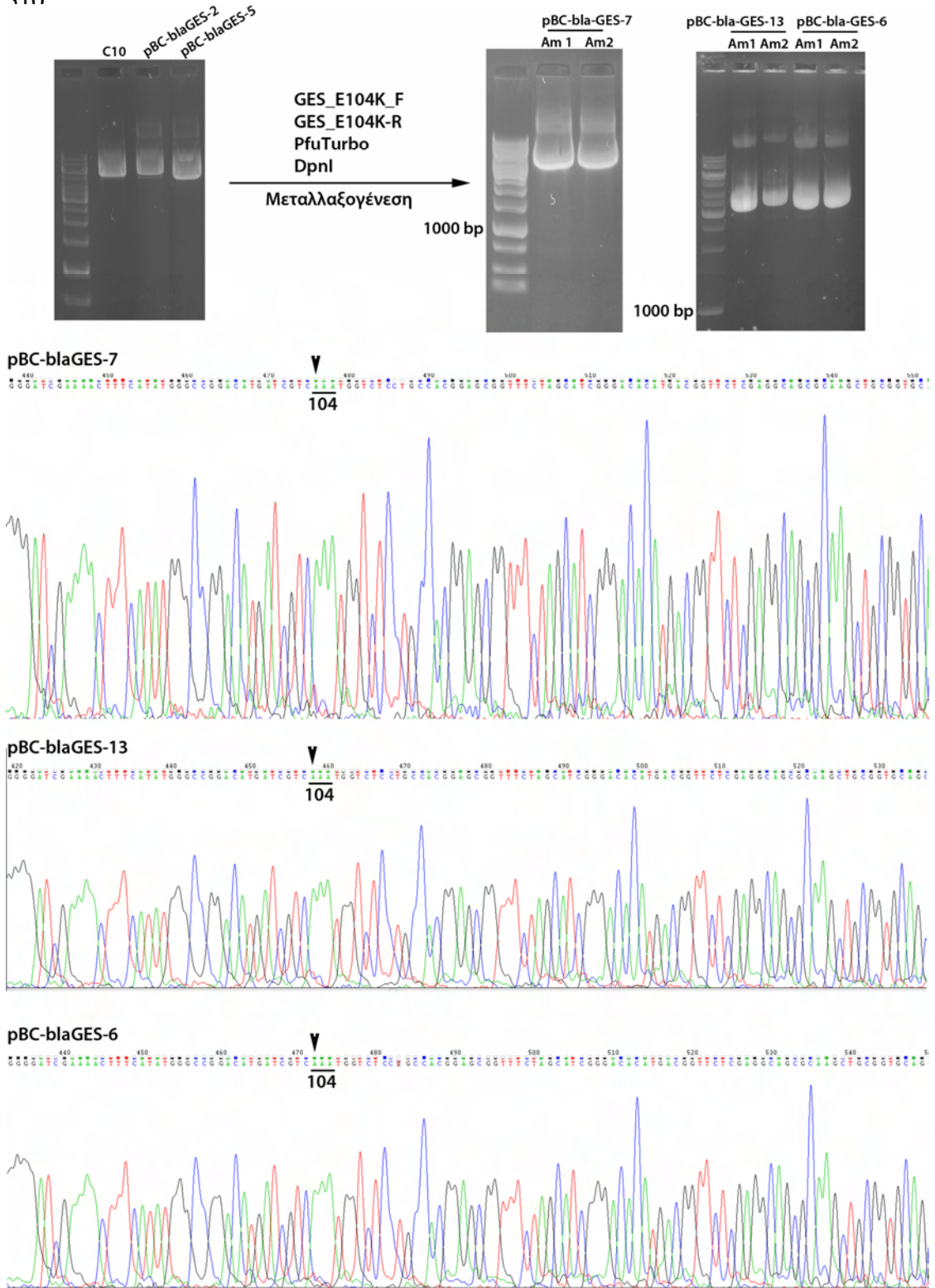


Εικόνα 2: Χάρτης pBC παραγώγων που κωδικοποιούσαν για τα γονίδια των ενζύμων GES.



Εικόνα 3: Πειράματα μεταλλαξογένεσης ώστε να προκύψουν τα γονίδια των GES-2 και GES-5. Φαίνεται η περιοχή του κωδικονίου 170 σε τυπικά ηλεκτροχρωματογραφήματα που προέκυψαν από την αλληλούχηση πλασμιδίων από τους μετασχηματισμένους κλώνους και επισημαίνονται οι εισαγόμενες μεταλλαγές.

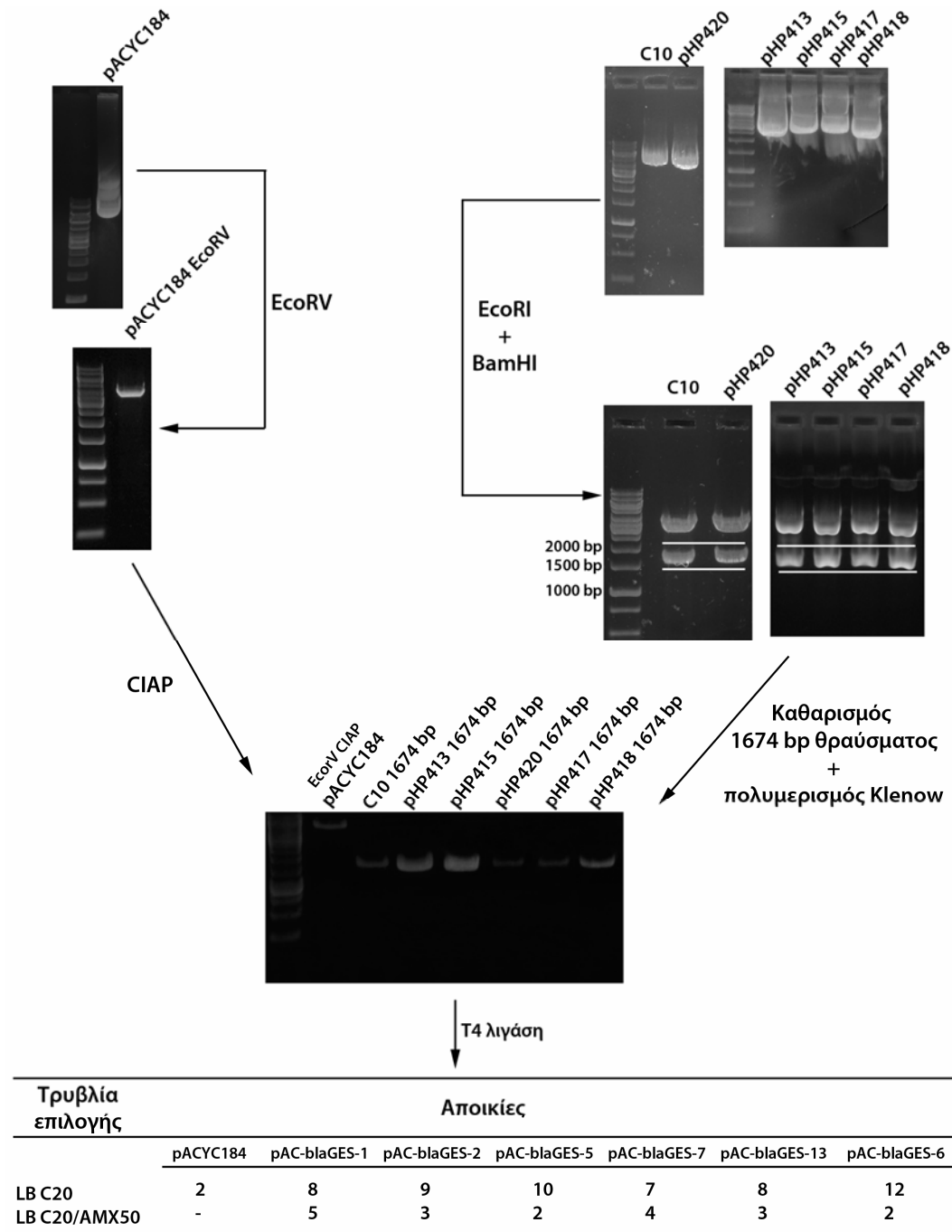
310



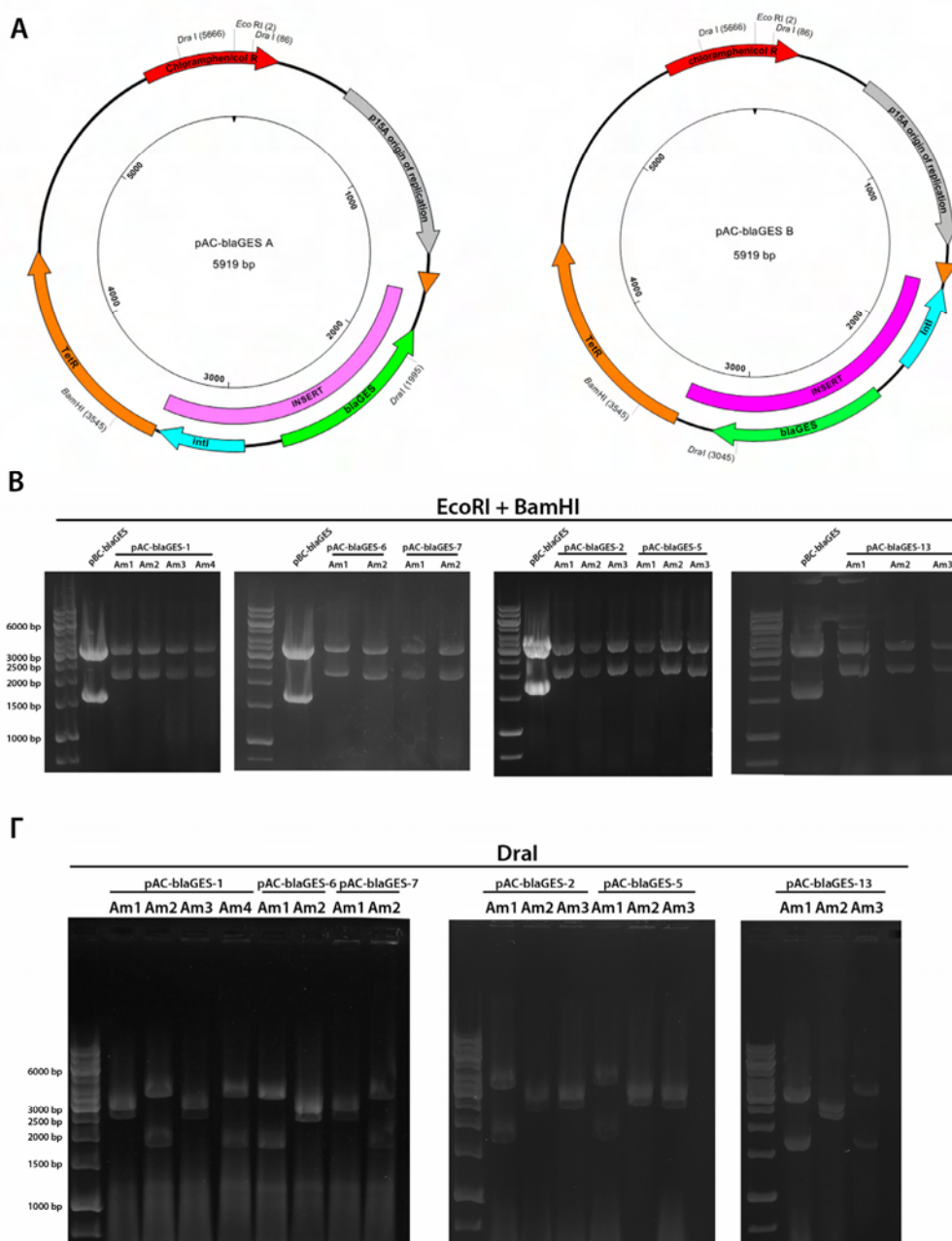
Εικόνα 4: Εισαγωγή της μετάλλαξης A αντί G στην πρώτη βάση του κωδικονίου 104 των γονιδίων των GES-1, GES-2 και GES-5 ώστε να προκύψουν τα αντίστοιχα των GES-7, GES-13 και GES-6.

Ο γενετικός τόπος που κωδικοποιούσε για τα γονίδια των ποικιλιών GES στα παραπάνω πλασμίδια υποκλωνοποιήθηκε στο όχημα χαμηλού αριθμού αντιγράφων pACYC184. Το EcoRI - BamHI θραύσμα των pBC παραγώγων που περιείχε τα *bla*_{GES} (1674 bp) διασυνδέθηκε στη θέση EcoRV του pACYC184 που εντοπίζεται στο εσωτερικό του γονιδίου αντοχής στην τετρακυκλίνη αφού πρώτα τα άκρα του υπό κλωνοποίηση τμήματος είχαν μετατραπεί σε τυφλά όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.Η.ii (σελίδα 186). Αν και η απόδοση της αντίδρασης διασύνδεσης δεν ήταν υψηλή (Εικόνα 5) επιλέχθηκαν κλώνοι στους οποίους το τμήμα GES είχε εισέλθει επιτυχώς στο πλασμιδιακό όχημα δίνοντας παράγωγα μεγέθους περίπου 5920 bp (4245 bp + 1674 bp = 5919 bp). Στα παράγωγα αυτά οι θέσεις EcoRI και BamHI δεν επαναδημιουργούνται στο σημείο εισδοχής, όμως πέψη με τα δύο παραπάνω ένζυμα μπορεί να αποκαλύψει το μέγεθος των εισερχομένων τμημάτων καθώς ο σκελετός του πλασμιδίου pACYC184 φέρει δύο μοναδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από αυτά (Εικόνα 6Α). Έτσι επίδραση των παραπάνω ενδονουκλεασών στα προϊόντα που απομονώθηκαν από τις αντιδράσεις διασύνδεσης του κάθε γενετικού τόπου των έξι γονιδίων GES απέδωσε δύο θραύσματα που αντιστοιχούν στα θεωρητικά υπολογιζόμενα τμήματα μεγέθους 3543 και 2376 bp (Εικόνα 6B).

Τα προϊόντα της παραπάνω πέψης δεν εξαρτώνται από την κατεύθυνση εισόδου του κλωνοποιημένου τμήματος (Εικόνα 6Α). Η κατεύθυνση εισόδου εξακριβώθηκε με επίδραση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης DraI η οποία αναγνωρίζει δύο θέσεις στον σκελετό του pACYC184 και μία θέση στο κλωνοποιημένο τμήμα (Εικόνα 6Α). Στην περίπτωση που ο γενετικός τόπος της β-λακταμάσης εισήλθε με κατεύθυνση τέτοια ώστε το γονίδιο να εκφράζεται σε αντίθετη κατεύθυνση με αυτό της τετρακυκλίνης που διακόπτει, η πέψη με DraI θα δώσει τρία θραύσματα μεγέθους 3671, 1909 και 339 bp (Εικόνα 6Α, pAC-*bla*_{GES} A). Στην αντίθετη περίπτωση τα αντίστοιχα θραύσματα θα είναι μεγέθους 2959, 2621 και 339 bp (Εικόνα 6Α, pAC-*bla*_{GES} B). Στα πειράματα κλωνοποίησης ανακτήθηκαν και τα δύο είδη παραγώγων (Εικόνα 6Γ) και τα μόρια της πρώτης περίπτωσης επιλέχθηκαν για την συνέχεια της μελέτης. Η ακεραιότητα των κλωνοποιημένων τμημάτων επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση και οι φαινότυποι ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* DH5a που είχαν μετασηματισθεί με τα παραπάνω παράγωγα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.



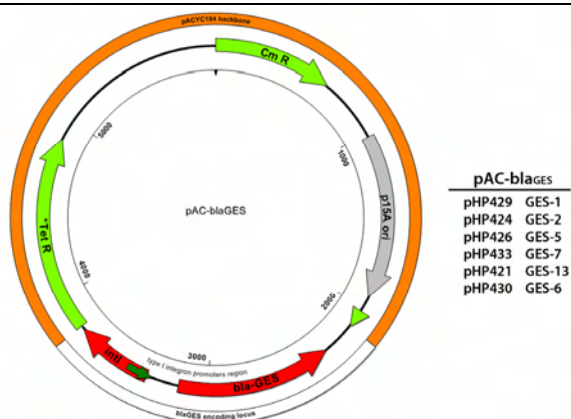
Εικόνα 5: Αντιδράσεις διασύνδεσης στο όχημα χαμηλού αριθμού αντιγράφων pACYC184 των γενετικών τύπων των γονιδίων των GES-1, GES-2, GES-5, GES-7, GES-13 και GES-6 β-λακταμασών που εντοπίζονταν στα pBC παράγωγα. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της EcoRI-BamHI πένης των pBC παραγώγων αντιστοιχεί στην ηλεκτροφόρηση σε απλή αгарόζη και όχι σε χαμηλού σημείου τήξης η οποία έλαβε χώρα πριν την απομόνωση των θραυσμάτων 1674 bp ώστε να εξακριβωθεί η απόδοση της αντίδρασης.



Εικόνα 6: Έλεγχος μεγέθους και κατεύθυνσης εισόδου των κλωνοποιημένων τμημάτων GES στο πλασμιδιακό όχημα pACYC184. Α) Χάρτης των δύο τύπων προϊόντων της αντίδρασης διασύνδεσης όπου φαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων EcoRI, BamHI και DraI. Β) Προϊόντα πέψης EcoRI και BamHI πλασμιδίων που είχαν απομονωθεί με τη μέθοδο του βρασμού. Έχει χρησιμοποιηθεί και pBC παράγωγο ως μάρτυρας δίνοντας δύο θραύσματα που αντιστοιχούν στο ευθυγραμμισμένο pBC-SK (3399 bp) και στον γενετικό τόπο των GES (1674 bp). Τα παράγωγα pACYC δίνουν επίσης δύο ζώνες που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης 3543 bp (περιέχει το κλωνοποιημένο τμήμα) και 2376 bp. Γ) Έλεγχος κατεύθυνσης εισόδου με επίδραση του ενζύμου DraI. Η ζώνη 339 bp δεν εμφανίζεται.

Πίνακας 3: Φαινότυποι ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* DH5a που έφεραν τα pACYC184 παράγωγα με τους γενετικούς τόπους των *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-7}, *bla*_{GES-13} και *bla*_{GES-6}.

Στέλεχος	Ζώνη αναστολής (mm)													
	AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TZP	CTX	CRO	CAZ	FEP	ATM	FOX	IPM	MER
<i>E. coli</i> DH5a														
pHP429 ^{GES-1}	0	20	0	24	24	34	>35	33	24	>35	>35	>35	>35	>35
pHP424 ^{GES-2}	0	28	0	28	28	>35	34	30	34	>35	>35	>35	34	>35
pHP426 ^{GES-5}	0	14	13	20	23	28	>35	>35	30	>35	>35	20	26	32
pHP433 ^{GES-7}	0	16	0	11	21	32	30	28	0	35	24	30	>35	>35
pHP421 ^{GES-13}	0	26	0	20	24	>35	26	25	15	>35	26	30	>35	>35
pHP430 ^{GES-6}	0	12	0	0	25	30	>35	33	30	>35	>35	20	34	>35



Εικόνα 7: Χάρτης pAC παραγώγων που κωδικοποιούσαν για τα γονίδια των ενζύμων GES.

Η παραγωγή των συγκεκριμένων β-λακταμασών από τους pBC και pAC κλώνους επιβεβαιώθηκε με αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση. Κάθε κλώνος εμφάνιζε μοναδική ζώνη με ενεργότητα υδρόλυσης νιτροσεφίνης που εστίαζε στις τιμές pH που δίνονται στον Πίνακα 4 (pI_μ). Η υποκατάσταση Glu104Lys προκαλούσε αύξηση στο pI κατά μία μονάδα.

Πίνακας 4: Ισοηλεκτρικά σημεία GES β-λακταμασών

Στέλεχος	GES	170	104	pI _μ	pI _θ
<i>E. coli</i> DH5a					
C10/pHP429	GES-1	Gly	Glu	5,8	5,75
pHP413/pHP424	GES-2	Asn	Glu	5,9	5,75
pHP415/pHP426	GES-5	Ser	Glu	5,9	5,75
pHP420/pHP433	GES-7	Gly	Lys	6,9	6,34
pHP417/pHP421	GES-13	Asn	Lys	6,9	6,34
pHP418/pHP430	GES-6	Ser	Lys	6,9	6,34

Τα μετρούμενα pIs των ενζύμων με γλουταμικό οξύ στη θέση 104 δεν διέφεραν σημαντικά από τα αντίστοιχα θεωρητικά που υπολογίστηκαν για τις ώριμες πρωτεΐνες με το λογισμικό ProtParam της βάσης δεδομένων ExPaSy (<http://web.expasy.org/protparam/>) σε αντίθεση με τα ένζυμα που έφεραν λυσίνη στην αντίστοιχη θέση όπου παρατηρήθηκε σταθερή διαφορά της τάξης των 0,56 μονάδων (Πίνακας 4).

Τα αντιβιογράμματα των κλώνων που παρήγαγαν τις ποικιλίες 104 και 170 των GES όταν αυτοί εκφράζονταν ισογονικά από πλασμιακά οχήματα υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων έδωσαν κάποιες ενδείξεις για την επίδραση των υποκαταστάσεων Glu104Lys, Gly170Asn και Gly170Ser στη λειτουργία των ενζύμων. Έτσι, τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 εμφάνιζαν μειωμένη ευαισθησία έναντι της ιμιπενέμης, της κεφοξιτίνης και των συνδυασμών των πενικιλινών με τους αναστολείς αυτοκτονίας κλαβουλανικό οξύ και ταζοβακτάμη σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες ενώ, ήταν περισσότερο ευαίσθητα στα οξυμίμινο αντιβιοτικά. Τα ένζυμα με ασπαραγίνη στη θέση 170 συσχετιζόνταν με μειωμένη ευαισθησία μόνο έναντι των καταρβαπενεμών ενώ ήταν περισσότερο ευαίσθητα στη δράση των αναστολέων αυτοκτονίας και των οξυμίμινο υποστρωμάτων στην περίπτωση που η θέση 104 καταλαμβάνονταν από γλουταμικό οξύ. Τα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 εμφάνιζαν έντονοτερο χαρακτήρα εκτεταμένου φάσματος οδηγώντας σε μειωμένη ευαισθησία έναντι της κεφταζιδίμης και της αζτρεονάμης. Οι ποιοτικές αυτές διαφορές εκτιμήθηκαν ακριβέστερα με τον προσδιορισμό των ελαχίστων συγκεντρώσεων αναστολής.

ii. Επίδραση των θέσεων 104 και 170 στους φαινοτύπους ευαισθησίας των φυσικών GES β-λακταμασών

Ο προσδιορισμός των φαινοτύπων ευαισθησίας στις β-λακτάμες των στελεχών που παράγουν τις GES-1, GES-2, GES-5, GES-6, GES-7 και GES-13 με τη μέθοδο E-test επιβεβαίωσε τον εκτεταμένου φάσματος χαρακτήρα αυτών των β-λακταμασών (Πίνακας 5). Η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων υπό ισογονικές συνθήκες επιτρέπει την έμμεση πλήρη αξιόπιστη σύγκριση των φασμάτων υδρόλυσης και αναστολής των παραγομένων ενζύμων.

Πίνακας 5. Τιμές MIC (μg/ml) β-λακταμικών αντιβιοτικών κατά την επίδρασή τους σε κλώνους *E. coli* που παράγουν τις διάφορες ποικιλίες GES β-λακταμασών υπό ισογονικές συνθήκες.

Αντιβιοτικό	<i>E. coli</i> (GES-1) (E104, G170)	<i>E. coli</i> (GES-7) (K104, G170)	<i>E. coli</i> (GES-2) (E104, N170)	<i>E. coli</i> (GES-5) (E104, S170)	<i>E. coli</i> (GES-6) (K104, S170)	<i>E. coli</i> (GES-13) (K104, N170)	<i>E. coli</i> DH5α (-)
Ampicillin	>256	>256	>256	>256	>256	>256	2
Amoxicillin-CLA ^a	8	32	3	16	32	3	2
Ticarcillin	>256	>256	>256	256	>256	>256	4
Ticarcillin-CLA ^b	6	>256	1.5	16	>256	8	4
Piperacillin	8	12	4	8	12	8	2
Piperacillin-TAZ ^c	1	1	1	2	2	1	1
Cefoxitin	3	3	3	16	48	3	2
Ceftazidime	8	>256	0.5	0.75	4	32	0.12
Aztreonam	0.094	2	0.032	0.032	0.094	2	0.032
Cefotaxime	1	1.5	0.75	0.125	0.125	3	0.032
Imipenem	0.25	0.125	0.50	1.5	0.50	0.25	0.064
Meropenem	0.016	0.016	0.032	0.094	0.047	0.023	0.008

Η φύση του αμινοξέος που καταλάμβανε τις θέσεις 104 και 170 επηρέαζε την ευαισθησία των ενζύμων GES στους αναστολείς "αυτοκτονίας" και συγκεκριμένα στο κλαβουλανικό οξύ. Παρατηρήθηκε ότι τα ένζυμα GES-7, GES-6, GES-5, και σε μικρότερο βαθμό το GES-1, ήταν λιγότερο ευαίσθητα στους συνδυασμούς κλαβουλανικού οξέος με την αμοξικιλίνη και την τικαρκιλλίνη απ' ό,τι τα GES-2 και GES-13. Αν και οι τιμές MIC αμοξικιλίνης και τικαρκιλλίνης υπερέβαιναν τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (ώστε να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο οι παρατηρούμενες διαφορές να οφείλονται σε αλλαγές στις υδρολυτικές ικανότητες έναντι αυτών των αντιβιοτικών) μπορεί να υποστηριχθεί ότι η σερίνη στην θέση 170 και η λυσίνη στην θέση 104 μειώνουν την ευαισθησία στο κλαβουλανικό οξύ ενώ η ασπαραγίνη στην θέση 170 είχε αντίθετη επίδραση. Σύγκριση των MIC τικαρκιλλίνης και τικαρκιλλίνης/κλαβουλανικού οξέος κατά την αναστολή στελεχών *E. coli* που έφεραν τα pBC παράγωγα προσδιορισμένες με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων έδειξε ότι η αύξηση της αντοχής στους συνδυασμούς πενικιλινών με κλαβουλανικό οξύ των ενζύμων με λυσίνη στη θέση 104 (GES-7 και GES-6) ενδέχεται να οφείλεται και σε αύξηση της υδρολυτικής ικανότητας έναντι της πενικιλίνης του συνδυασμού (ενότητα Γ). Τα στελέχη που παρήγαγαν τα ένζυμα αυτά εμφάνιζαν επίσης αυξημένα MIC κατά μία αραιώση έναντι του συνδυασμού πιπερακιλλίνης/ταζοβακτάμης.

Τα στελέχη που παρήγαγαν τις GES-5 ή GES-6 ήταν περισσότερο ανθεκτικά στην κεφοξιτίνη (αύξηση MIC 5 και 16 φορές αντίστοιχα) υποδηλώνοντας την αύξηση της υδρόλυσης έναντι αυτού του αντιβιοτικού όταν η θέση 170 καταλαμβάνεται από σερίνη. Τα στελέχη που παρήγαγαν GES ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 ήταν περισσότερο ανθεκτικά στην κεφαταζιδίμη από αυτά που έφεραν γλουταμικό οξύ, ειδικά στις περιπτώσεις όπου η θέση 170 καταλαμβάνονταν από γλυκίνη ή από ασπαραγίνη (αύξηση MIC κατά >32 και 64 φορές αντίστοιχα). Το ίδιο ίσχυε και για τα επίπεδα αντοχής στην κεφοταξίμη σε μικρότερο όμως βαθμό. Τέλος, τα στελέχη που εξέφραζαν τα γονίδια *bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-5} και *bla*_{GES-6} ήταν περισσότερο ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη και μεροπενέμη) γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη υδρόλυση των αντιβιοτικών αυτών όταν η θέση 170 καταλαμβάνεται από ασπαραγίνη ή σερίνη. Η αύξηση της αντοχής ήταν έντονη στα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 και ειδικά στην

περίπτωση παραγωγής της GES-5 όπου παρατηρήθηκε αύξηση MIC κατά 6 φορές σε σχέση με αυτήν της GES-1.

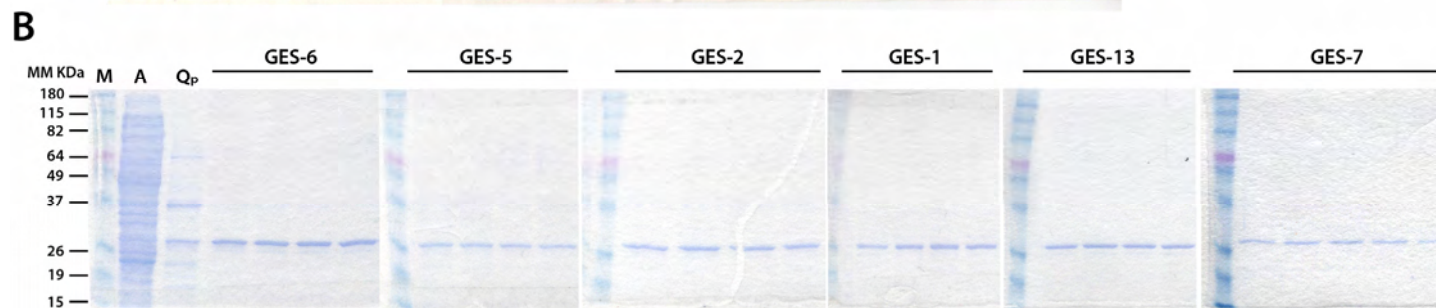
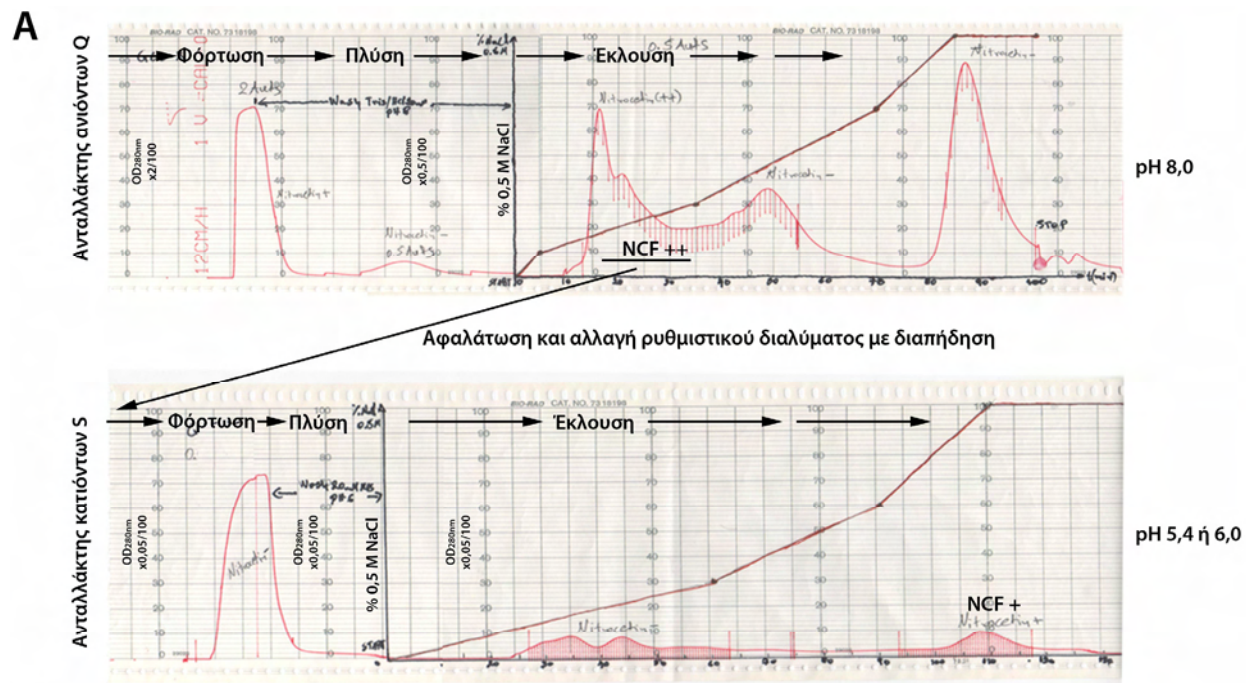
iii. Καθαρισμός των ενζύμων GES

Ακολουθώντας τα στάδια καθαρισμού που περιγράφονται στην ενότητα 2.I.iii (σελίδα 198) ανακτήθηκαν χρωματογραφήματα που είχαν τη μορφή της εικόνας 8A. Οι GES β-λακταμάσες σε pH 8 προσδένονταν στον ανταλλάκτη κατιόντων Q και εκλούονταν από αυτόν σε συγκέντρωση NaCl 80 - 100 mM. Στη συνέχεια από τα κλάσματα που ήταν εμπλουτισμένα σε β-λακταμάση το άλας απομακρύνθηκε και το ρυθμιστικό διάλυμα αντικαταστάθηκε ώστε τα ένζυμα να βρεθούν σε pH 5,4 (ένζυμα με γλουταμικό οξύ στη θέση 104) ή σε pH 6,0 (ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104), να φορτιστούν θετικά και να δεσμευθούν στην στήλη S. Από αυτή εκλούστηκαν με διάλυμα NaCl (0,4 - 0,5 M) και τα παρασκευάσματα που προέκυψαν ήταν υψηλής καθαρότητας (Εικόνα 8B). Η συγκέντρωση των παρασκευασμάτων όμως ήταν χαμηλή και απαιτήθηκε συμπύκνωσή τους όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.I.iii. Τα παρασκευάσματα που προέκυψαν διατηρούσαν την καθαρότητά τους και η συγκέντρωσή τους ήταν κατάλληλη για τα πειράματα προσδιορισμού των καταλυτικών ιδιοτήτων τους (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά τελικών παρασκευασμάτων που προέκυψαν κατά τον καθαρισμό των GES

Ένζυμο	Καθαρότητα	^a Ολική πρωτεϊνική περιεκτικότητα (μg/ml)	[GES] (μg/ml)	MM (g/mol)	[GES] (μM)
GES-1	93 %	52,29	48,63	29217,1	1,66
GES-2	94 %	45,43	42,70	29274,1	1,46
GES-5	94 %	45,14	42,43	29247,1	1,45
GES-7	95 %	20,52	19,50	29216,2	0,67
GES-13	95 %	35,14	33,38	29273,2	1,14
GES-6	95 %	90,25	85,74	29246,2	2,93

^a Αφορά την συγκέντρωση των ενωμένων και συμπυκνωμένων τελικών παρασκευασμάτων



Εικόνα 8: Α) Τυπικά χρωματογραφήματα κλασμάτωσης στους ανταλλάκτες ιόντων Q και S. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την GES-13. Τα κλάσματα με ενεργότητα νιτροσεφίνης που εκλούστηκαν από την Q ενώθηκαν αφού αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έπειτα από αντικατάσταση του διαλύματος με διαπήδηση φορτώθηκαν στην S από όπου εκλούστηκαν σε υψηλή καθαρότητα. Β) Ανάλυση SDS-PAGE των καθαρισμένων ενζύμων. M: μάρτυρας μοριακής μάζας, A: αρχικό παρασκεύασμα που φορτώθηκε στην Q, Q_p: Πρωτεϊνικό προφίλ των ενωμένων κλασμάτων που εκλούστηκαν από την στήλη Q.

iv. Βιοχημικές ιδιότητες των ενζύμων τύπου GES

α. Υδρολυτικό προφίλ

Ο προσδιορισμός των ειδικών ενεργοτήτων υδρόλυσης πενικιλίνης G, κεφαλοθίνης, κεφταζιδίμης και ιμιπενέμης που χαρακτηρίζαν μερικώς κεκαθαυμένα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα που περιείχαν τις έξι ποικιλίες GES επιβεβαίωσε τους αντίστοιχους φαινοτύπους ευαισθησίας στελεχών που παρήγαγαν τα ένζυμα. Τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 παρουσίαζαν ταχύτερη απενεργοποίηση της ιμιπενέμης σε σχέση με τις υπόλοιπες GES ενώ ελαφρώς αυξημένη ενεργότητα παρατηρήθηκε και από την GES-2 (Πίνακας 7). Τα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 υδρόλυαν ταχύτερα την κεφταζιδίμη από τα αντίστοιχα με γλουταμικό οξύ στη θέση αυτή ενώ σερίνη ή ασπαραγίνη στη θέση 170 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ενεργοτήτων. Παρατηρήθηκε επίσης πτώση στην ικανότητα κατάλυσης της υδρόλυσης της βενζυλπενικιλίνης και της κεφαλοθίνης από τα ένζυμα με ασπαραγίνη στη θέση 170 (GES-2 και GES-13).

Πίνακας 7: Υδρολυτικό προφίλ των φυσικών ενζύμων GES

Υπόστρωμα	Ειδική ενεργότητα nmol/min/mg ολικής πρωτεΐνης					
	GES-1 (E104 G170)	GES-2 (E104 N170)	GES-5 (E104 S170)	GES-7 (K104 G170)	GES-13 (K104 N170)	GES-6 (K104 S170)
Πενικιλίνη G (400 μM)	3065 (100) ^a	895 (100)	4876 (100)	1835 (100)	908 (100)	2917 (100)
Κεφαλοθίνη (100 μM)	5068 (165)	833 (93)	2612 (54)	10242 (558)	832 (92)	2285 (78)
Κεφταζιδίμη (40 μM)	336 (11)	10 (1,1)	ΔΕ ^β	3020 (165)	175 (19)	121 (4,2)
Ιμιπενέμη (100 μM)	4 (0,1)	12 (1,3)	53 (1,1)	6 (0,3)	4 (0,4)	31 (1,1)

^a Στις παρενθέσεις δίνονται οι σχετικές ενεργότητες ως προς την υδρόλυση πενικιλίνης G σε ποσοστά %

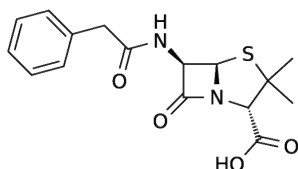
^β Δεν εκτιμήθηκε λόγω πολύ χαμηλής υδρόλυσης

β. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών υδρόλυσης

Χρησιμοποιώντας τα ομογενή παρασκευάσματα των ενζύμων GES προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές υδρόλυσης αντιπροσώπων από τις διάφορες κατηγορίες β-λακταμικών αντιβιοτικών όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.K.iii. Οι

σταθερές κατάλυσης που παρατηρήθηκαν ήταν σε συμφωνία με τους φαινοτύπους ευαισθησίας και με το παραπάνω υδρολυτικό προφίλ ενώ αποκάλυψαν πιθανούς ρόλους των αμινοξέων στις θέσεις 104 και 170 κατά τις αλληλεπιδράσεις τους με τις β-λακτάμες.

1. Πενικιλίνη G (PEN G)

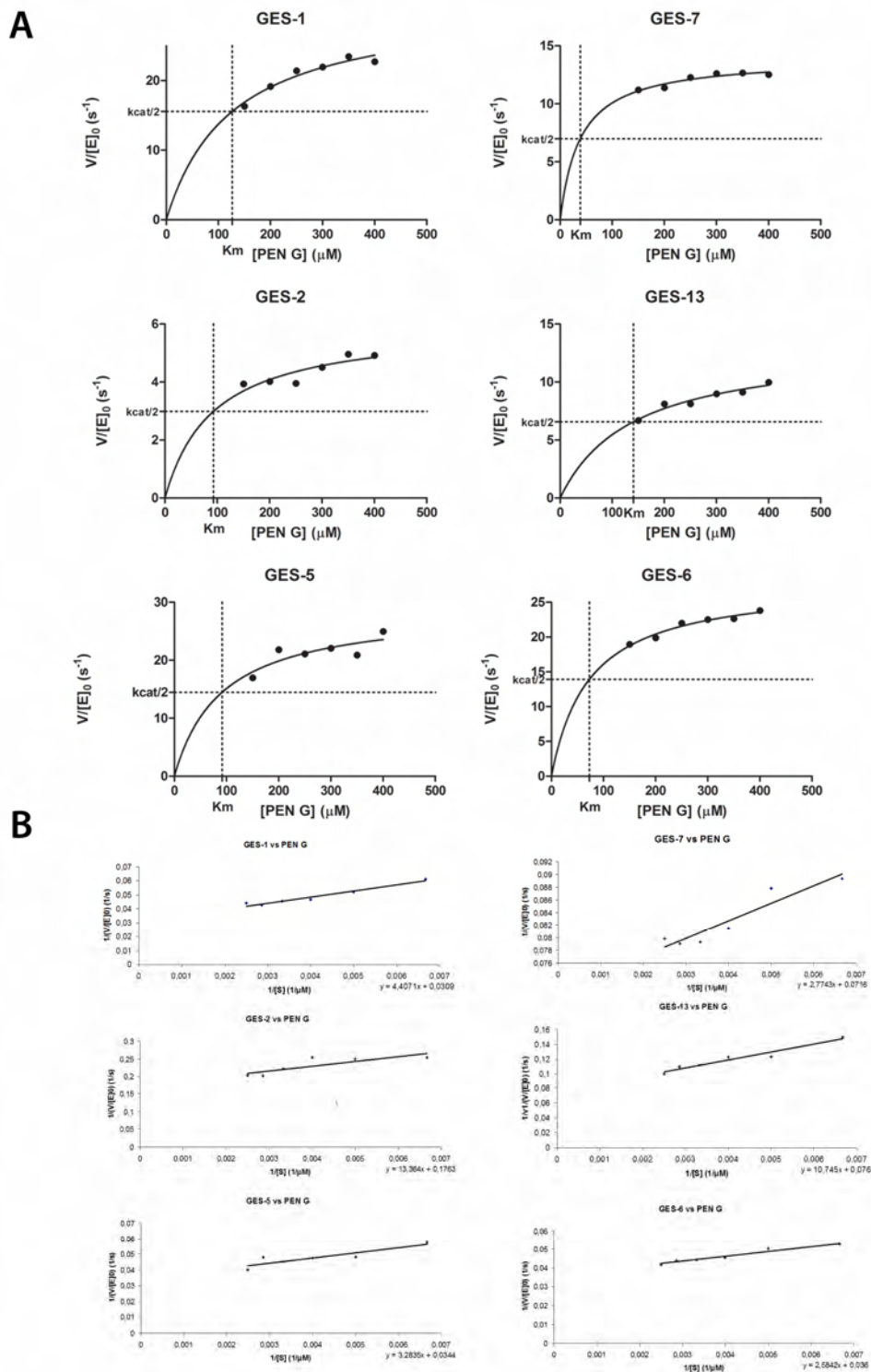


Η καταλυτική απόδοση των ενζύμων με ασπαραγίνη στην θέση 170 κατά την υδρόλυση βενζυλπενικιλίνης, εκτιμούμενη από το πηλίκο k_{cat}/K_m , ήταν σαφώς μειωμένη κυρίως λόγω μείωσης της ταχύτητας κατάλυσης (k_{cat}). Οι υπόλοιπες ποικιλίες GES εμφάνιζαν σχετικά αυξημένες ταχύτητες υδρόλυσης. Τα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 χαρακτηρίζονταν από μειωμένες σταθερές *Michaelis* (K_m) - εκτός από την GES-13 - οι οποίες συνοδεύονταν από επίσης μειωμένες k_{cat} με αποτέλεσμα οι καταλυτικές αποδόσεις να μη μεταβάλλονται σημαντικά (Πίνακας 8, Εικόνα 9).

Πίνακας 8: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης πενικιλίνης^a

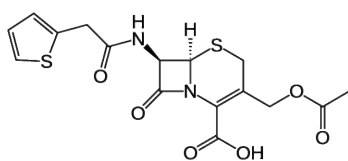
Ένζυμο	[E] (μM)	[PEN G] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
GES-1 ^{E104 G170}	2-4·10 ⁻³	150 - 400	30,5 ± 5,0	120 ± 20	0,26·10 ⁶
GES-2 ^{E104 N170}	10-12·10 ⁻³	150 - 400	5,75 ± 0,8	87,6 ± 10	0,07·10 ⁶
GES-5 ^{E104 S170}	2-4·10 ⁻³	150 - 400	28,6 ± 4,0	88,9 ± 12	0,32·10 ⁶
GES-7 ^{K104 G170}	2-4·10 ⁻³	150 - 400	14,2 ± 2,0	39,0 ± 5,0	0,36·10 ⁶
GES-13 ^{K104 N170}	10-12·10 ⁻³	150 - 400	13,5 ± 2,0	139 ± 20	0,10·10 ⁶
GES-6 ^{K104 S170}	2-4·10 ⁻³	150 - 400	27,2 ± 3,0	64,2 ± 8,0	0,42·10 ⁶

^a Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.



Εικόνα 9: Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών στην κατάσταση ισορροπίας κατά την υδρόλυση της πενικιλίνης G. Α) Προσδιορισμός μέσω απευθείας μη-γραμμικής παλινδρόμησης στην εξίσωση Michaelis-Menten Β) Ευθυγραμμισμός μέσω της εξίσωσης Lineweaver-Burk.

2. Κεφαλοθίνη (CEF)

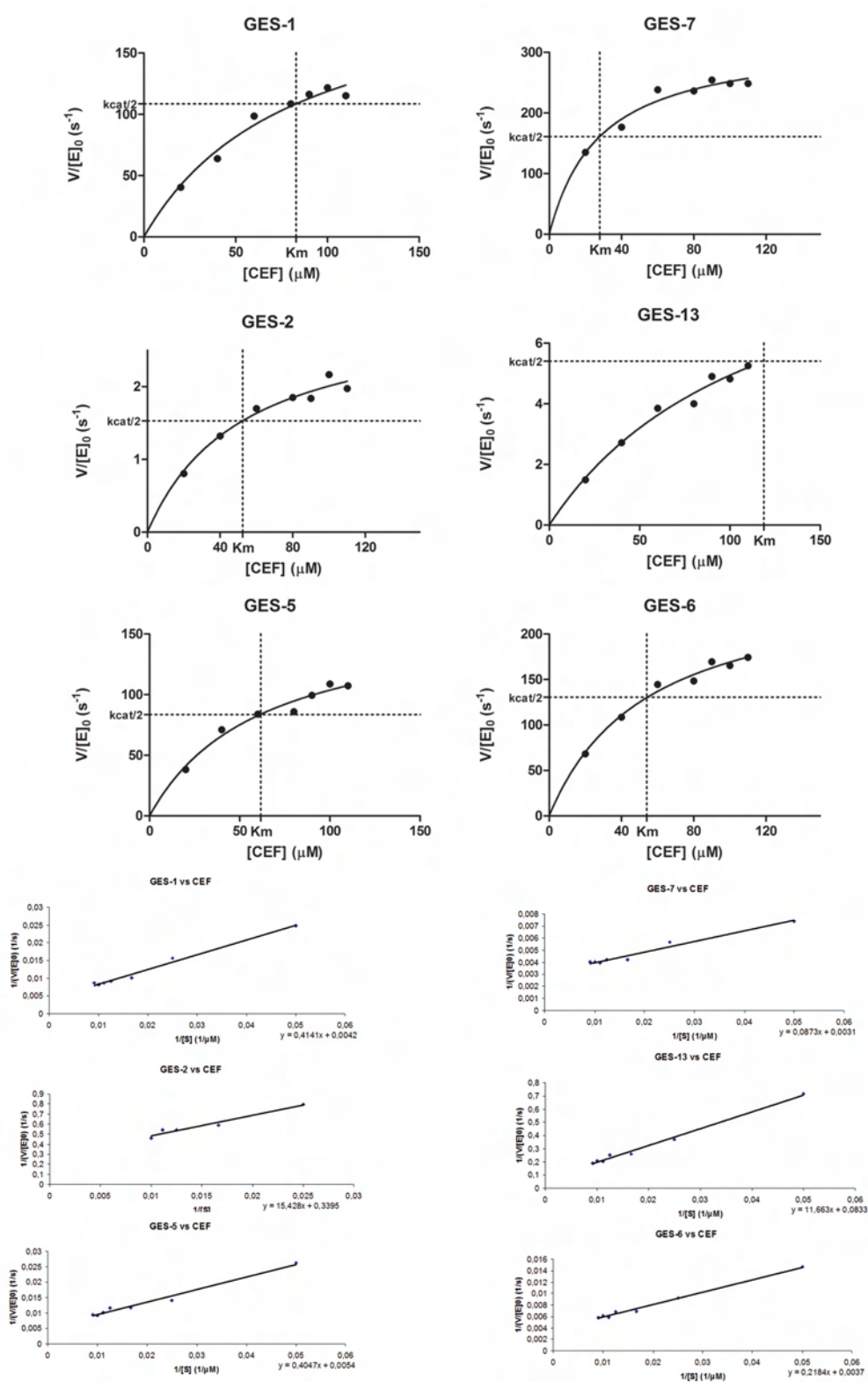


Τα ένζυμα GES-1, GES-5, GES-7 και GES-6 διασπούσαν αποτελεσματικά το β-λακταμικό δακτύλιο της κεφαλοθίνης με τις ποικιλίες λυσίνης στη θέση 104 να εμφανίζουν υψηλότερη φαινόμενη συγγένεια για το υπόστρωμα αυτό εν σχέσει με τα αντίστοιχα ένζυμα με γλουταμικό οξύ στη θέση αυτή ειδικά όταν το κατάλοιπο 170 ήταν γλυκίνη (Πίνακας 9, Εικόνα 10). Αντίθετα, οι ποικιλίες με ασπαραγίνη στη θέση 170 εμφάνιζαν μειωμένη καταλυτική απόδοση η οποία, όπως και στην περίπτωση των πενικιλινών, οφείλονταν σε χαμηλούς ρυθμούς ανακύκλωσης (Πίνακας 9, Εικόνα 10). Η Glu104Lys υποκατάσταση στην GES-2 (GES-13) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στην ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος αυτού κατά τρεις περίπου φορές. Ωστόσο η αύξηση αυτή συνοδεύονταν από μείωση της φαινόμενης συγγένειας με αποτέλεσμα η καταλυτική απόδοση να μην μεταβληθεί σημαντικά (πίνακας 9, εικόνα 10).

Πίνακας 9: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης κεφαλοθίνης^a

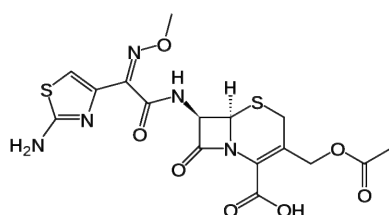
Ένζυμο	[E] (μM)	[CEF] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
GES-1 ^{E104 G170}	0,1-0,2·10 ⁻³	20 - 110	218 ± 28	87,8 ± 11	2,48·10 ⁶
GES-2 ^{E104 N170}	5·10 ⁻³	20 - 110	2,94 ± 0,4	53,9 ± 7	0,05·10 ⁶
GES-5 ^{E104 S170}	0,1-0,2·10 ⁻³	20 - 110	167 ± 19	61,1 ± 8	2,73·10 ⁶
GES-7 ^{K104 G170}	0,1-0,2·10 ⁻³	20 - 110	313 ± 28	23,7 ± 3	13,2·10 ⁶
GES-13 ^{K104 N170}	5·10 ⁻³	20 - 110	10,1 ± 1,0	106 ± 14	0,10·10 ⁶
GES-6 ^{K104 S170}	0,1-0,2·10 ⁻³	20 - 110	260 ± 23	54,0 ± 10	4,81·10 ⁶

^a Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.



Εικόνα 10: Προσδιορισμός των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων GES κατά την υδρόλυση κεφαλοθίνης. Α) Καμπύλες μεταβολής των μονάδων ταχύτητας κατά Michaelis-Menten. Β) Μετασχηματισμός των δεδομένων σύμφωνα με την εξίσωση Lineweaver-Burk.

3. Κεφοταξίμη

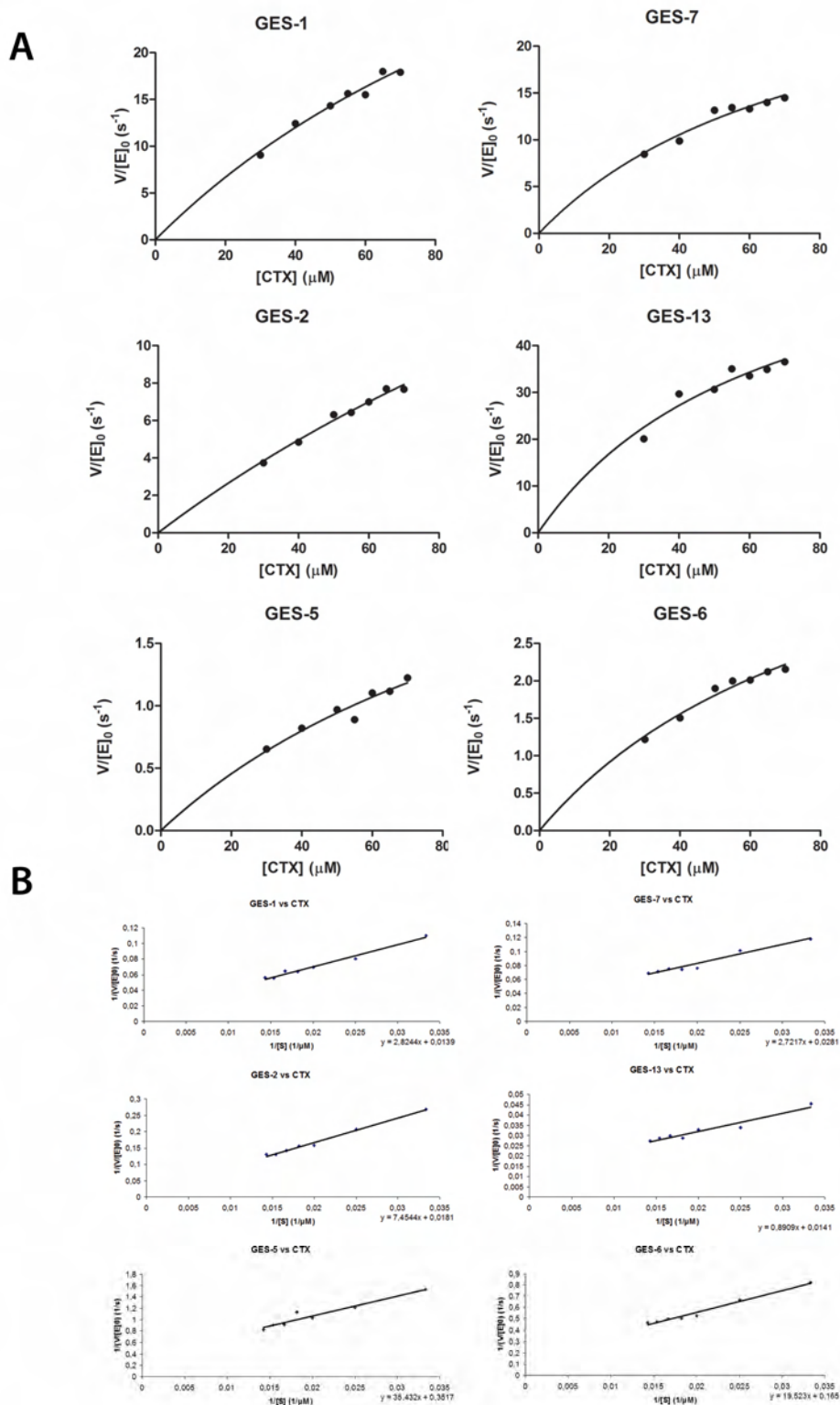


Η οξυίμινο κεφαλοσπορίνη τρίτης γενεάς κεφοταξίμη υδρολύονταν και από τις έξι ποικιλίες GES. Τη μικρότερη απόδοση κατά την υδρόλυσή της παρουσιάζαν τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 ανεξάρτητα από τη φύση του αμινοξέος στη θέση 104 (Πίνακας 10, Εικόνα 11). Η ασπαραγίνη στη θέση 170 δεν είχε αρνητική επίπτωση στην υδρόλυση του αντιβιοτικού αυτού, εν αντιθέσει με ότι παρατηρήθηκε για την πενικιλίνη G και την κεφαλοθίνη. Μάλιστα ο συνδυασμός Asn170 και Lys104 στην GES-13 οδηγούσε σε υψηλές καταλυτικές αποδόσεις μέσω αύξησης της ταχύτητας υδρόλυσης και της φαινόμενης συγγένειας (Πίνακας 10, Εικόνα 11). Τα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 χαρακτηρίζονταν επίσης από μειωμένες σταθερές K_m . Οι προσδιοριζόμενες τιμές K_m όμως για την πλειονότητα των ενζύμων GES ξεπερνούσαν τη συγκέντρωση κεφοταξίμης που μπορούσε να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία UV και άρα οι τιμές που δίνονται αποτελούν αδρές εκτιμήσεις οι οποίες δεν μπορούν να συγκριθούν με ασφάλεια.

Πίνακας 10: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης κεφοταξίμης^α

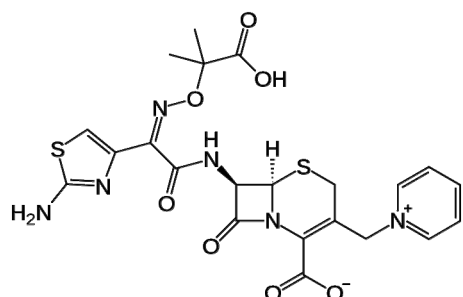
Ένζυμο	[E] (μM)	[CTX] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
GES-1 ^{E104 G170}	1,5·10 ⁻³	30 - 70	56,8 ± 7,0	152 ± 19	0,37·10 ⁶
GES-2 ^{E104 N170}	1,5·10 ⁻³	30 - 70	37,2 ± 2,0	261 ± 25	0,14·10 ⁶
GES-5 ^{E104 S170}	12·10 ⁻³	30 - 70	3,55 ± 0,5	133 ± 11	0,3·10 ⁵
GES-7 ^{K104 G170}	1,5·10 ⁻³	30 - 70	31,4 ± 4,0	81,6 ± 9,0	0,38·10 ⁶
GES-13 ^{K104 N170}	1,5·10 ⁻³	30 - 70	69,0 ± 8,0	63,4 ± 5,0	1,09·10 ⁶
GES-6 ^{K104 S170}	10·10 ⁻³	30 - 70	5,10 ± 0,8	95,6 ± 12	0,5·10 ⁵

^α Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.



Εικόνα 11: Α) Μεταβολή των αρχικών μονάδων υδρόλυσης ως προς την αρχική συγκέντρωση κεφοταξίμης. Στην περίπτωση των ενζύμων με Glu104 η μεταβολή αυτή είναι σχεδόν γραμμική που δηλώνει μεγάλες K_m για τις αλληλεπιδράσεις αυτές. Β) Γραφήματα Lineweaver-Burk.

4. Κεφταζιδίμη

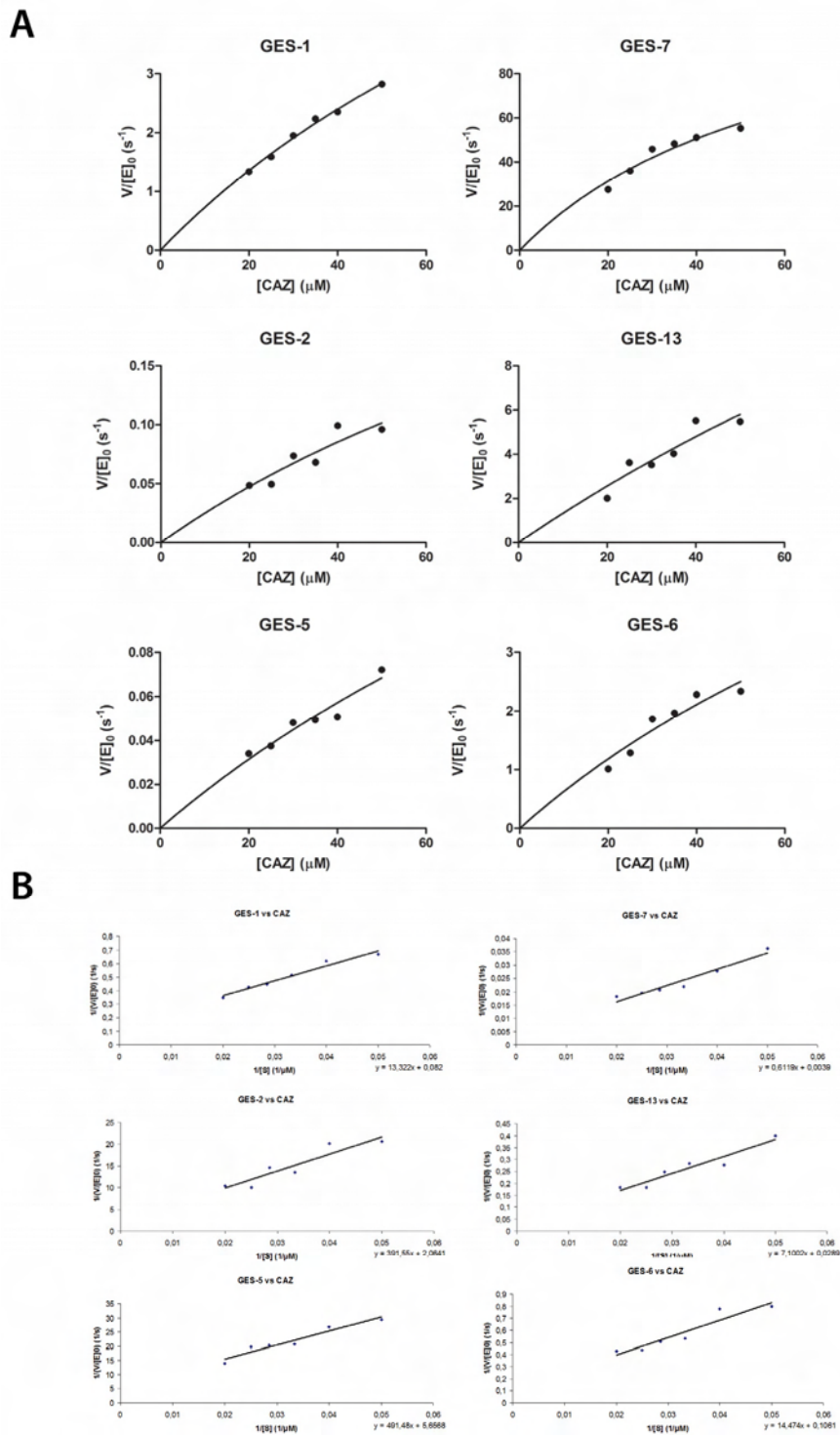


Η υδρόλυση της οξυίμινο κεφελωσπορίνης τρίτης γενεάς κεφταζιδίμης η οποία διαθέτει ογκώδη καρβοξυλιωμένη R1 πλευρική αλυσίδα από τα ένζυμα με ασπαραγίνη και σερίνη στην θέση 170 και γλουταμικό οξύ στη θέση 104 ήταν μειωμένη σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες GES με τις αρχικές ταχύτητες να βρίσκονται στο όριο ανίχνευσης. Τα ένζυμα αυτά (GES-2 και GES-5) χαρακτηρίζονταν από χαμηλές τιμές k_{cat} και υψηλές K_m . Αντικατάσταση του αρνητικού αμινοξέος στη θέση 104 με λυσίνη στα ένζυμα αυτά (ώστε να προκύψουν οι GES-13 και GES-6) είχε ως αποτέλεσμα 144 και 39 φορές αύξηση στην ταχύτητα κατάλυσης αντίστοιχα, με την σταθερά Michaelis είτε να αυξάνεται κατά 1,7 φορές (GES-13) είτε να παραμένει σταθερή (GES-6). Η ίδια υποκατάσταση στην GES-1, η οποία υδρόλυε την κεφταζιδίμη, προκαλούσε ~13 φορές αύξηση στην σταθερά κατάλυσης και 2 φορές αύξηση της φαινόμενης συγγένειας με αποτέλεσμα η GES-7 να υδρολύει περισσότερο αποδοτικά το υπόστρωμα αυτό από όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν (Πίνακας 11, Εικόνα 12).

Πίνακας 11: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης κεφταζιδίμης^a

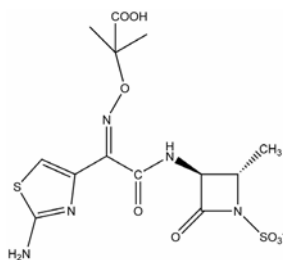
Ένζυμο	[E] (μM)	[CAZ] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	^a K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
GES-1 ^{E104 G170}	3·10 ⁻³	20 - 50	10,5 ± 2,0	137 ± 21	0,77·10 ⁵
GES-2 ^{E104 N170}	20·10 ⁻³	20 - 50	0,21 ± 0,05	98,2 ± 15	0,2·10 ⁴
GES-5 ^{E104 S170}	36·10 ⁻³	20 - 50	0,24 ± 0,05	135 ± 11	0,2·10 ⁴
GES-7 ^{K104 G170}	1·10 ⁻³	20 - 50	132 ± 10	69,2 ± 8,0	1,90·10 ⁶
GES-13 ^{K104 N170}	3·10 ⁻³	20 - 50	30,4 ± 5,0	229 ± 19	0,13·10 ⁶
GES-6 ^{K104 S170}	10·10 ⁻³	20 - 50	9,30 ± 1,0	149 ± 16	0,6·10 ⁵

^a Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.



Εικόνα 12: Α) Μεταβολή των αρχικών μονάδων υδρόλυσης ως προς την αρχική συγκέντρωση κεφαζιδίμης. Διακρίνονται οι πολύ χαμηλές ενεργότητες που καταγράφηκαν από τις GES-2 και GES-5. Η συγκέντρωση της κεφαζιδίμης που μπορούσε να μετρηθεί ήταν πολύ μικρότερη από τα προσδιοριζόμενα K_m . Β) Γραφήματα Lineweaver-Burk.

5. Αζτρεονάμη



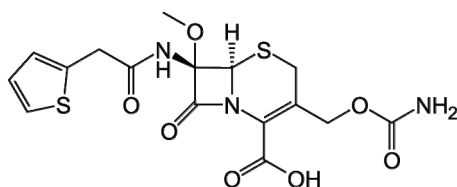
Ενεργότητα έναντι της αζτρεονάμης, η οποία φέρει την οξυμίμο πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης, εμφάνιζαν τα ένζυμα GES-7 και GES-13. Οι υπόλοιπες ποικιλίες GES χαρακτηρίζονταν από μη μετρήσιμη υδρόλυση στις συνθήκες του πειράματος. Το ένζυμο με γλυκίνη στην θέση 170 και λυσίνη στη θέση 104 προκαλούσε ταχύτερη υδρόλυση, με υψηλότερη συγγένεια από το αντίστοιχο με ασπαραγίνη στη θέση 170 (Πίνακας 12, Εικόνα 13).

Πίνακας 12: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης αζτρεονάμης

Ένζυμο	[E] (μM)	[ATM] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
GES-1 ^{E104 G170}	20·10 ⁻³	150 - 300	MM ^β	MM	-
GES-2 ^{E104 N170}	20·10 ⁻³	150 - 300	MM	MM	-
GES-5 ^{E104 S170}	20·10 ⁻³	150 - 300	MM	MM	-
GES-7 ^{K104 G170}	5·10 ⁻³	150 - 300	45,5 ± 6,0	241 ± 13	0,19·10 ⁶
GES-13 ^{K104 N170}	5·10 ⁻³	150 - 300	35,6 ± 4,5	405 ± 52	0,9·10 ⁵
GES-6 ^{K104 S170}	20·10 ⁻³	150 - 300	MM	MM	-

^a Μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.

6. Κεφοξιτίνη

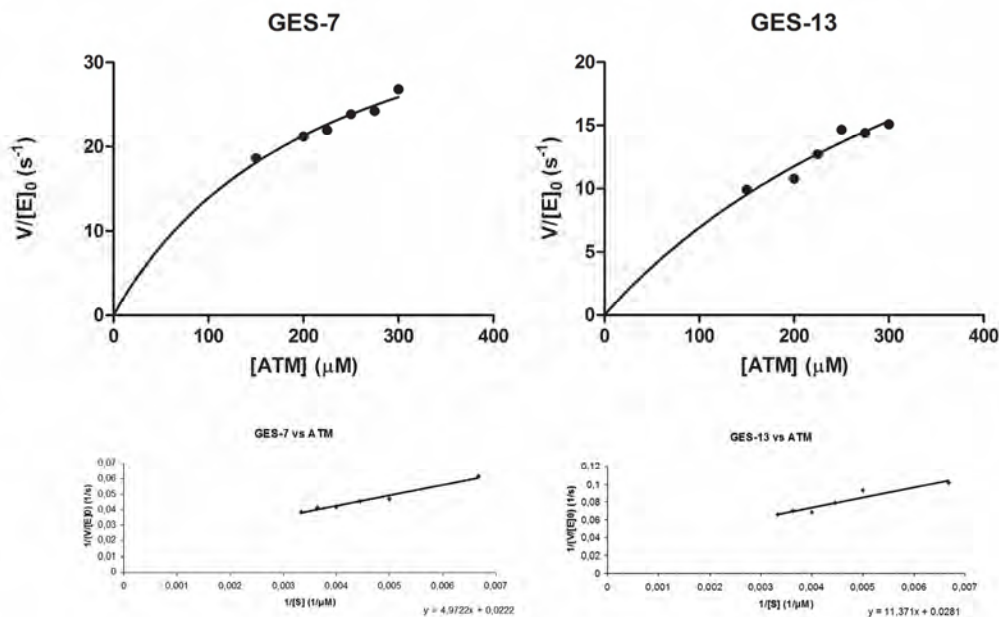


Η κεφαμυκίνη κεφοξιτίνη, η οποία φέρει την αμινο-άκυλο πλευρική αλυσίδα της κεφαλοθίνης αλλά στον C7 του συστήματος κεφέμης είναι υποκατεστημένη από μέθοξο-ομάδα σε α θέση, υδρολύονταν μόνο από τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 GES-5 και GES-6. Οι υπόλοιπες ποικιλίες GES εμφάνιζαν μη μετρήσιμη υδρόλυση στις συνθήκες

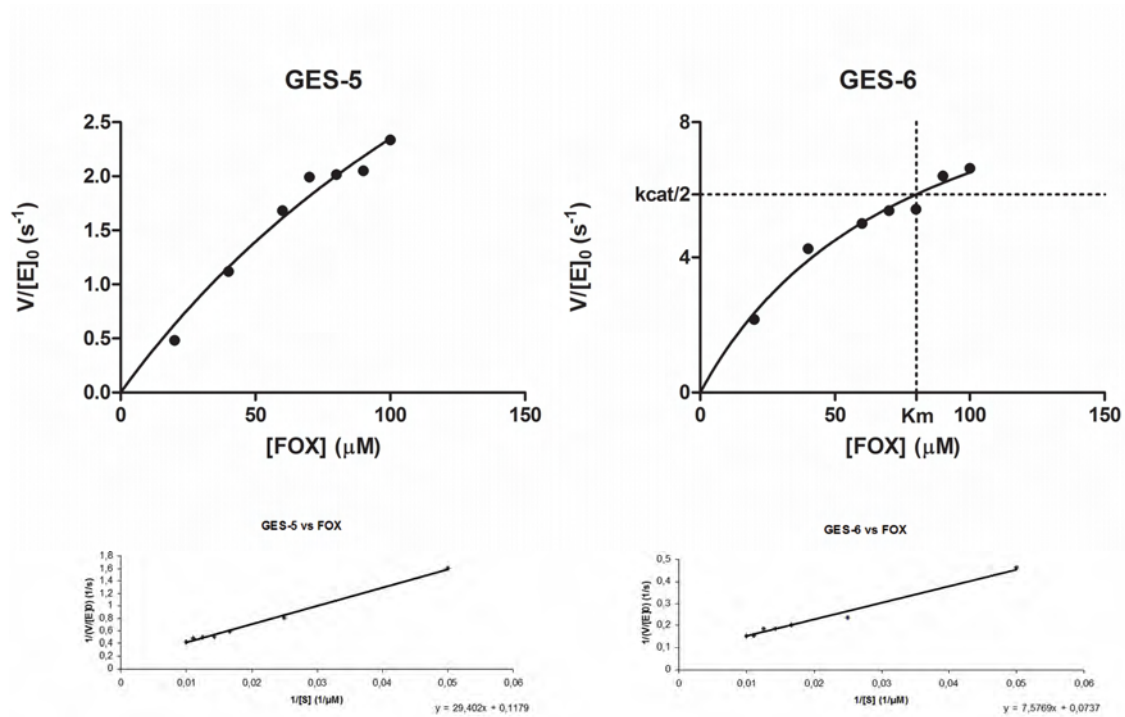
που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό (Πίνακας 13). Από τις δύο GES με ενεργότητα υδρόλυσης, το ένζυμο με λυσίνη στη θέση 104 παρουσίαζε υψηλότερη απόδοση κατά την καταστροφή του β-λακταμικού δακτυλίου του αντιβιοτικού κυρίως λόγω αύξησης της φαινόμενης συγγένειας (Πίνακας 13, Εικόνα 14)

Πίνακας 13: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης κεφοξιτίνης

Ένζυμο	[E] (μM)	[FOX] (μM)	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
GES-1 ^{E104 G170}	20·10 ⁻³	20 - 100	MM ^b	MM	-
GES-2 ^{E104 N170}	20·10 ⁻³	20 - 100	MM	MM	-
GES-5 ^{E104 S170}	4·10 ⁻³	20 - 100	7,50 ± 6,0	221 ± 15	0,3·10 ⁵
GES-7 ^{K104 G170}	20·10 ⁻³	20 - 100	MM	MM	-
GES-13 ^{K104 N170}	20·10 ⁻³	20 - 100	MM	MM	-
GES-6 ^{K104 S170}	2·10 ⁻³	20 - 100	12,1 ± 2,0	82,3 ± 7,0	0,15·10 ⁶

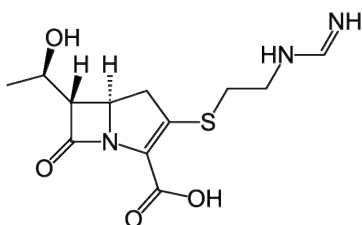


Εικόνα 13: Προσδιορισμός των σταθερών υδρόλυσης της αζτρεονάμης από τις GES-7 και GES-13 μέσω της εξίσωσης Michaelis-Menten, και γραφημάτων Lineweaver-Burk.



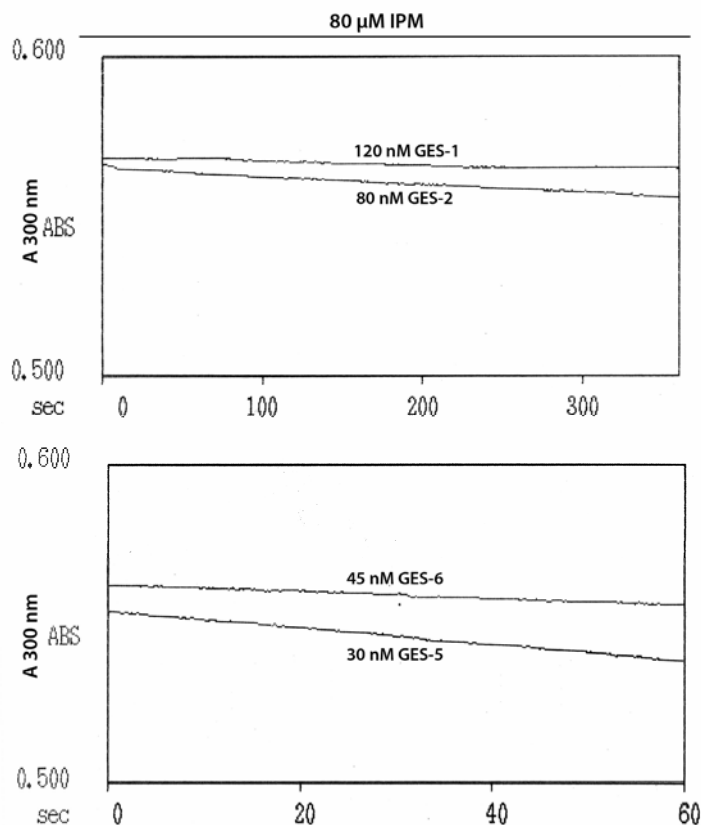
Εικόνα 14: Προσδιορισμός των σταθερών υδρόλυσης της κεφοξιτίνης από τις GES-5 και GES-6 μέσω της εξίσωσης Michaelis-Menten, και γραφημάτων Lineweaver-Burk.

7. Ιμιπενέμη



Ενεργότητα υδρόλυσης της καρβαπενέμης ιμιπενέμης εμφάνιζαν οι περισσότερες ποικιλίες GES η οποία ήταν δυνατόν να μετρηθεί μόνο χρησιμοποιώντας υψηλές ποσότητες ενζύμων (Πίνακας 14). Τη μικρότερη ενεργότητα εμφάνιζε η GES-7 της οποίας η υδρόλυση ήταν μη μετρήσιμη, ακολουθούσαν η GES-13 και η GES-1 ενώ η GES-2 παρουσίαζε περιορισμένη αύξηση στους ρυθμούς διάσπασης του β-λακταμικού δακτυλίου του υποστρώματος (Εικόνα 15). Ουσιαστική υδρόλυση παρατηρήθηκε από τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 με την GES-5 να είναι περισσότερο ενεργή (εικόνα 15). Η ταχύτητα υδρόλυσης δε μεταβάλλονταν αισθητά με τη συγκεντρώσεις ιμιπενέμης που χρησιμοποιήθηκαν γεγονός που δηλώνει χαμηλές σταθερές K_m (Πίνακας 14, Εικόνα 16). Οι αντίστοιχες σταθερές όμως δεν μετρήθηκαν με αναστολή καθώς έχει βρεθεί από μία

άλλη ερευνητική ομάδα ότι για τα ένζυμα αυτά κατά την αλληλεπίδρασή τους με τις καρβαπενέμες ισχύει $K_i \ll K_m$.

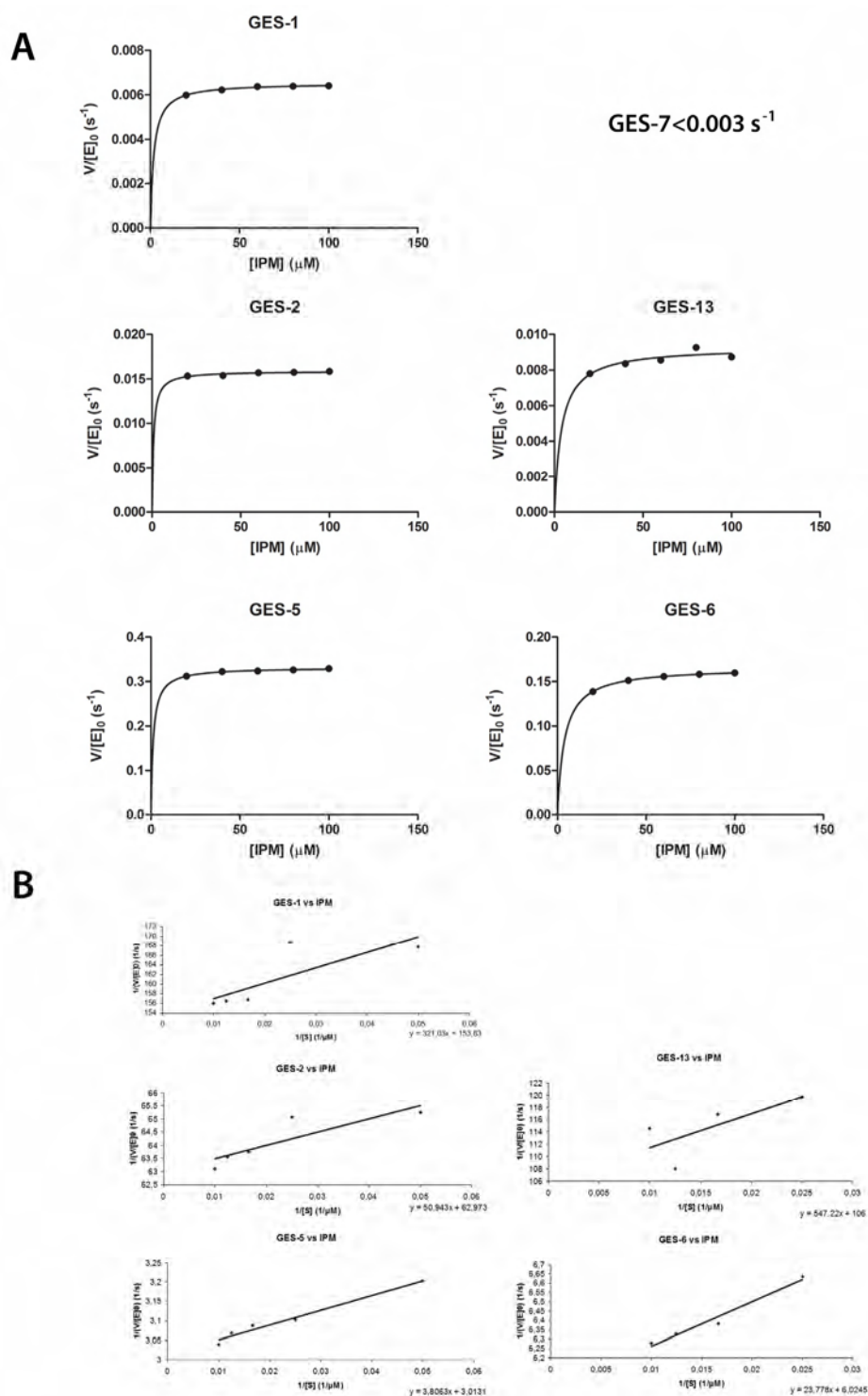


Εικόνα 15: Πτώση της απορρόφησης 80 μM ιμιπενέμης στα 300 nm κατά την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων ενζύμων GES. Η πτώση της απορρόφησης στα ένζυμα που δεν υδρέλυαν αποδοτικά το αντιβιοτικό καταγράφονταν για 3 min ενώ στα GES-5 και GES-6 για 1 min.

Πίνακας 14: Κινητικές σταθερές υδρόλυσης ιμιπενέμης^a

Ένζυμο	[E] (μM)	[IPM] (μM)	k_{cat} (s^{-1}) ^a	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
GES-1 ^{E104 G170}	0,12	20 - 100	$0.006 \pm 0,001$	$1.2 \pm 0,1$	$0.5 \cdot 10^4$
GES-2 ^{E104 N170}	0,08	20 - 100	$0.016 \pm 0,002$	$0.87 \pm 0,1$	$0.2 \cdot 10^5$
GES-5 ^{E104 S170}	0,030	20 - 100	$0.332 \pm 0,04$	$1.27 \pm 0,2$	$0.26 \cdot 10^6$
GES-7 ^{K104 G170}	0,14	20 - 100	MM ^b	MM	-
GES-13 ^{K104 N170}	0.14	20 - 100	$0.009 \pm 0,002$	$3.10 \pm 0,05$	$0.3 \cdot 10^4$
GES-6 ^{K104 S170}	0,045	20 - 100	$0.166 \pm 0,02$	$3.92 \pm 0,05$	$0.42 \cdot 10^5$

^a Μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων προσδιορισμών.



Εικόνα 16: Προσδιορισμός των σταθερών υδρόλυσης της μιπενέμης από τις GES μέσω της εξίσωσης Michaelis-Menten (A) και γραφημάτων Lineweaver-Burk (B). Διακρίνεται η μικρή μεταβολή των αρχικών ταχυτήτων στις συγκεντρώσεις μιπενέμης που χρησιμοποιήθηκαν.

Η Glu104Lys υποκατάσταση στην GES-5 είχε ως αποτέλεσμα τον υποδιπλασιασμό της ταχύτητας κατάλυσης και τον τριπλασιασμό της σταθεράς Michaelis με αποτέλεσμα η GES-6 να υδρολύει λιγότερο αποδοτικά την ιμιπενέμη. Ασπαραγίνη στη θέση 170 προκαλούσε μεν αύξηση στην ταχύτητα υδρόλυσης αλλά αυτή δεν προσέγγιζε τα επίπεδα που παρατηρήθηκαν για τα ένζυμα στα οποία το κατάλοιπο αυτό ήταν σερίνη. Η λυσίνη 104 και στην περίπτωση αυτή επιδρούσε αρνητικά στην ενεργότητα του ενζύμου, με την GES-13 να παρουσιάζει μειωμένη k_{cat} κατά 1,8 φορές και μείωση της φαινόμενης συγγένειας κατά 3,6 φορές σε σχέση με την GES-2 (Πίνακας 14, Εικόνα 16).

Πίνακας 15. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των κινητικών παραμέτρων των GES ποικιλιών κατά την υδρόλυση β-λακταμών

β-λακτάμη	GES-1 (E104, G170)			GES-7 (K104, G170)			GES-2 (E104, N170)			GES-5 (E104, S170)			GES-6 (K104, S170)			GES-13 (K104, N170)		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} / K_m (μM ⁻¹ ·s ⁻¹)
Πενικιλίνη G	30.5	120	0.26	14.2	39.0	0.36	5.75	87.6	0.07	28.6	88.9	0.32	27.2	64.2	0.42	13.5	139	0.10
Κεφαλοθίνη	218	87.8	2.48	313	23.7	13.2	2.94	53.9	0.05	167	61.1	2.73	260	54.0	4.81	10.1	106	0.10
Κεφοξιτίνη	ΜΠ ^b			ΜΠ			ΜΠ			7.50	221	0.03	12.1	82.3	0.15	ΜΠ		
Κεφαζιδίμη	10.5	137	0.077	132	69.2	1.90	0.21	98.2	0.002	0.24	135	0.002	9.30	149	0.063	30.4	229	0.13
Αζτρεονάμη	ΜΠ			45.5	241	0.19	ΜΠ			ΜΠ			ΜΠ			35.6	405	0.09
Κεφοταξίμη	56.8	152	0.37	31.4	81.6	0.38	37.2	261	0.14	3.55	133	0.03	5.10	95.6	0.05	69.0	63.4	1.09
Ιμπενέμη	0.006	1.2	0.005	ΜΠ			0.016	0.87	0.02	0.332	1.27	0.26	0.166	3.92	0.042	0.009	3.10	0.003

^a Οι τιμές k_{cat} και K_m που παρουσιάζονται αντιστοιχούν σε μέσους όρους τριών ανεξάρτητων μετρήσεων οι οποίες δεν διέφεραν πάνω από 10%

^b Μη προσδιορίσιμη. Η υδρόλυση ήταν είτε μη ανιχνεύσιμη είτε αρκετά χαμηλή ώστε να μετρηθεί αξιόπιστα.

γ. Αναστολή από β-λακταμικά

Η ενεργότητα των αναστολέων αυτοκτονίας κλαβουλανικό οξύ, σουλβακτάμη και ταζοβακτάμη εκτιμήθηκε με προσδιορισμό των συγκεντρώσεων στις οποίες προκαλούν μείωση της ενεργότητας υδρόλυσης της κεφαλοθίνης κατά 50 % σε πειράματα ανταγωνισμού όπως περιγράφεται στην ενότητα 1.K.iv. Οι τιμές IC50 αποκάλυψαν ένα κοινό προφίλ αναστολής των ποικιλιών GES που ακολουθούσε την σειρά ταζοβακτάμη>κλαβουλανικό οξύ>σουλβακτάμη ως προς την ισχύ της απενεργοποίησης (Πίνακας 15). Τα ένζυμα GES-7, GES-5 και GES-6 ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ ενώ το μόριο αυτό ήταν πολύ ενεργό έναντι των GES με ασπαραγίνη στη θέση 170. Οι τιμές IC50 των ενζύμων GES-7, GES-5 και GES-6 δεν διέφεραν σημαντικά από αυτές των υπολοίπων ενζύμων ώστε να εξηγήσουν την αύξηση των MIC που παρατηρήθηκε κατά την επίδραση συνδυασμών πενικιλινών/κλαβουλανικού οξέος σε στελέχη που παρήγαγαν τα ένζυμα. Όσον αφορά τα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 η αύξηση αυτή όπως αναφέρθηκε ενδέχεται να οφείλεται στην αύξηση της υδρόλυσης της πενικιλίνης του συνδυασμού. Στην περίπτωση των ενζύμων με σερίνη στη θέση 170 η αυξημένη αντοχή στη δράση του κλαβουλανικού οξέος πιθανότατα οφείλεται σε χαμηλούς ρυθμούς απενεργοποίησης k_{inact} και σε υψηλούς αριθμούς ανακύκλωσης t_n . Τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 ήταν κατά 10 περίπου φορές λιγότερο ευαίσθητα στην συγκρινόμενα με τις υπόλοιπες ποικιλίες GES.

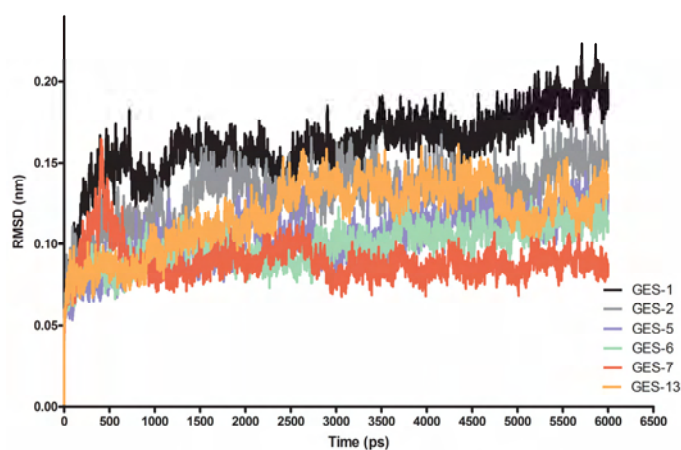
Πίνακας 15: Ενεργότητα αναστολέων "αυτοκτονίας" έναντι των ποικιλιών GES β-λακταμασών^a

Υπόστρωμα	IC50 (μM)					
	GES-1 (E104 G170)	GES-2 (E104 N170)	GES-5 (E104 S170)	GES-7 (K104 G170)	GES-13 (K104 N170)	GES-6 (K104 S170)
Κλαβουλανικό οξύ	0.1	0.08	0.5	0.8	0.09	1.7
Σουλβακτάμη	1.5	0.5	4.5	1.3	0.3	8.0
Ταζοβακτάμη	0.03	0.03	0.5	0.06	0.04	0.5

^a Οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσους όρους που προέκυψαν από 3 ανεξάρτητες μετρήσεις και διέφεραν < 10 %.

ν. Δομική ανάλυση των ενζύμων τύπου GES

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των φυσικών ενζύμων GES σε μη-συμπλοκοποιημένη μορφή ανέδειξαν κάποιες διαφορές ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά τους και τις δυναμικές ιδιότητές τους οι οποίες ενδεχομένως συνδέονται με τις αλλαγές στο φάσμα υποστρωμάτων που παρατηρήθηκαν. Η GES-1 παρουσίασε την μικρότερη σταθερότητα κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων, με τον πρωτεϊνικό σκελετό να μην έχει σταθεροποιηθεί μέχρι τα 5 ns (Εικόνα 17, Πίνακας 16).



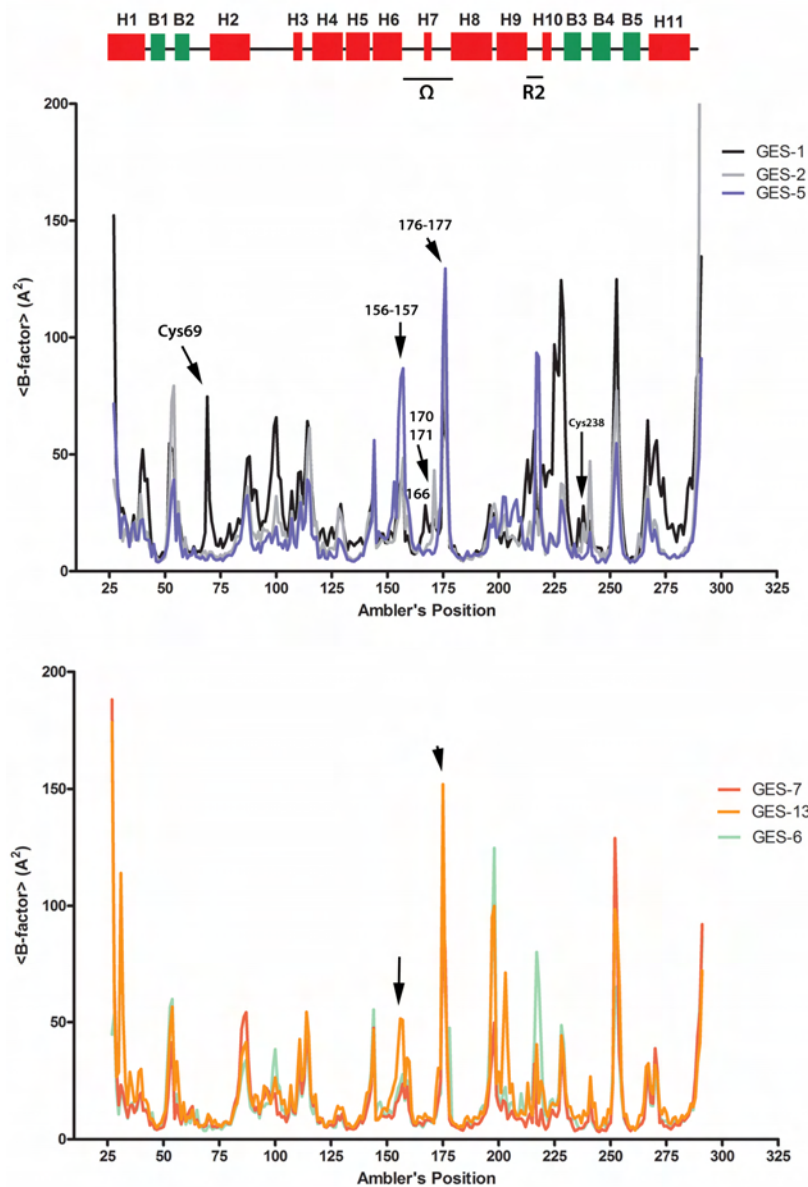
Εικόνα 17: Μεταβολή της RMSD από την αρχική δομή σε σχέση με τον χρόνο.

Πίνακας 16: Δυναμικές ιδιότητες των ενζύμων GES σε ελεύθερη κατάσταση

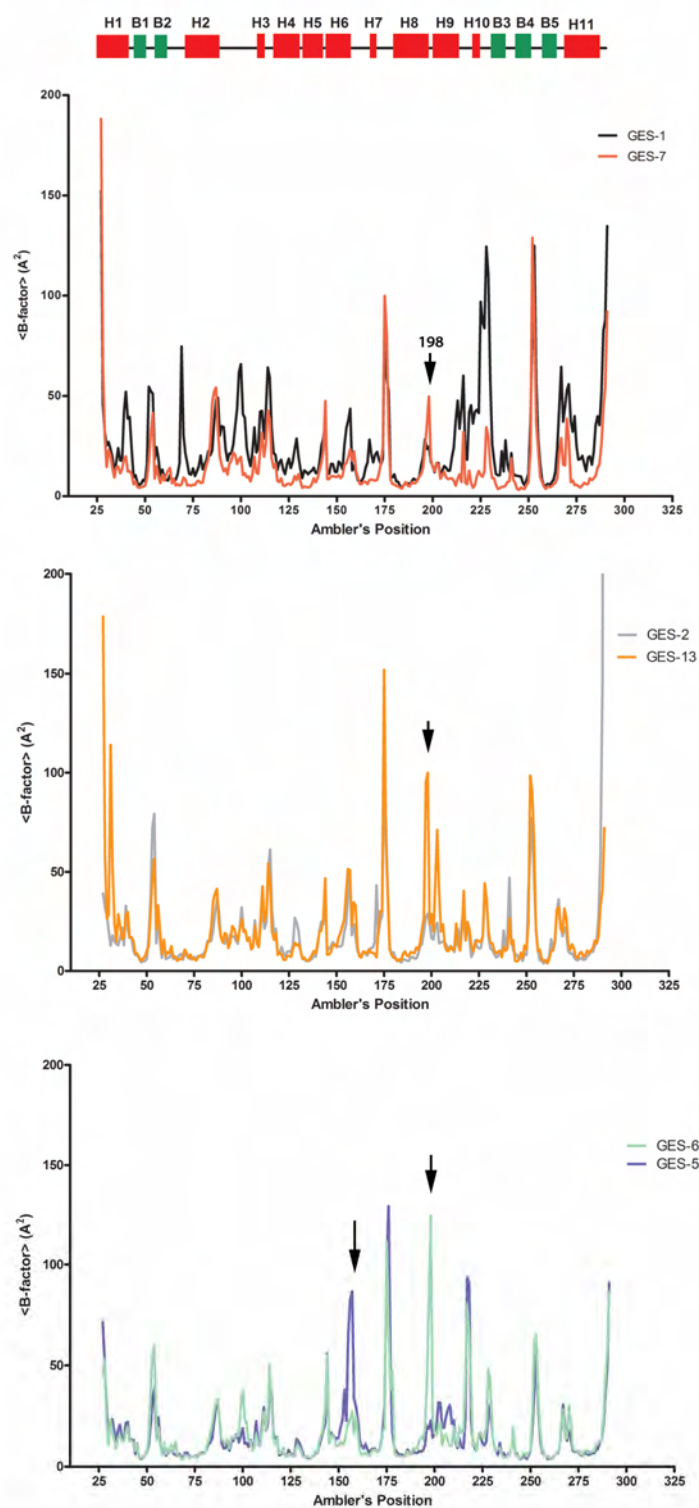
Ένζυμο	RMSD (nm)	τ_{eq} (ps)	ASASA _{ολική} (nm ²)
GES-1	0,16±0,021	5100±200	13,89±0,63
GES-2	0,13±0,017	1800±350	13,26±0,64
GES-5	0,10±0,015	1550±421	12,56±0,57
GES-7	0,09±0,011	2150±534	12,64±0,47
GES-13	0,12±0,021	1630±214	12,73±0,48
GES-6	0,10±0,011	1532±342	13,05±0,88

Το ένζυμο με γλυκίνη στην θέση 170 και γλουταμικό οξύ στη θέση 104 παρουσίαζε επίσης μεγαλύτερη επιφάνεια (υδρόφιλη και υδρόφοβη) στον διαλύτη στην περιοχή του ενεργού κέντρου ενώ το ίδιο, αλλά σε μικρότερο βαθμό, παρατηρήθηκε και

για την GES-2 και GES-6 (Πίνακας 16, ASASA). Η GES-1 εμφάνιζε επίσης περισσότερο ευέλικτο σκελετό σε διάφορα σημεία του πρωτεϊνικού μορίου ενώ παρουσίασε έντονη θερμική κίνηση στη γέφυρα θείου Cys69-S-S-Cys238 (Εικόνες 18 και 19). Το αμέσως επόμενο ασταθές ένζυμο ήταν η GES-13 όπως αποκάλυψε η σύγκριση των προφίλ των θερμικών παραγόντων των έξι ενζύμων (Εικόνες 18 και 19).



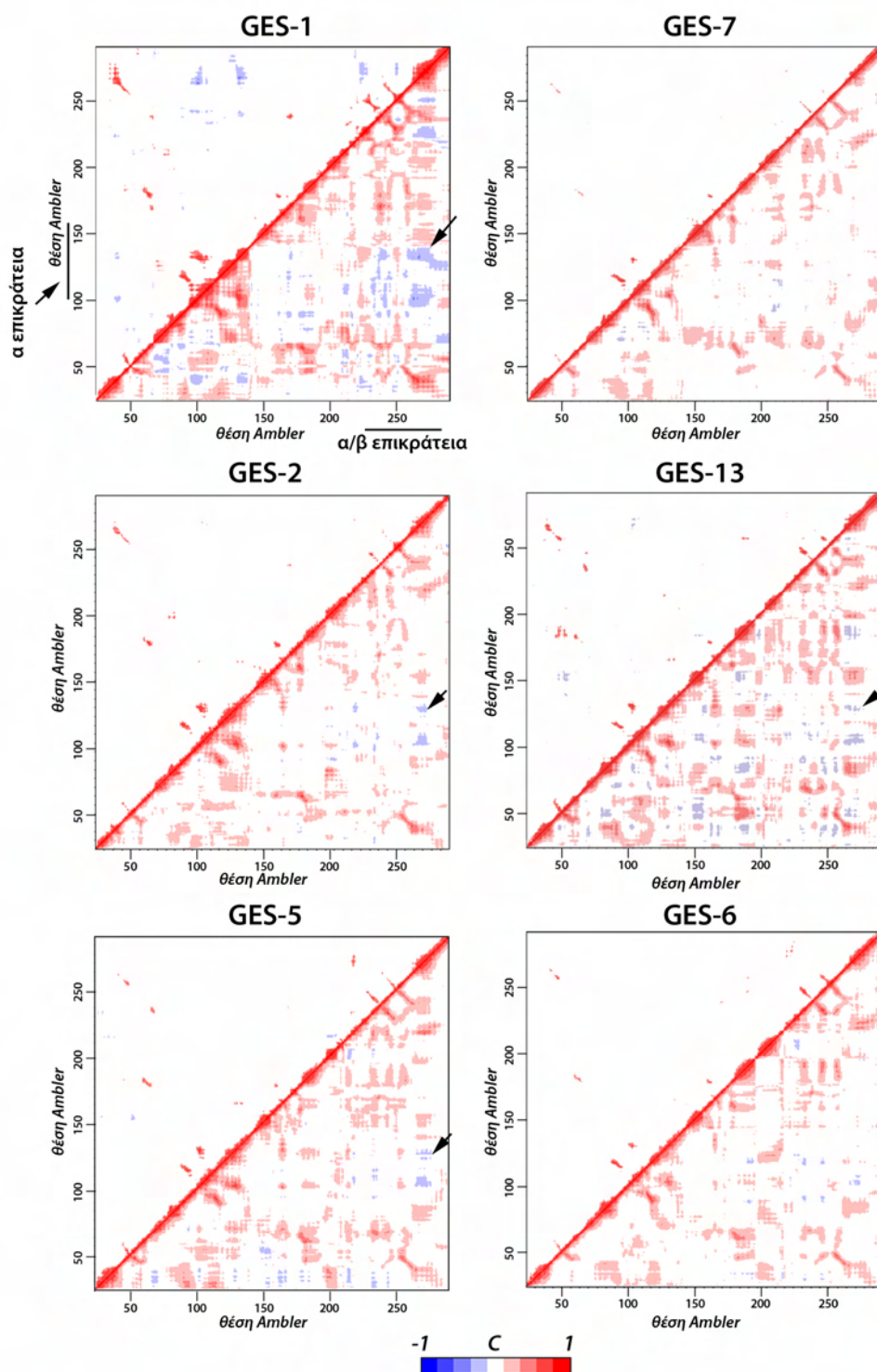
Εικόνα 18: Επίδραση των Gly170, Asn170 και Ser170 στην ευελιξία του πρωτεϊνικού σκελετού παρουσία Glu104 (επάνω γράφημα) και Lys104 (κάτω γράφημα).



Εικόνα 19: Επίδραση των Glu104 και Lys104 στην ευελιξία του πρωτεϊνικού σκελετού παρουσία Gly170 (GES-1/GES-7), Asn170 (GES-2/GES-13) και Ser170 (GES-5/GES-6) .

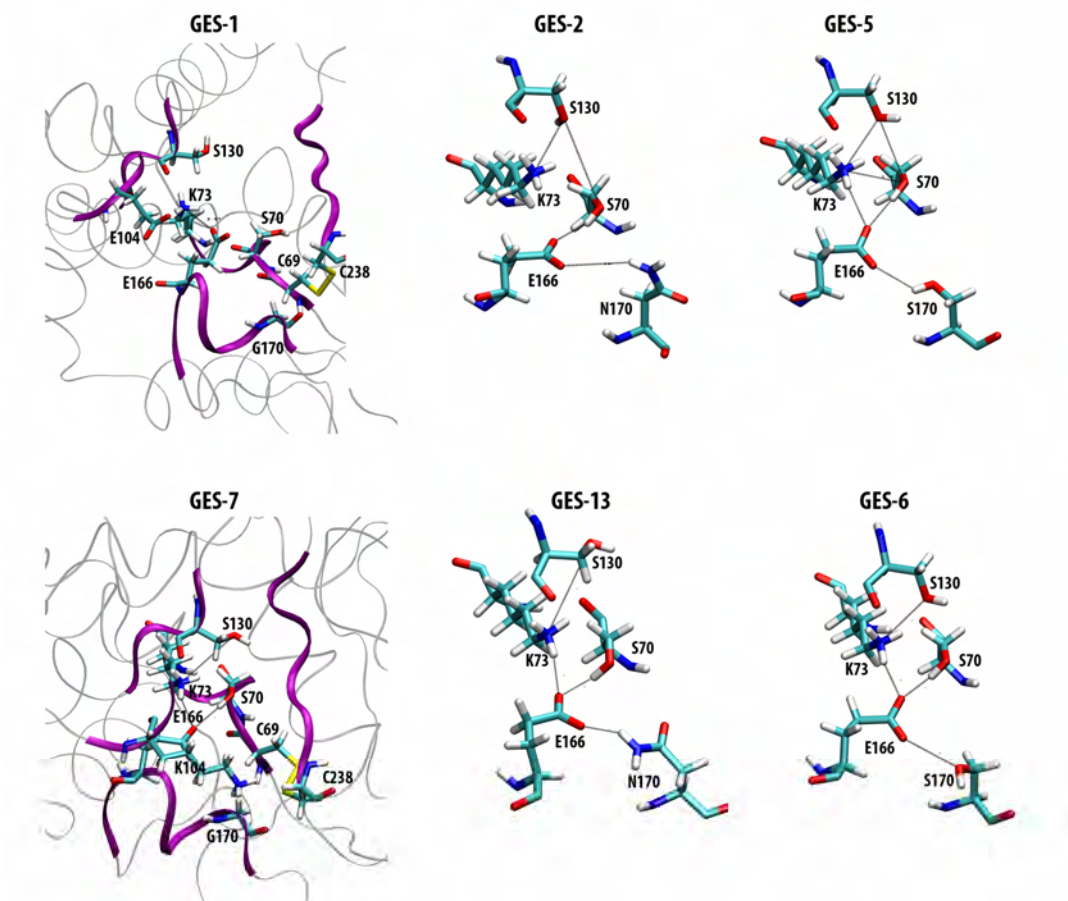
Η φύση του αμινοξέος στη θέση 170 επηρέαζε τις θερμικές κινήσεις των ενζύμων όπως και αυτή του καταλοίπου στη θέση 104. Ένα δομικό στοιχείο της πρωτεΐνης του οποίου οι κινήσεις εξαρτώνταν από τη θέση 170 ήταν η θηλειά Ω στην οποία συμπεριλαμβάνεται το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο. Έτσι, παρουσία Glu104 το ένζυμο με Gly170 βρέθηκε ότι χαρακτηρίζονταν από υψηλότερες δονήσεις του πρωτεϊνικού σκελετού γύρω από το καταλυτικό αμινοξύ Glu166 ενώ ασπαραγίνη στη θέση 170 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των θερμικών παραγόντων στην περιοχή 169-171 (Εικόνα 18, GES-1/GES-2/GES-5). Η GES-5 στις συγκεκριμένες περιοχές ήταν περισσότερο άκαμπτη αλλά τώρα ο σκελετός των αμινοξέων Gly156-Asp157 και Asp176-Leu177 εμφάνιζε εντονότερες δονήσεις (Εικόνα 18, GES-1/GES-2/GES-5). Λυσίνη στην θέση 104 τροποποιούσε τις παραπάνω επιδράσεις των υποκαταστάσεων στη θέση 170 με την GES-13 να είναι το μόνο ένζυμο που εμφάνιζε διαφορετική συμπεριφορά στην θηλειά Ω (Εικόνα 18, GES-7/GES-13/GES-6) η οποία αφορούσε αύξηση των παραγόντων *b* στις περιοχές 156-157 και 176-177. Τα ένζυμα με λυσίνη στην θέση 104 χαρακτηρίζονταν από υψηλότερη ευελιξία στην περιοχή γύρω από το αμινοξύ Ala198 το οποίο εντοπίζεται στη θηλειά που ενώνει τις H8 και H9 α-έλικες σε επικράτεια του ενζύμου που προηγείται της R2 θηλειάς όπου δεσμεύονται οι αντίστοιχες πλευρικές αλυσίδες των κεφαλοσπορινών (Εικόνα 19).

Ανάλυση συνδιακύμανσης ώστε να ερμηνευθούν οι ατομικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων έδειξε ότι ο πρωτεϊνικός σκελετός στα ένζυμα GES-1 και GES-13 εμφάνιζε έντονα συζευγμένη κίνηση (Εικόνα 20). Οι μεταλλάξεις στις θέσεις 170 και 104 επηρέαζαν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά τις κινήσεις αυτές χωρίς όμως να ανιχνευθεί κάποιο κοινό μοτίβο για κάθε υποκατάσταση στα ένζυμα που αυτή απαντούσε. Η GES-1 εμφάνισε έντονη συζευγμένη συλλογική κίνηση μεταξύ των επικρατειών α/β και α η οποία αφορούσε μετατόπιση προς αντίθετες κατευθύνσεις. Η κίνηση αυτή είναι χαρακτηριστική για τα ένζυμα στα οποία το ενεργό κέντρο εντοπίζεται μεταξύ δύο επικρατειών οι οποίες συνδέονται από ευέλικτες δομές (κίνηση αναπνοής). Στα υπόλοιπα ένζυμα η κίνηση αυτή ήταν λιγότερο έντονη ενώ η υποκατάσταση Glu104Lys βρέθηκε ότι έχει αρνητική επίδραση σε αυτήν όταν η θέση 170 καταλαμβάνονταν από γλυκίνη ή σερίνη (εικόνα 20).

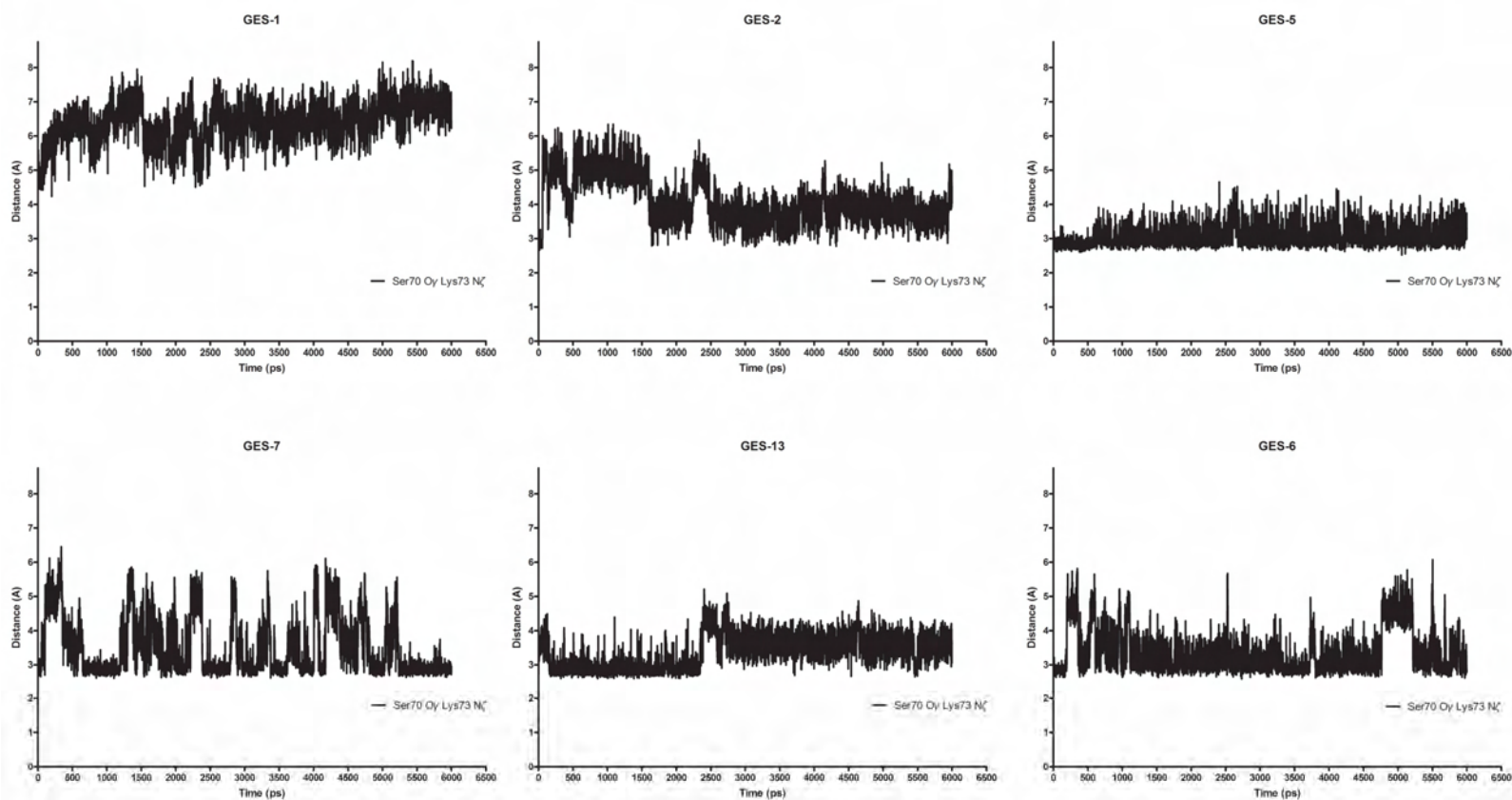


Εικόνα 20: Χάρτες δια-συσχέτισης των μετατοπίσεων των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού αμινοξύ-πρός-αμινοξύ. Το βέλος δηλώνει την συζευγμένη κίνηση κυρίως προς αντίθετες κατευθύνσεις των επικρατειών α/β και α η οποία ήταν πολύ έντονη στην GES-1.

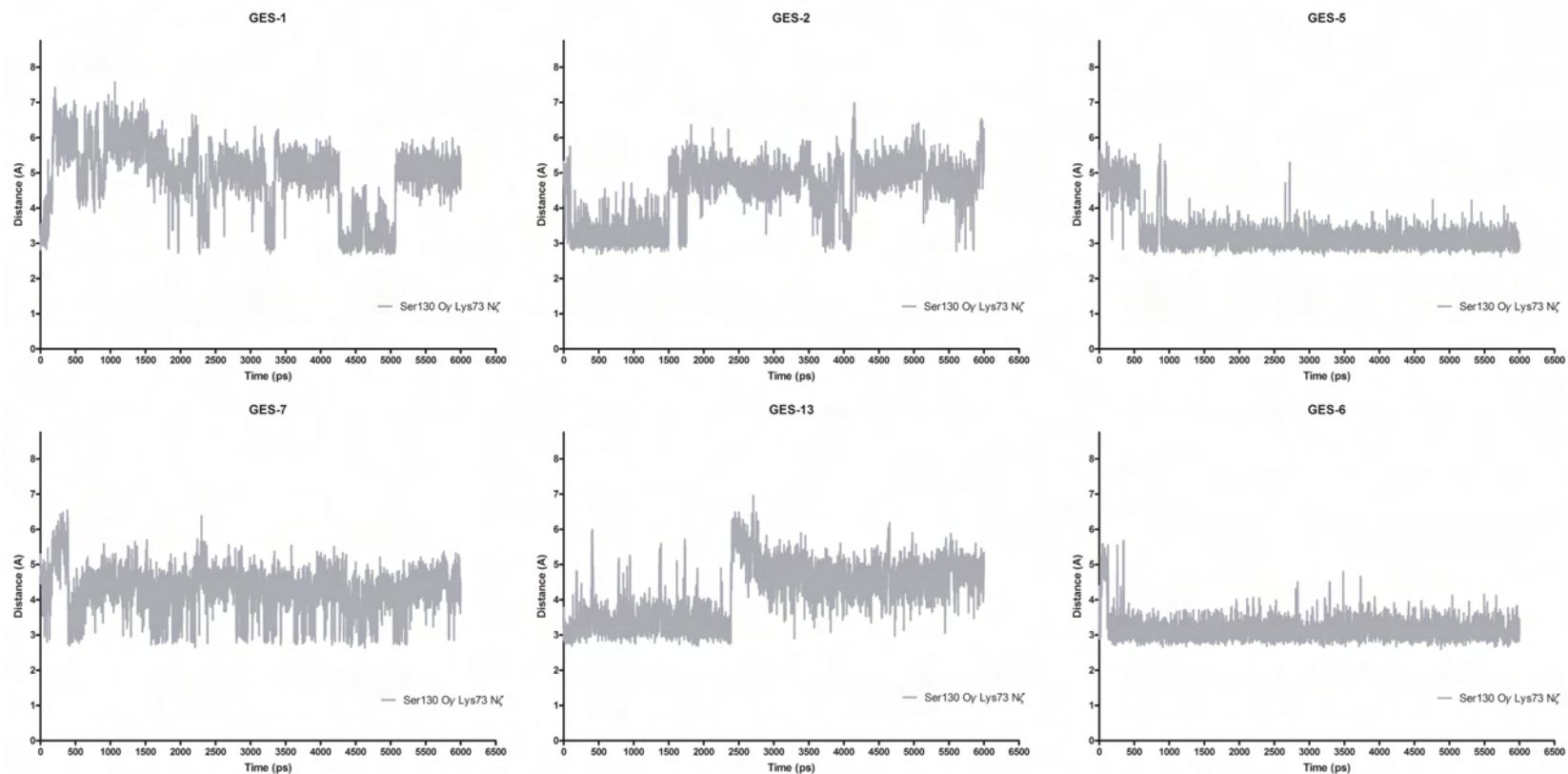
Ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων των έξι ενζύμων (Εικόνα 21) κατέστησε δυνατή την ταυτοποίηση κοινών μοτίβων ως προς την επίδραση της κάθε υποκατάστασης. Βρέθηκε λοιπόν ότι ασπαραγίνη ή σερίνη στη θέση 170 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της αμινομάδας της Lys73 με τα υδροξύλια των Ser70 και Ser130 και του καρβοξυλίου της Glu166 με την καταλυτική Ser70 (Εικόνες 22, 23 και 24, Πίνακας 17). Η ενίσχυση αυτή αποτυπώνονταν τόσο στην εγγύτητα των αλληλεπιδρούντων ομάδων όσο και στην σταθεροποίηση των μεταξύ τους αποστάσεων η οποία ήταν πολύ έντονη στην περίπτωση των ενζύμων με σερίνη στη θέση 170. Η επίδραση της λυσίνης στη θέση 104 στην περίπτωση που η θέση 170 καταλαμβάνονταν από γλυκίνη ή ασπαραγίνη ενίσχυε και σταθεροποιούσε το δίκτυο αυτό ενώ στην περίπτωση της GES-6 προκαλούσε αποσταθεροποίηση.



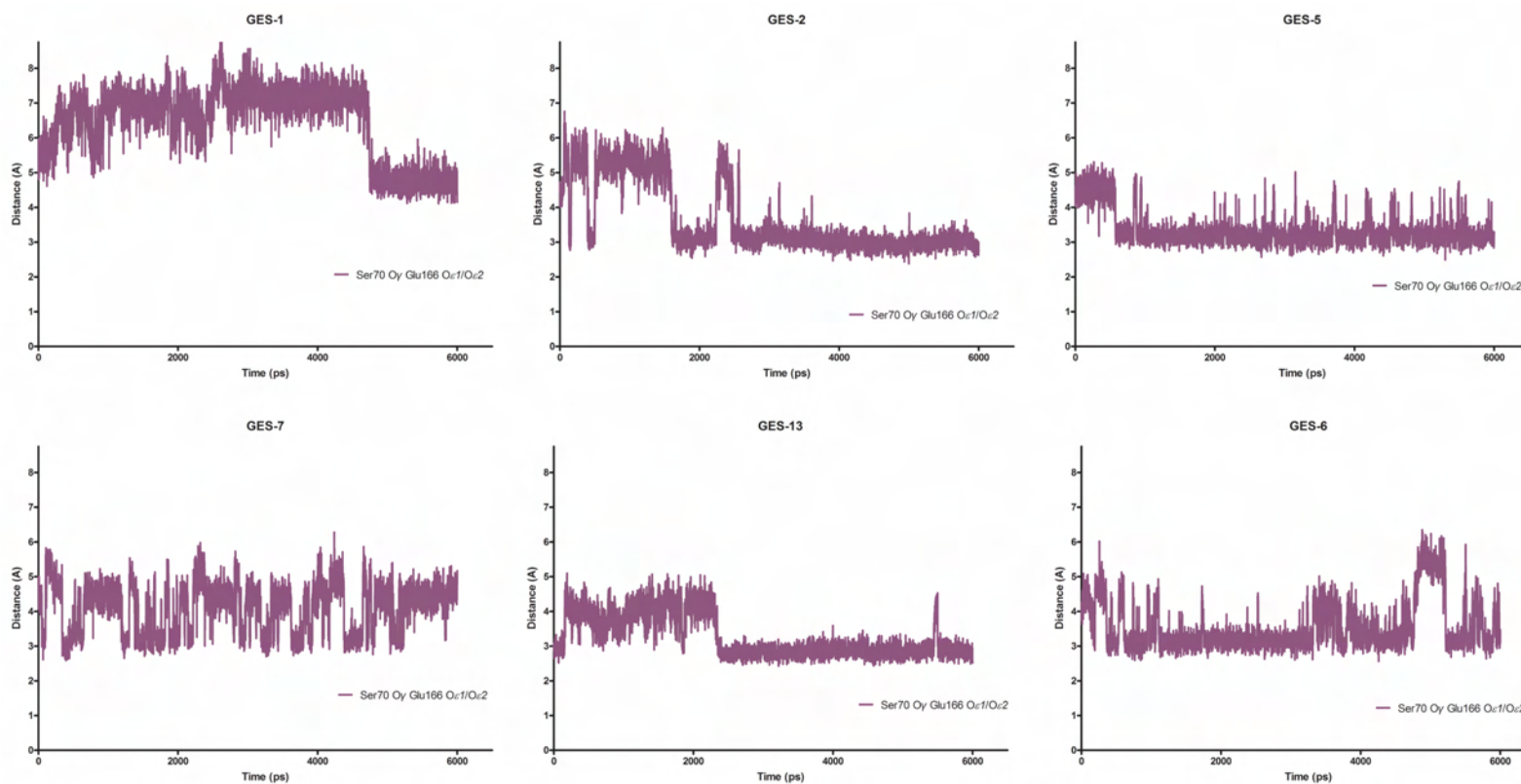
Εικόνα 21: Διαμόρφωση του ενεργού κέντρου και το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της καταλυτικής συσκευής στις μέσες ελαχιστοποιημένες δομές των έξι ενζύμων GES.



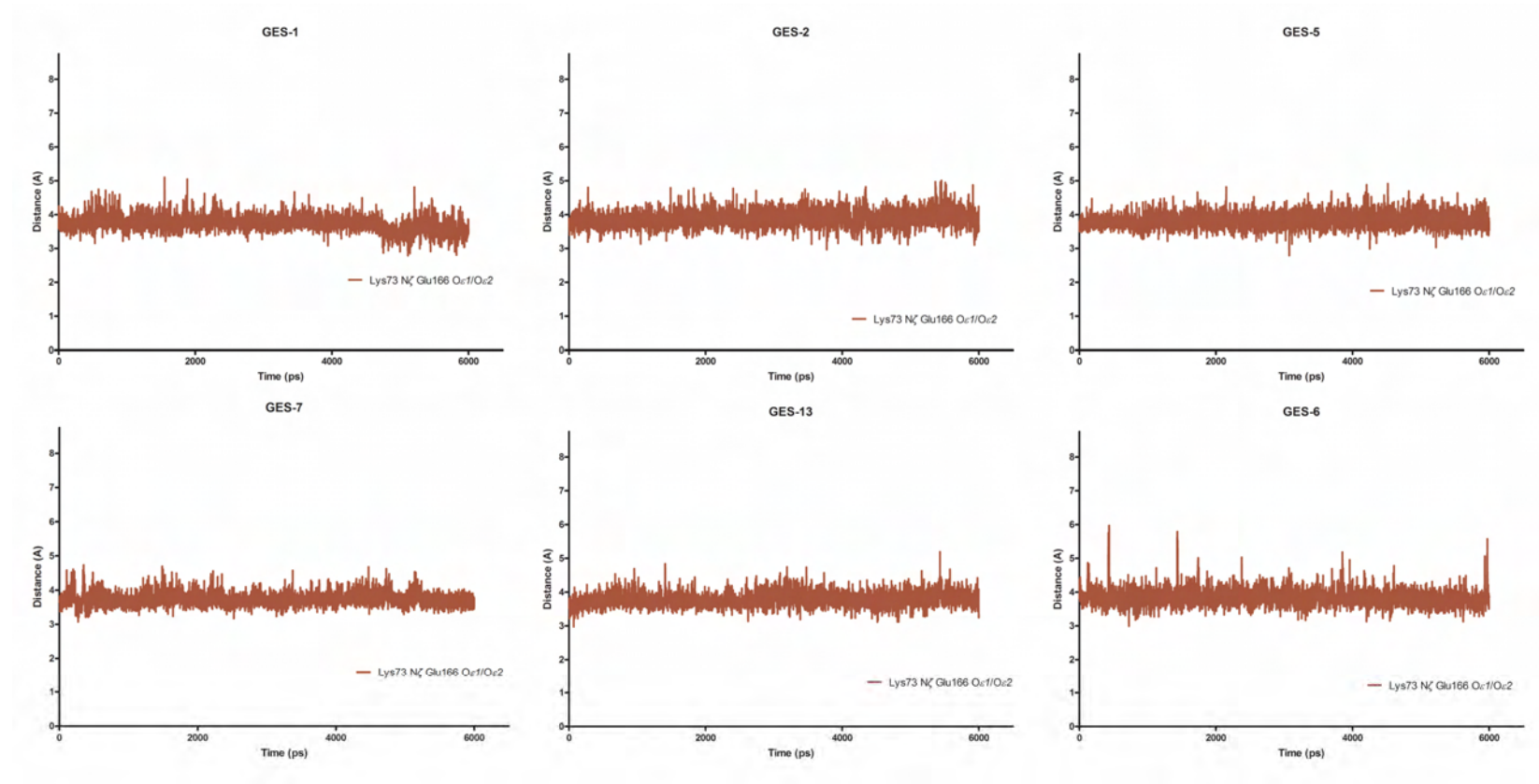
Εικόνα 22: Μεταβολή της απόστασης μεταξύ του αζώτου της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης 73 και του οξυγόνου του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης 70 σε συνάρτηση με τον χρόνο στις έξι ποικιλίες GES.



Εικόνα 23: Γραφήματα μεταβολής της απόστασης σε σχέση με τον χρόνο μεταξύ του αζώτου της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης 73 και του οξυγόνου του υδροξυλίου της σερίνης 130 του καταλυτικού μοτίβου SDN.



Εικόνα 24: Μεταβολή της απόστασης των πυρηνόφιλων οξυγόνων του καρβοξυλίου του καταλυτικού αμινοξέος Glu166 και του οξυγόνου της σερίνης 70 που ακυλώνεται από τα β-λακταμικά κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Έχει υπολογιστεί η απόσταση μεταξύ του κέντρου μάζας των O ϵ 1 και O ϵ 2 του Glu166 και του O γ της Ser70.



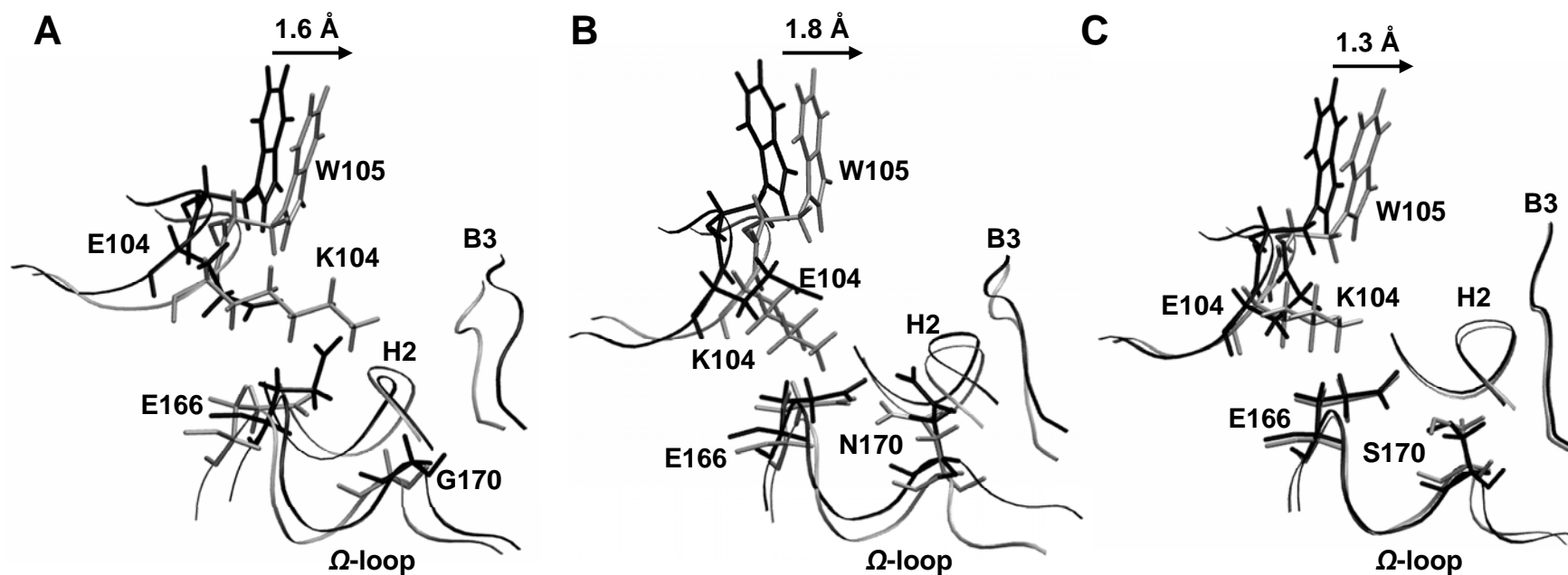
Εικόνα 25: Ισχυρή ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ του καρβοξυλίου της Glu166 και της φορτισμένης αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας της Lys73. Η ισχύς της αλληλεπίδρασης αυτής δεν εξαρτώνταν από τις υποκαταστάσεις στις θέσεις 104 και 170.

Πίνακας 17: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων στα έξι ένζυμα εκτιμώμενες βάσει απόστασης (Å)

Ένζυμο	Glu166 ^{Oε1/Oε2} - Lys73 ^{Nζ}	Glu166 ^{Oε1/Oε2} - Ser70 ^{Oγ}	Lys73 ^{Nζ} - Ser70 ^{Oγ}	Lys73 ^{Nζ} - Ser130 ^{Oγ}
GES-1	3,74±0,22	6,45±1,04	6,39±0,58	4,90±0,97
GES-2	3,88±0,24	3,67±1,01	4,11±0,68	4,47±0,86
GES-5	3,82±0,21	3,36±0,48	3,07±0,29	3,30±0,57
GES-7	3,74±0,18	4,08±0,73	3,53±0,83	4,26±0,63
GES-13	3,77±0,20	3,27±0,60	3,39±0,48	4,20±0,83
GES-6	3,83±0,24	3,54±0,71	3,35±0,61	3,17±0,34

Η απόσταση μεταξύ των δύο φορτισμένων αμινοξέων Glu166 και Lys73 δεν επηρεάζονταν από τις υποκατάστασεις στις θέσεις 104 και 170 και η μικρή τιμή της δήλωνε ισχυρή ιοντική αλληλεπίδραση σε όλα τα ένζυμα (Πίνακας 17, Εικόνα 25).

Η επίπτωση στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων του ενεργού κέντρου της ασπαραγίνης και της σερίνης στην θέση 170 οφείλονταν στην ικανότητά τους να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα του Glu166 (εικόνα 21). Στην περίπτωση της σερίνης, λόγω του μικρότερου όγκου της πλευρικής αλυσίδας της, οι δεσμοί αυτοί ήταν περισσότερο συχνοί και άρα η σταθεροποιητική επίδραση εντονότερη. Ενώ στην περίπτωση της ασπαραγίνης στη θέση 170, η ογκώδестη πλευρική αλυσίδα εμφάνιζε διαμορφώσεις όπου απομακρύνονταν από την Glu166 γεγονός που αποτυπώθηκε και στους αυξημένους θερμοκούς παράγοντες στη GES-2 (Εικόνα 18). Η λυσίνη στην θέση 104 φαίνεται ότι έχει κάποια επίδραση στην σταθερότητα του δεσμού μεταξύ Asn170-Glu166 αυξάνοντας την ισχύ του πιθανώς μέσω αλληλεπιδράσεων με την περιοχή αυτή της θηλειάς Ω την οποία "επισκιάζει" (Εικόνα 21). Η σταθεροποιητική επίδραση ήταν επίσης εμφανής και στην περίπτωση γλυκίνης στη θέση 170. Η υποκατάσταση Glu104Lys προκαλούσε επίσης αλλαγή στην θέση της τρυπτοφάνης 105 η οποία μετατακινούνταν προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου (Εικόνα 26). Αυτό συνέβαινε ανεξάρτητα από την φύση του αμινοξέος στην θέση 170 και μάλιστα, στην περίπτωση των GES-5 και GES-6, ήταν η κύρια διαφορά που παρατηρήθηκε στο ενεργό κέντρο. Το αμινοξύ αυτό αλληλεπιδρά με του δακτυλίου των δεσμευμένων β-λακταμικών και η παρατηρούμενη μετατόπιση θα μπορούσε να σχετίζεται με τις παρατηρούμενες βιοχημικές ιδιότητες των ενζύμων με Lys104.

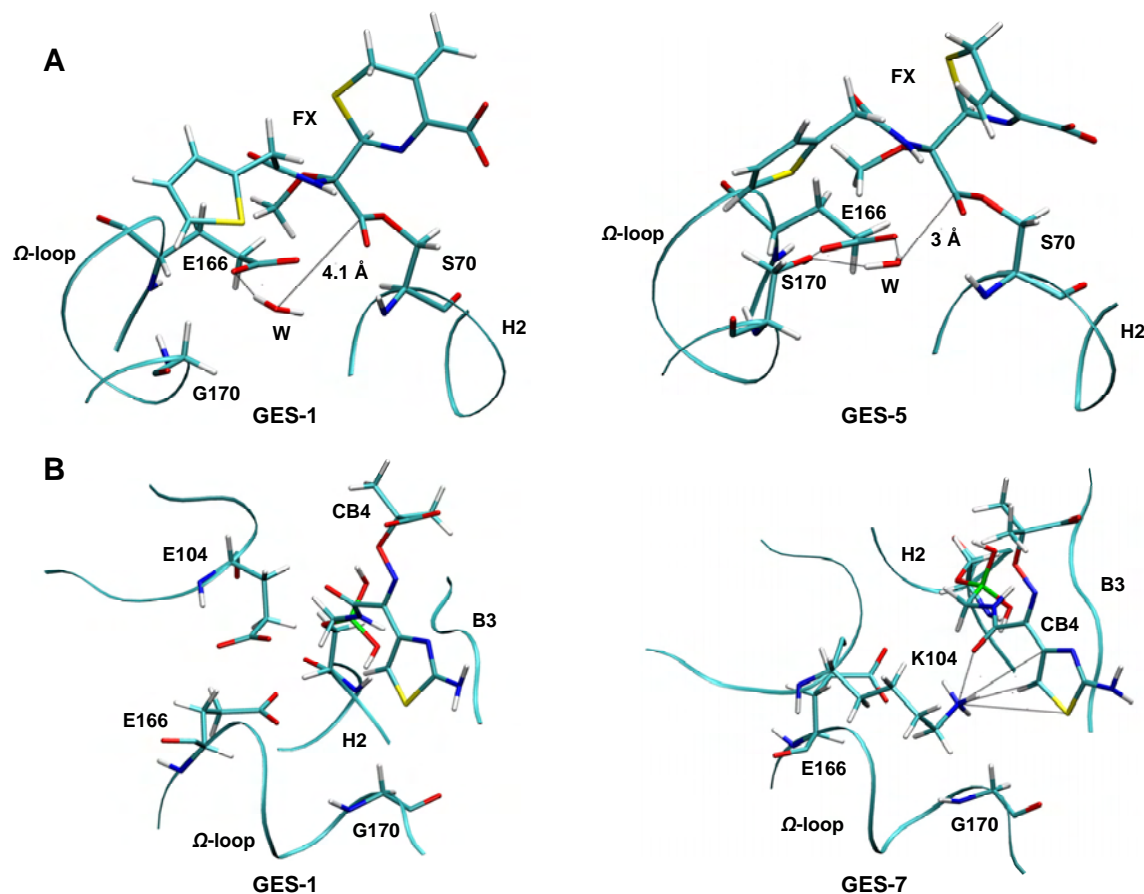


Εικόνα 26. Υπερτοποθέτηση των μέσων δομών των αποενζύμων που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις 6 ns. Συγκρίνονται τα ζεύγη GES E104 (μαύρο χρώμα) και K104 (γκρί χρώμα). Απεικονίζεται ο σκελετός των δευτεροταγών δομών που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο καθώς και η στερεοδιάταξη των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που μας ενδιαφέρουν. Παρατηρούμε την εκτεταμένη μετατόπιση της Trp105 προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου στα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104 σε σχέση με τα αντίστοιχα με γλουταμικό στη θέση 104. A: GES-1/GES-7, B: GES-2/GES-13, C: GES-5/GES-6. Είναι σαφές ότι στην περίπτωση του ζεύγους GES-5/GES-6 η θέση της Trp105 αποτελεί τη μόνη διαφορά μεταξύ των δύο ενεργών κέντρων. Η εκτίμηση του βαθμού μετατόπισης έγινε με προσδιορισμό της απόστασης μεταξύ των δύο ατόμων Cβ.

Οι δυναμικές και δομικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στα ελεύθερα ένζυμα GES θα μπορούσαν να σχετίζονται με τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Η σταθεροποίηση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των καταλυτικών αμινοξέων μπορεί να συσχετιστεί με την ικανότητα υδρόλυσης της ιμιπενέμης καθώς τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 που εμφάνιζαν τους υψηλότερους ρυθμούς διάσπασης του β-λακταμικού δακτυλίου του αντιβιοτικού αυτού χαρακτηρίζονταν από ισχυρές και σταθερές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω καταλοίπων. Η θέση της Trp105 επίσης φαίνεται να σχετίζεται με την υδρόλυση του υποστρώματος αυτού καθώς οι ποικιλίες με Lys104 στις οποίες η τρυπτοφάνη είχε μετατοπιστεί προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου εμφάνιζαν μειωμένη υδρόλυση του αντιβιοτικού εν σχέσει με τα ένζυμα με Glu104 λόγω ελάττωσης της ταχύτητας κατάλυσης και της φαινόμενης συγγένειας.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των ενζύμων GES δείχνουν μία "προδιάθεση" του ενεργού κέντρου τους αλλά δεν αποκαλύπτουν άμεσα πως επηρεάζονται τα στάδια της κατάλυσης κατά την αλληλεπίδραση με τις διάφορες ομάδες β-λακταμικών. Καθώς το στάδιο της ακυλίωσης δεν μπορεί να προσομοιωθεί με ακρίβεια, εξετάστηκε η δυναμική συμπεριφορά ομοιοπολικών συμπλόκων των ενζύμων με την κεφοξιτίνη και το μη χειρόμορφο βορονικό ανάλογο της κεφταζιδίμης. Για τις ΕΦΒΛ CTX-M όπως και άλλες βΛτΑ έχει βρεθεί ότι η κεφοξιτίνη δημιουργεί σταθερά ακυλ-ένζυμα τα οποία δεν μπορούν να υδρολυθούν με το στάδιο της απακυλίωσης να είναι πολύ αργό. Θεωρώντας ότι τα ένζυμα GES παρουσιάζουν ανάλογη συμπεριφορά με τις άλλες βΛτΑ η προσομοίωση του ακυλ-ενζύμου της κεφοξιτίνης θα μπορούσε να αποκαλύψει τις αιτίες για την αυξημένη υδρόλυση του αντιβιοτικού από τα ένζυμα με σερίνη στην θέση 170. Συγκρίνοντας τις μέσες δομές που υπολογίστηκαν για τις αντίστοιχες προσομοιώσεις βρέθηκε ότι στα ένζυμα με γλυκίνη ή ασπαραγίνη στη θέση 170 η 7α-μέθοξυ υποκατάσταση της κεφοξιτίνης τοποθετείται κοντά στην α-επιφάνεια του εστερικού δεσμού παρεμποδίζοντας την προσέγγιση του υδρολυτικού νερού που αλληλεπιδρά με το Glu166 (Εικόνα 27Α). Αντίθετα, στα ένζυμα με σερίνη στην θέση 170 ο σταθερός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται με το Glu166 δεν επέτρεπε στην μεθυλομάδα της μέθοξυ υποκατάστασης να παρεμποδίσει την προσέγγιση υδρολυτικού νερού καθώς αυτή τοποθετούνταν σε υψηλότερο επίπεδο από αυτό του εστερικού δεσμού (εικόνα 27Α).

Προσομοίωση συμπλόκων των ενζύμων GES με το βορονικό οξύ που φέρει την οξυίμινο R1 πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης ανέδειξε κάποιες πτυχές της δομικής βάσης διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων λόγω της Glu104Lys υποκατάστασης. Τα σύμπλοκα αυτά για τα ένζυμα τάξης A έχουν θεωρηθεί ότι αντιστοιχούν στην τετραεδρική ρίζα οξυανιόντος της κατάστασης μετάπτωσης της ακυλίωσης. Σύγκριση των αντίστοιχων δομών έδειξε ότι η λυσίνη 104 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα αρνητικά μερικά φορτία των αμινο-άκυλο πλευρικών αλυσίδων ενώ αντίθετα το γλουταμικό οξύ στην θέση αυτή μέσω άπωσης παρεμποδίζει την δέσμευση των αντίστοιχων υποκατάστασεων (Εικόνα 27B). Η καρβοξυλομάδα της R1 πλευρικής αλυσίδας της κεφταζιδίμης στο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα των προσομοιώσεων ήταν στραμμένη προς το B3 β-φύλλο και αλληλεπιδρούσε με την πλευρική αλυσίδα της Thr237 αλλά μέσω περιστροφής της κάρβοξυ-διμεθύλ-μέθυλο υποκατάστασης της R1 εμφάνιζε, σε σχετικά μικρές χρονικές περιόδους, αλληλεπίδρασης και με την Lys104. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις πιθανότατα ευθύνονται για την αύξηση της φαινόμενης συγγένειας που παρατηρήθηκε στις ποικιλίες με θετικό αμινοξύ στην θέση 104 κατά την αλληλεπίδρασή τους τόσο με κεφαλοσπορίνες όσο και με πενικιλίνες η οποία σε κάποιες περιπτώσεις οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης ακυλίωσης (π.χ. κατά την υδρόλυση οξυίμινο υποστρωμάτων).



Εικόνα 27. Α: Ομοιοπολικά σύμπλοκα των GES-1 και GES-5 με την κεφοξιτίνη. Απεικονίζονται μόνο τα καταλυτικά αμινοξέα Ser70 και Glu166, το αμινοξύ στη θέση 170 και η κεφοξιτίνη. Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της GES-1 το υδρολυτικό νερό κατα την διάρκεια της προσομοίωσης εκτοπίζεται σε απομακρυσμένη θέση ως προς τον εστερικό δεσμό λόγω της 7(α)-μέθοξυ ομάδας ενώ στην περίπτωση της GES-5 ο ισχυρός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ της Ser170 και της Glu166 δεν επιτρέπει την παρεμπόδιση αυτή με το απακλυτικό νερό να παραμένει δεσμευμένο στα δύο αμινοξέα και σε εγγύτητα ως προς τον ακυλωμένο άνθρακα. Β: Ομοιοπολικά σύμπλοκα των GES-1 και GES-7 με το βορονικό ανάλογο της κεφταζιδίμης. Παρατηρούμε τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης της θετικά φορτισμένης Lys104 με τα αρνητικά μερικά φορτία της πλευρικής αλυσίδας της κεφταζιδίμης. Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης με την καρβοξυλομάδα της κεφταζιδίμης δεν είναι μηδαμινή καθώς κάρβοξυ-διμεθύλ-μεθύλ ομάδα περιστρέφεται κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης και υπάρχουν στιγμές όπου η πρωτονιομένη αμινομάδα της Lys104 κάνει γέφυρα αλατιού με την αποπρωτονιομένη καρβοξυλομάδα.

Τα παράγωγα pBC που προέκυψαν από τα πειράματα κλωνοποίησης (Εικόνα 3) ελέγχθηκαν ως προς την αντοχή που προσδίδουν σε κλώνους *E. coli* DH5a έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Συγκρίνοντας τους παρατηρούμενους φαινότυπους με τους αντίστοιχους των στελεχών που έφεραν τα πατρικά πλασμίδια και παρήγαγαν τις GES-1, GES-2 και GES-5 προέκυψαν κάποιες ενδεχόμενες επιδράσεις των υπό μελέτη υποκαταστάσεων (Πίνακας 1). Παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση του γλουταμικού στη θέση 104 με προλίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη ή αλανίνη οδηγούσε σε μειωμένη ευαισθησία έναντι των οξυμίμο β-λακταμικών με τις εντονότερες διαφορές να παρατηρούνται στην αναστολή που προκαλούσαν η κεφταζιδίμη και η αζτρεονάμη ειδικά όταν η θέση 170 καταλαμβάνονταν από γλυκίνη ή ασπαραγίνη. Η προλίνη και η αργινίνη στη θέση 104 μειώναν επίσης την ευαισθησία έναντι των συνδυασμών πενικιλινών με το κλαβουλανικό οξύ. Όταν η θέση 170 καταλαμβάνονταν από σερίνη παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της αντοχής έναντι της κεφοξιτίνης στις περιπτώσεις των υποκαταστάσεων Glu104Pro, Glu104Arg, Glu104Asn και Glu104Ala.

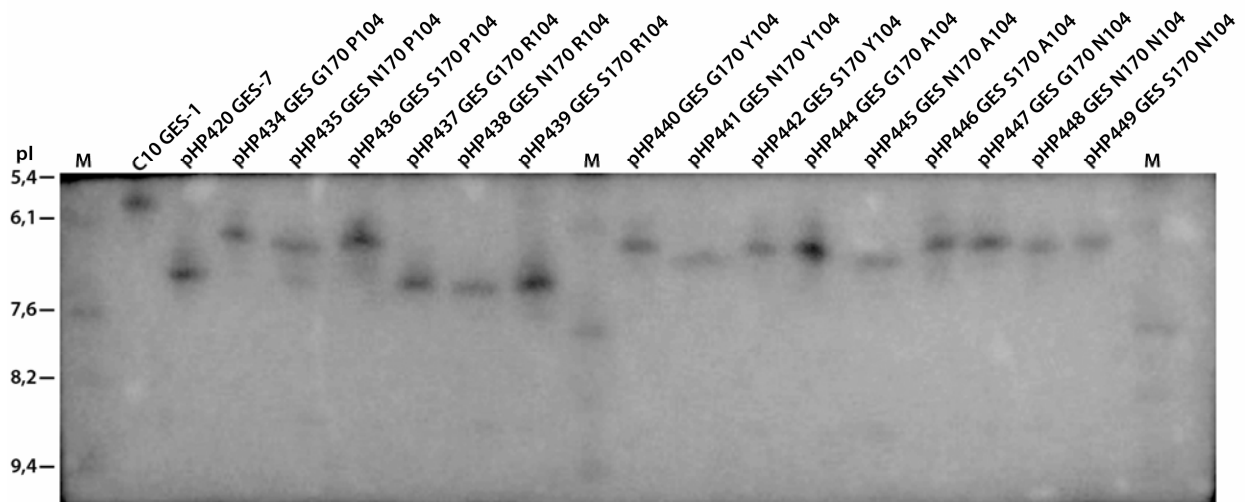
Η παραγωγή των β-λακταμασών από τα στελέχη που έφεραν τα πλασμίδια που προέκυψαν από τα πειράματα μεταλλαξογένεσης επιβεβαιώθηκε με αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση. Τα pI που παρατηρήθηκαν (Πίνακας 2, Εικόνα 4) εμφάνιζαν διαφορά της τάξης των 0,4 μονάδων από τα θεωρητικά των ώριμων πρωτεϊνών εκτός από τους μεταλλάκτες με αργινίνη στη θέση 104 όπου η διαφορά ήταν 0,56 μονάδες όπως και στην περίπτωση των φυσικών ενζύμων GES με λυσίνη στη θέση αυτή.

ii. Επίδραση της φύσης του αμινοξέος στη θέση 104 στους φαινότυπους ευαισθησίας των ενζύμων τύπου GES

Η εκτίμηση των αλλαγών που επάγονται από τις μεταλλάξεις στη θέση 104 στο φάσμα ευαισθησίας έγινε με προσδιορισμό των ελαχίστων συγκεντρώσεων αναστολής. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος E-test ενώ για κάποια αντιβιοτικά οι τιμές MIC προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων (Πίνακας 3). Στα πειράματα συμπεριλήφθηκαν και οι pBC κλώνοι που παρήγαγαν τις φυσικές ποικιλίες GES (Πίνακας 3).

Πίνακας 2: Ισοηλεκτρικά σημεία των μεταλλακτών 104 των GES

Στέλεχος	GES	104	170	pI _μ	pI _θ
<i>E. coli</i> DH5a					
ρHP434	Μεταλλάκτης	Pro	Gly	6,4	6,0
ρHP435	Μεταλλάκτης	Pro	Asn	6,4	6,0
ρHP436	Μεταλλάκτης	Pro	Ser	6,4	6,0
ρHP437	Μεταλλάκτης	Arg	Gly	6,9	6,34
ρHP438	Μεταλλάκτης	Arg	Asn	6,9	6,34
ρHP439	Μεταλλάκτης	Arg	Ser	6,9	6,34
ρHP440	Μεταλλάκτης	Tyr	Gly	6,4	6,0
ρHP441	Μεταλλάκτης	Tyr	Asn	6,4	6,0
ρHP442	Μεταλλάκτης	Tyr	Ser	6,4	6,0
ρHP444	Μεταλλάκτης	Ala	Gly	6,4	6,0
ρHP445	Μεταλλάκτης	Ala	Asn	6,4	6,0
ρHP446	Μεταλλάκτης	Ala	Ser	6,4	6,0
ρHP447	Μεταλλάκτης	Asn	Gly	6,4	6,0
ρHP448	Μεταλλάκτης	Asn	Asn	6,4	6,0
ρHP440	Μεταλλάκτης	Asn	Ser	6,4	6,0



Εικόνα 4: Αναλυτική ισοηλεκτρική εστίαση των μεταλλακτών της θέσης 104. Στην ηλεκτροφόρηση είχαν συμπεριληφθεί και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από στελέχη που παρήγαγαν τις GES-1 και GES-7 οι οποίες εστίαζαν σε pH 5,9 και 6,9 αντίστοιχα. Μάρτυρας που περιείχε μίγμα β-λακταμασών με γνωστά pI.

Πίνακας 3: Ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής β-λακταμικών έναντι των κλώνων *E. coli* DH5a που παράγαν τα φυσικά ένζυμα GES και τους εργαστηριακούς μεταλλάκτες αυτών υπό ισογονικές συνθήκες.

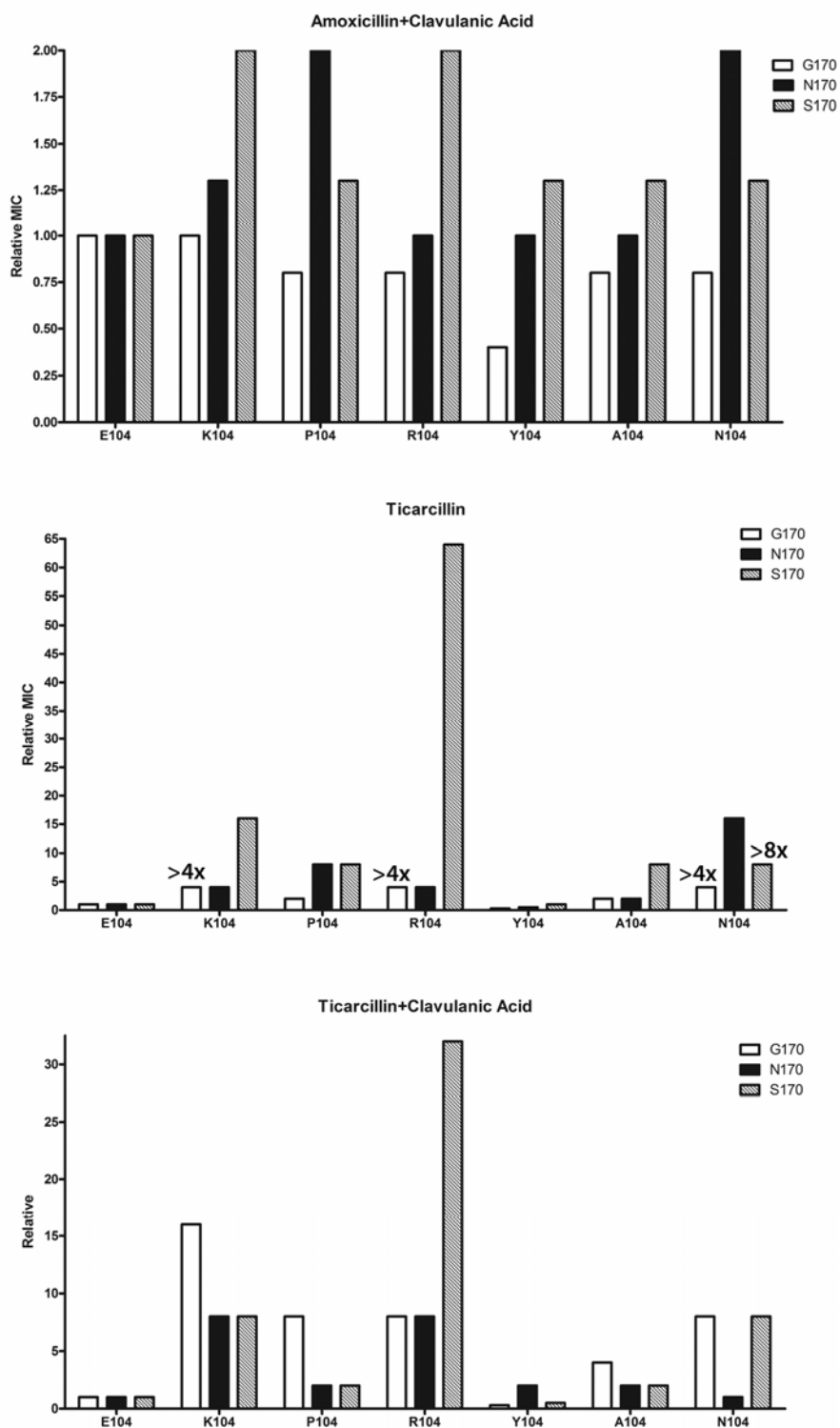
		MIC (μg/ml)																
Στέλεχος	β-λακταμάση	^a TIC	PIP	TZP	AMC	^a TCC	^a CEF	^a CXM	^a CECLOR	^a CAZ	CTX	CRO	^a ATM	FEP	^a FOX	IPM	MEM	
C10	pBC-SK	GES-1 (G170,E104)	2048	96	24	32	32	1024	512	1024	64	6	24	4	1	4	0,25	0,032
pHP413	pBC-SK	GES-2 (N170,E104)	512	16	1	6	4	128	128	64	1	3	4	0,25	0,19	4	0,38	0,032
pHP415	pBC-SK	GES-5 (S170,E104)	128	16	16	24	64	256	8	128	1	0,38	1,5	<0,06	0,125	16	1,5	0,190
pHP420	pBC-SK	GES-7 (G170,K104)	≥8192	128	2	32	512	512	512	512	512	12	32	16	1	8	0,25	0,032
pHP417	pBC-SK	GES-13 (N170,K104)	2048	64	1,5	8	32	256	2048	256	128	12	32	8	0,5	8	0,38	0,032
pHP418	pBC-SK	GES-6 (S170,K104)	2048	256	128	48	512	1024	32	256	8	0,75	4	1	0,094	64	1,0	0,125
pHP434	pBC-SK	G170,P104	4096	256	16	24	256	2048	1024	256	256	16	48	8	1,5	8	0,25	0,032
pHP435	pBC-SK	N170,P104	4096	256	1,5	12	8	512	2048	512	64	24	64	4	1	8	0,38	0,047
pHP436	pBC-SK	S170,P104	1024	256	192	32	128	1024	32	256	4	1,5	4	0,25	0,125	64	1,5	0,190
pHP437	pBC-SK	G170,R104	≥8192	48	1,5	24	256	256	1024	64	256	12	32	32	1	8	0,25	0,032
pHP438	pBC-SK	N170,R104	2048	24	1,5	6	32	256	1024	128	128	8	24	64	0,19	16	0,38	0,032
pHP439	pBC-SK	S170,R104	≥8192	192	96	48	2048	1024	128	256	16	1,5	8	1	0,125	256	1,0	0,125
pHP440	pBC-SK	G170,Y104	512	16	12	12	8	256	128	32	16	4	6	1	0,5	8	0,25	0,023
pHP441	pBC-SK	N170,Y104	256	48	2	6	8	64	128	32	8	12	16	1	0,5	4	0,50	0,032
pHP442	pBC-SK	S170,Y104	128	32	24	32	32	256	32	32	1	1,5	4	<0,06	0,094	64	1,0	0,094
pHP444	pBC-SK	G170,A104	4096	192	4	24	128	512	1024	256	256	8	32	8	1	8	0,25	0,032
pHP445	pBC-SK	N170,A104	1024	16	1	6	8	256	512	128	8	2	6	1	0,125	4	0,25	0,023
pHP446	pBC-SK	S170,A104	1024	128	64	32	128	512	64	256	4	1	3	0,25	0,094	128	1,5	0,125
pHP447	pBC-SK	G170,N104	≥8192	256	4	24	256	1024	1024	256	1024	16	32	16	1,5	8	0,25	0,032
pHP448	pBC-SK	N170,N104	≥8192	192	2	12	2	512	2048	1024	128	24	64	16	1	8	0,38	0,032
pHP449	pBC-SK	S170,N104	1024	256	128	32	512	1024	64	256	8	1,5	4	0,50	0,125	128	1,0	0,125

^a Για τα αντιβιοτικά αυτά οι MIC εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε ζυμό ΜΗ.

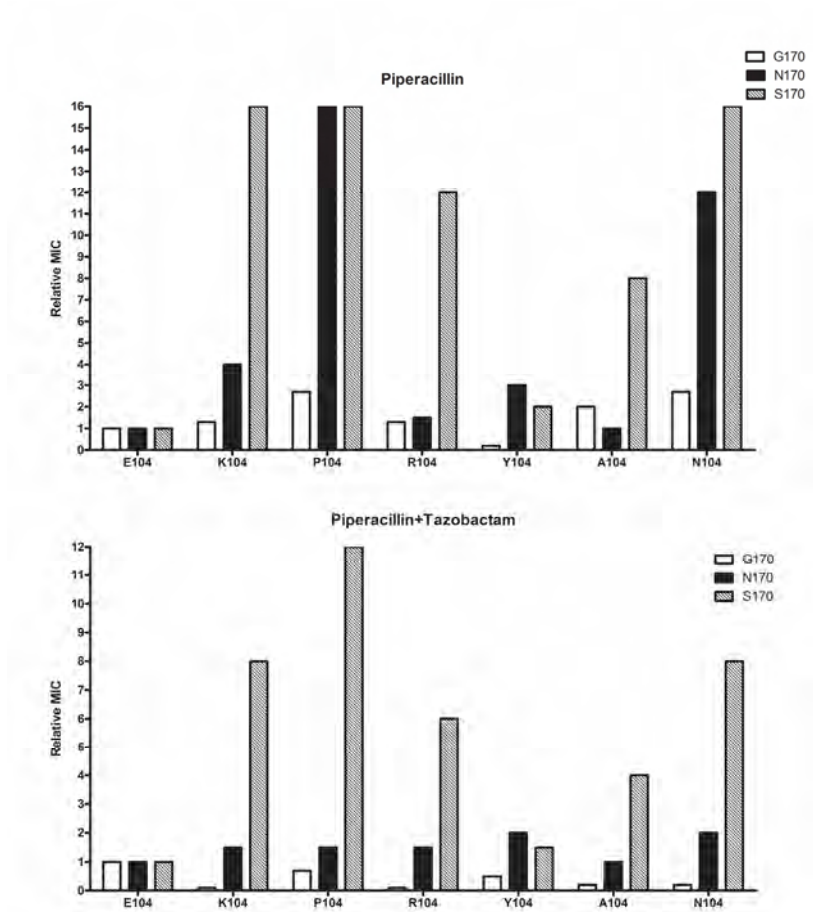
Η επίδραση της κάθε μετάλλαξης της θέσης 104 στις ποικιλίες Gly, Asn και Ser170 των ενζύμων GES εκτιμήθηκε συγκρίνοντας το κάθε εργαστηριακό ένζυμο με το αντίστοιχο πατρικό του (ως προς τη θέση 170) υπολογίζοντας τις σχετικές MIC ($MIC^{Μεταλλάκτη}/MIC^{Πατρικού\ ενζύμου}$). Στις συγκρίσεις συμπεριλήφθηκαν και τα φυσικά ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104.

Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα ευαισθησίας έναντι του συνδυασμού αμοξικιλίνης/κλαβουλανικού οξέος δεν ήταν σημαντικές (Εικόνα 5). Σημειώθηκε αύξηση των MIC κατά 2 φορές στην περίπτωση των ενζύμων με λυσίνη ή αργινίνη στη θέση 104 και σερίνη στη θέση 170 και σε αυτά με προλίνη ή ασπαραγίνη 104 και ασπαραγίνη στη θέση 170. Οι μεταβολές ήταν περισσότερο εκτεταμένες στην περίπτωση του συνδυασμού τικαρκιλίνης/ κλαβουλανικού οξέος με την πλειονότητα των μεταλλακτών, εκτός από αυτούς με Tyr104, να παρουσιάζει αύξηση στις τιμές MIC (Εικόνα 5). Η παραπάνω αύξηση όμως ήταν σχεδόν πάντα αντίστοιχη με αυτή που παρατηρήθηκε στις τιμές MIC της τικαρκιλίνης. Έτσι η όποια επίδραση της θέσης 104 στα επίπεδα αντοχής των συνδυασμών πενικιλινών με κλαβουλανικό οξύ σχετίζεται με την αυξημένη υδρόλυση που παρουσιάζουν τα αντίστοιχα ένζυμα έναντι της πενικιλίνης του συνδυασμού παρά με ενδεχόμενη μειωμένη ευαισθησία στον αναστολέα.

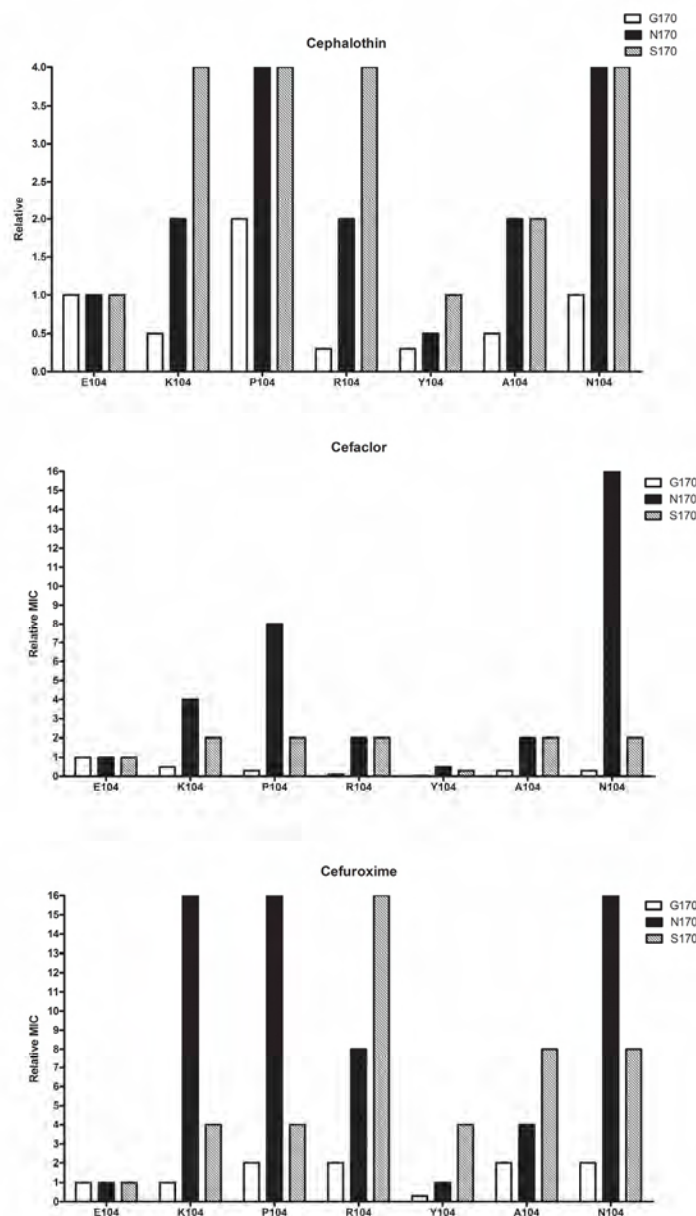
Λυσίνη, προλίνη, αργινίνη, αλανίνη και ασπαραγίνη στη θέση 104 προκαλούσαν αύξηση στα επίπεδα ευαισθησίας έναντι της πιπερακιλλίνης ειδικά όταν η θέση 170 καταλαμβάνονταν από ασπαραγίνη ή σερίνη. Ωστόσο, όταν η πενικιλίνη αυτή συνδυάζονταν με ταζοβακτάμη παρατηρήθηκε αύξηση μόνο για τις ποικιλίες Ser170 (Εικόνα 6) η οποία ήταν μικρότερου βαθμού από τις αντίστοιχες αυξήσεις έναντι της πιπερακιλλίνης. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι όταν η θέση 170 καταλαμβάνονταν από γλυκίνη αυξάνονταν η ευαισθησία έναντι του συνδυασμού (Εικόνα 6), υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάκτες της θέσης 104 αναστέλλονταν σε μεγαλύτερο βαθμό από την ταζοβακτάμη σε σχέση με τα πατρικά ένζυμα.



Εικόνα 5: Μεταβολές στα επίπεδα ευαισθησίας έναντι αμοξικιλίνης/κλαβουλανικού οξέος, τικαρκιλίνης και τικαρκιλίνης κλαβουλανικού οξέος.



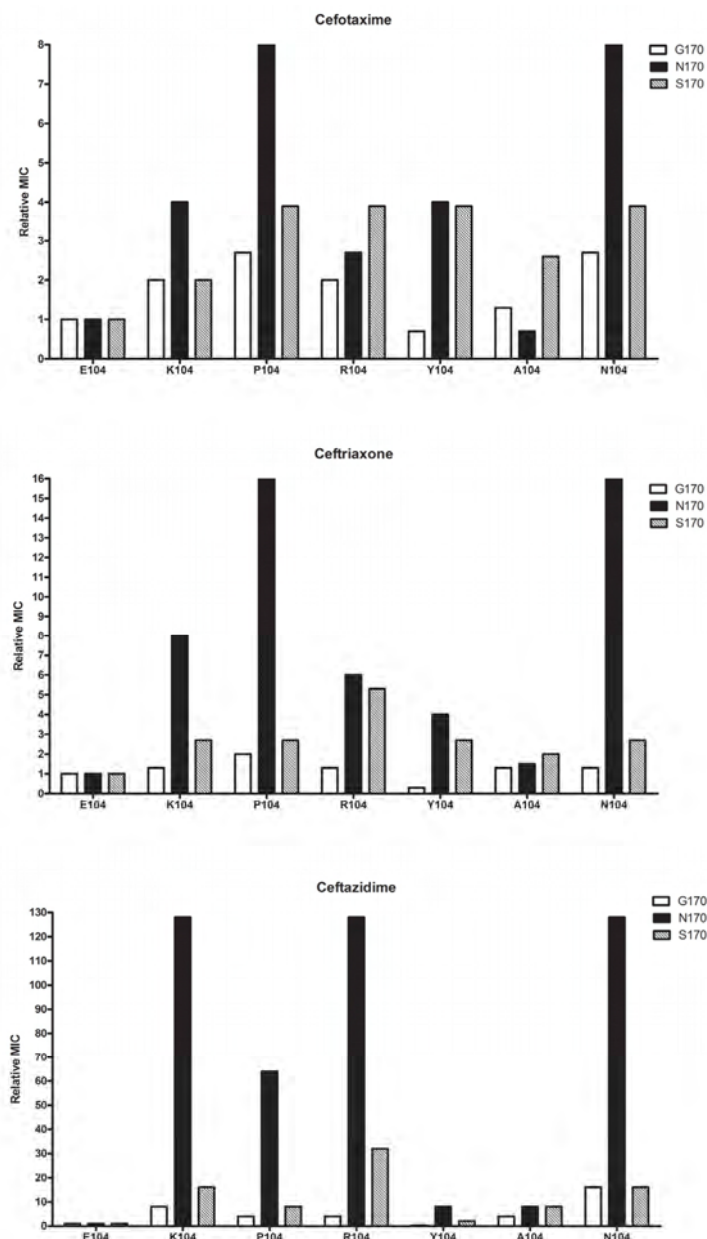
Εικόνα 6: Μεταβολές στα επίπεδα ευαισθησίας έναντι πιπερακιλλίνης και πιπερακιλλίνης/ταζοβακτάμης.



Εικόνα 7: Επίδραση στα επίπεδα αντοχής έναντι των παλαιότερων κεφαλοσπορινών.

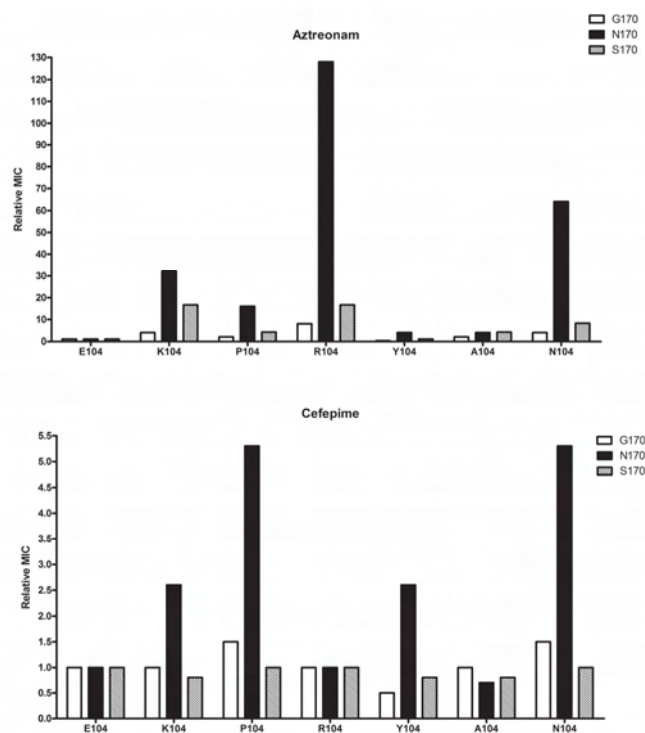
Όταν στη θέση 170 απαντούσε ασπαραγίνη ή σερίνη όλες οι μεταλλάξεις πλὴν της Glu104Tyr προκαλούσαν αύξηση στα επίπεδα αντοχής της κεφαλοθίνης (Εικόνα 7). Όταν τα ένζυμα έφεραν Gly170 οι MIC είτε παρέμεναν σταθερές (Asn104) είτε μειώνονταν με τη μεγαλύτερη μεταβολή να σημειώνεται στο ένζυμο με Arg104 (4 φορές

μείωση). Παρόμοιες επιδράσεις παρατηρήθηκαν και έναντι της κεφακλόρης (Εικόνα 7). Επί παρουσίας Ser170 όλοι οι μεταλλάκτες της θέσης 104 ήταν περισσότερο ανθεκτικοί έναντι της οξυμίμο κεφαλοσπορίνης δεύτερης γενεάς κεφουροξίμης ενώ όταν το κατάλοιπο στη θέση 170 ήταν ασπαραγίνη ο μεταλλάκτης Tyr104 δεν παρουσίασε μεταβολή στα επίπεδα ευαισθησίας αντίθετα με τις υπόλοιπες ποικιλίες που σημείωσαν αύξηση (Εικόνα 7). Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα ένζυμα με Gly170 ήταν περιορισμένες.



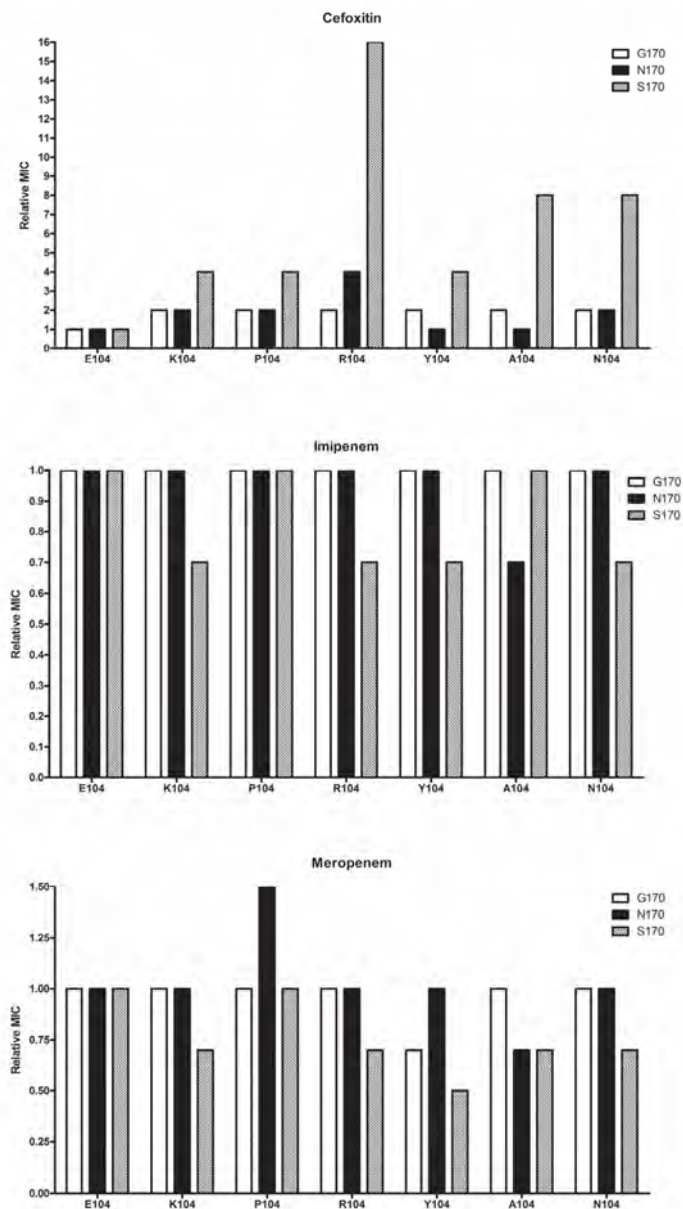
Εικόνα 8: Διέρυνση του φάσματος των μεταλλακτών της θέσης 104 προς τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς.

Όλες οι μεταλλάξεις στη θέση 104 προκάλεσαν αύξηση στα επίπεδα αντοχής στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς κεφοταξίμη και κεφτριαξόνη. Η αύξηση ήταν έντονη στις περιπτώσεις όπου στη θέση 170 απαντούσε Asn ή Ser με τους μεταλλάκτες Lys104, Pro104, Arg104 και Asn104 να σημειώνουν τις υψηλότερες μεταβολές (Εικόνα 8). Στις περιπτώσεις των ενζύμων με Gly170 οι τιμές MIC δεν μεταβάλλονταν πάνω από 3 αραιώσεις ενώ στην περίπτωση της Tyr104 σημειώθηκε μείωση. Έναντι της κεφταζιδίμης παρατηρήθηκε επίσης αύξηση η οποία ήταν σημαντική ακόμα και στην περίπτωση των ποικιλιών με Gly170 (εκτός από το ένζυμο με Tyr104). Οι μεταλλάκτες με Lys104, Pro104, Arg104 και Asn104 φαίνεται ότι είχαν έντονη επίδραση στην υδρόλυση της κεφταζιδίμης επάγοντας σημαντική αύξηση της αντοχής. Αλανίνη στη θέση 104 οδηγούσε επίσης σε αύξηση των MIC η οποία ήταν μικρότερου βαθμού (Εικόνα 8). Όταν η θέση 104 καταλαμβάνονταν από τυροσίνη ουσιαστική αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στο ένζυμο με Asn170. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι, εκτός από λυσίνη στη θέση 104, διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων προς την υδρόλυση οξυίμινο μορίων και ειδικά κεφταζιδίμης στα ένζυμα GES μπορεί να επιτευχθεί και μέσω άλλων αμινοξέων όπως προλίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη και σε μικρότερο βαθμό αλανίνη.



Εικόνα 9: Μεταβολές που προκαλούνται στα επίπεδα ευαισθησίας έναντι αζτρεονάμης και κεφεπίμης.

Παρόμοια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν συγκρίνοντας τις MIC της αζτρεονάμης, η οποία φέρει την ίδια οξυμίμο πλευρική αλυσίδα με την κεφαζιδίμη, μεταλλαγμένων και πατρικών ενζύμων. Σε αυτή την περίπτωση η αύξηση που παρατηρήθηκε στα ένζυμα με Asn170 ήταν εκτεταμένη στους μεταλλάκτες Lys104, Arg104, Asn104 και Pro104 (Εικόνα 9). Η ευαισθησία έναντι της κεφεπίμης μειώθηκε πάνω από πέντε φορές στα ένζυμα με ασπαραγίνη στη θέση 170 και προλίνη ή ασπαραγίνη στη θέση 104 (εικόνα 9).



Εικόνα 10: Επίδραση στα επίπεδα ευαισθησίας της κεφοξιτίνης και καρβαπενεμών.

Οι εργαστηριακοί μεταλλάκτες της θέσης 104 όπως και το φυσικό ένζυμο με λυσίνη στη θέση αυτή εμφανίζονταν περισσότερο ανθεκτικοί στην κεφοξιτίνη όταν η θέση 170 καταλαμβάνονταν από σερίνη (Εικόνα 10). Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.B, οι GES με σερίνη 170 υδρολύουν αποδοτικά το υπόστρωμα αυτό και από τα παραπάνω εξάγεται ότι αντικατάσταση του αρνητικού αμινοξέος με κάποιο θετικά φορτισμένο ή με ουδέτερη πλευρική αλυσίδα αυξάνει την καταλυτική ικανότητα των ενζύμων αυτών. Περιορισμένη αύξηση παρατηρήθηκε και στις υπόλοιπες ποικιλίες 170 με την μετάλλαξη Glu104Arg σε υπόβαθρο Asn170 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μεταβολή (Εικόνα 10).

Τα επίπεδα ευαισθησίας των καρβαπενεμών δεν μεταβάλλονταν σημαντικά από τις εξεταζόμενες μεταλλάξεις. Παρατηρήθηκε μία περιορισμένη αύξηση στην ευαισθησία των στελεχών που παρήγαγαν τα ένζυμα με Ser170 έναντι της μιπενέμης και της μεροπενέμης σε όλους τους μεταλλάκτες εκτός από αυτούς με προλίνη στη θέση 104 όπου οι MIC δεν μεταβλήθηκαν. Μάλιστα στην περίπτωση του ενζύμου με ασπαργίνη στη θέση 170 παρατηρήθηκε αύξηση στην MIC της μεροπενέμης από την Glu104Pro υποκατάσταση.

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι η αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος στα ένζυμα GES με κάποιο θετικό αμινοξύ (λυσίνη ή αργινίνη) ή κάποιο ουδέτερο (προλίνη, ασπαραγίνη, αλανίνη και τυροσίνη) αυξάνει τον χαρακτήρα εκτεταμένου φάσματος των β-λακταμασών αυτών (αυξάνοντας την υδρόλυση έναντι των οξυίμινο υποστρωμάτων και την ευαισθησία στην ταζοβακτάμη) με τα θετικά αμινοξέα, την προλίνη και την ασπαραγίνη να έχουν την περισσότερο έντονη επίδραση. Ο βαθμός αύξησης της αντοχής εξαρτώνταν από τη φύση του αμινοξέος στη θέση 170 τουλάχιστον για κάποια υποστρώματα. Ο παραπάνω χαρακτήρας εκτεταμένου φάσματος συνοδεύονταν από μικρή μείωση στην ενεργότητα καρβαπενεμάσης για τα ένζυμα με Ser170 τα οποία υδρολύουν αποδοτικά τα αντίστοιχα υποστρώματα. Το παραπάνω δεν παρατηρήθηκε για το ένζυμο με προλίνη στη θέση 104.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A. Μηχανισμοί διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων στις τάξεις C β-λακταμάσες του τύπου CMY-2

Οι υποκαταστάσεις Val211Gly και Val211Ser στην CMY-2 είχαν ως αποτέλεσμα την διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων προς την υδρόλυση οξυίμινο β-λακταμικών (τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες και αζτρεονάμη) όπως αποτυπώθηκε στην αύξηση των επιπέδων αντοχής έναντι των παραπάνω αντιβιοτικών όταν τα αντίστοιχα γονίδια παράγονταν από στελέχη *E. coli* υπό το ίδιο γενετικό υπόβαθρο καθώς και από το βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων. Η CMY-30 (Gly211) ήταν περισσότερο ενεργή έναντι της κεφοταξίμης και της αζτρεονάμης συγκρινόμενη με τη CMY-42 (Ser211) ενώ αναφορικά με την υδρόλυση κεφαταξιδίμης τα δύο ένζυμα εμφάνιζαν παρόμοιους ρυθμούς κατάλυσης με το τελευταίο να είναι κατά τί πιο ενεργό. Η αύξηση της καταλυτικής ικανότητας οφείλονταν σε αύξηση των ρυθμών ανακύκλωσης k_{cat} οι οποίοι για τις αλληλεπιδράσεις αυτές δηλώνουν την σταθερά ταχύτητας υδρόλυσης του εστέρα κατά την αντίδραση απακυλίωσης (k_3). Παράλληλα οι δύο υποκαταστάσεις προκαλούσαν μείωση στη φαινόμενη συγγένεια έναντι των παραπάνω υποστρωμάτων όπως αποτυπώθηκε στις αυξημένες σταθερές *Michaelis*.

Η αύξηση των K_m όμως ενδέχεται να οφείλονταν στους αυξημένους ρυθμούς απακυλίωσης οπότε μετρήθηκαν οι σταθερές αναστολής βορονικών οξέων που έφεραν τις οξυίμινο πλευρικές αλυσίδες της κεφοταξίμης και της κεφαταξιδίμης (άρα και της αζτρεονάμης) ώστε να εκτιμηθούν ενδεχόμενες μεταβολές ως προς την συγγένεια για τις παραπάνω δομές. Πράγματι τα ένζυμα που υδρόλυαν αποδοτικότερα οξυίμινο υποστρώματα εμφανίζονταν να έχουν μικρότερη συγγένεια για τις R1 πλευρικές αλυσίδες των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν όμως να είναι μικρότερες από αυτές που σημειώθηκαν για τις K_m . Ο βαθμός μείωσης της συγγένειας των βορονικών αναλόγων ήταν ανάλογος με την ταχύτητα υδρόλυσης του β-λακταμικού που έφερε την αντίστοιχη πλευρική αλυσίδα. Έτσι τα βορονικά οξέα που έφεραν την αμινοθειαζόλ-μεθοξυίμινο πλευρική αλυσίδα της κεφοταξίμης απενεργοποιούσαν την CMY-30 με τη μικρότερη συγγένεια ενώ το ένζυμο αυτό

εμφάνισε τους υψηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης για αυτή την β-λακτάμη. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η κάρβοξυ-βενζύλ υποκατάσταση των χειρόμορφων βορονικών αναλόγων της κεφταζιδίμης προκαλούσε μικρότερη αύξηση της συγγένειας στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος γεγονός, που δηλώνει ότι οι αλληλεπιδράσεις του καρβοξυλίου της υποκατάστασης αυτής (ανάλογο με το C4 καρβοξύλιο του δακτυλίου διυδροθειαζίνης της κεφταζιδίμης στο στάδιο του ακύλ-ενζύμου) με κατάλοιπα του ενεργού κέντρου πιθανότα επηρεάζονταν αρνητικά από τις δύο υποκαταστάσεις.

Οι Val211Gly και Val211Ser υποκαταστάσεις επηρέαζαν και τις φυσικές ιδιότητες του ενζύμου προκαλώντας μείωση της θερμικής σταθερότητας. Βρέθηκε ότι η CMY-30 ήταν το λιγότερο σταθερό ένζυμο, ακολουθούσε η CMY-42 ενώ το ένζυμο με την μικρότερη καταλυτική ενεργότητα για τα οξυμίμο υποστρώματα ήταν το περισσότερο σταθερό. Οι διαφορές στις θερμοκρασίες τήξης διευρύνθηκαν ακόμα περισσότερο όταν τα ενεργά κέντρα των ενζύμων ήταν πλήρως κορεσμένα με οξυμίμο β-λακταμικά και βορονικά οξέα (εφόσον η σταθεροποίηση που προκαλούσαν αυτά ήταν χαμηλότερη στις ΕΦ CMY) γεγονός που θα μπορούσε να σημαίνει ότι, εκτός από τα ελεύθερα ένζυμα, και τα αντίστοιχα ομοιοπολικά σύμπλοκα ήταν λιγότερο σταθερά στην περίπτωση των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος. Η θερμική σταθερότητα μίας πρωτεΐνης σχετίζεται με την ευελιξία του πρωτεϊνικού σκελετού αυτής. Κατά συνέπεια οι παραπάνω παρατηρήσεις δηλώνουν ότι ο πρωτεϊνικός σκελετός των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος όταν αυτά ήταν σε ελεύθερη κατάσταση, ακυλιωμένα από οξυμίμο υποστρώματα ή συμπλοκοποιημένα με ανάλογα των καταστάσεων μετάπτωσης της απακυλίωσης ήταν περισσότερο ευέλικτος από αυτόν της CMY-2 στις αντίστοιχες ρίζες. Τα πειράματα θερμικής αποδιάταξης αποκάλυψαν επίσης ότι μια ογκώδης υποκατάσταση, όπως η κάρβοξυ-βενζύλ ομάδα των χειρόμορφων βορονικών οξέων, αντιστάθμιζε την σταθεροποιητική επίδραση των οξυμίμο R1 πλευρικών αλυσίδων και στα τρία CMY ένζυμα που μελετήθηκαν.

Τα δυναμικά και δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων CMY-30 και CMY-42 εμφάνισαν κάποια κοινά στοιχεία τα οποία μπορούν να σχετιστούν με τις παραπάνω βιοχημικές ιδιότητες. Αντικατάσταση της βαλίνης στη θέση 211 από γλυκίνη ή σερίνη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των θερμικών κινήσεων του πρωτεϊνικού σκελετού σε διάφορα σημεία της πρωτεΐνης συμπεριλαμβανομένης της θηλειάς Ω καθώς και της H7

α-έλικας όπου εντοπίζεται το αμινοξύ 211 και η Tyr221. Το παραπάνω ενδεχομένως ευθύνεται για τη μειωμένη σταθερότητα των ενζύμων αυτών καθώς έχει βρεθεί ότι η θηλειά Ω στις β-λακταμάσες σερίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ισορροπία και την κινητική των αντιδράσεων αναδίπλωσης-αποδιάταξης. Η δομική βάση του παραπάνω φαινομένου εντοπίζονταν στην δυνατότητα της Tyr221 να εκτελεί περισσότερες κινήσεις στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος. Οι κινήσεις του αμινοξέος αυτού στην CMY-2 περιορίζονταν από την ογκώδη πλευρική αλυσίδα της βαλίνης στη θέση 211 ενώ στην περίπτωση των ποικιλιών γλυκίνης ή σερίνης η μη ύπαρξη της πλευρικής αλυσίδας στην πρώτη περίπτωση και η μετατόπιση της πλευρικής αλυσίδας προς το Β3 β-φύλλο επέτρεπε τις κινήσεις του φαινολικού δακτυλίου της πλευρικής αλυσίδας της Tyr221. Στην περίπτωση της CMY-30 η αύξηση των θερμικών κινήσεων επιτεύχθηκε και από την δυνατότητα σχετικά μεγάλου αριθμού πιθανών διαμορφώσεων του πεπτιδικού δεσμού της γλυκίνης.

Η αποδέσμευση της Tyr221 μετέδωσε την αυξημένη κίνηση της επικράτειας δέσμευσης της R1 πλευρικής αλυσίδας των κεφαλοσπορινών στην επικράτεια δέσμευσης των R2 πλευρικών αλυσίδων (H10 έλικα/R2 θηλειά) μέσω της θηλειάς Q120 όπως αποκάλυψε η έντονη συζευγμένη κίνηση των παραπάνω δομών στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος. Η συζευγμένη κίνηση (θηλειάς Ω/H7 έλικας)-(θηλειάς Q120)-(H10 έλικας/R2 θηλειάς) είχε αρκετά κοινά χαρακτηριστικά στις διάφορες ρίζες CMY-30 και CMY-42. Οι μετατοπίσεις των παραπάνω δομών στα ακυλένζυμα της κεφταζιδίμης και στα σύμπλοκα με το χειρόμορφο βορονικό ανάλογο ήταν επίσης συζευγμένες με τις κινήσεις του εκάστοτε προσδέτη οι οποίες ήταν ιδιαίτερα έντονες στην περίπτωση των ενζύμων με αυξημένη υδρολυτική ικανότητα. Οι αυξημένες αυτές δονήσεις των οξυμίμο μορίων στις ΕΦ CMY προκαλούνταν σε μεγάλο βαθμό από την διάρρηξη της επιφάνειας Val211-Tyr221 και την διεύρυνση της R1 θέσης δέσμευσης αλλά και από την αυξημένη ευελιξία του ενεργού κέντρου και είχαν ως αποτέλεσμα i) την εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυλίων του δεσμευμένου β-λακταμικού με θετικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, ii) την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης διαμορφώσεων του ενεργού κέντρου του ακύλ-ενζύμου που βρίσκονταν δομικά πιο κοντά στην κατάσταση μετάπτωσης της απακυλίωσης και iii) τη διευκόλυνση της προσέγγισης μορίων νερού στη β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού. Το πρώτο

αποτέλεσμα των παραπάνω κινήσεων αποτυπώνονταν στη μειωμένη συγγένεια που παρατηρήθηκε για τα οξυμίμο υποστρώματα ενώ τα δύο τελευταία (τα οποία είναι ουσιαστικά ισοδύναμα) στην αυξημένη ταχύτητα υδρόλυσης του εστέρα β-λακταμικού-σερίνης 64 από τα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσε να προταθεί ότι οι δύο υποκαταστάσεις προκαλούν διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων μέσω αύξησης της ευελιξίας του μορίου η οποία επιτρέπει στο ενεργό κέντρο να αποκτά συχνά διαμορφώσεις που βρίσκονται κοντά στην κατάσταση μετάπτωσης του περιοριστικού σταδίου (*near attack conformations*) όταν αλληλεπιδρά με μόρια που διαθέτουν ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες όπως τα οξυμίμο β-λακταμικά. Υπάρχουν κινητικά δεδομένα που δηλώνουν ότι οι κεφαλοσπορινάσες λειτουργούν μέσω πολλών διαμορφώσεων η απόκτηση των οποίων διαμεσολαβείται από εσωτερικές πρωτεϊνικές κινήσεις. Το γεγονός ότι κατά την υδρόλυση των υποστρωμάτων που προτιμώνται από αυτές, ήτοι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς, λειτουργούν κοντά στο όριο της διάχυσης (k_{cat}/K_m 10^6 - 10^7 $M^{-1}\cdot s^{-1}$) παρουσιάζοντας πολύ υψηλές ταχύτητες ακυλίωσης (k_2) οι οποίες προσεγγίζουν την ταχύτητα διάστασης του συμπλόκου *Michaelis* (k_{-1}) (καθώς ισχύει ότι $K_s < K_m$ π.χ. για την CMY-2 είναι $K_i=2$ μM και $K_m=15$ μM) είναι ενδεικτικό δομικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κατάλυσης και προκαλούνται από συζευγμένη πρωτεϊνική κίνηση. Στο παραπάνω πιθανότατα ευθύνεται και η εξέλιξη των μορίων αυτών από πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (οι οποίες ακυλιώνονται αποδοτικά από τα β-λακταμικά αλλά τα ακύλ-ένζυμα που δημιουργούνται δεν υδρολύονται) σε β-λακταμάσες οι οποίες ακυλιώνονται επίσης αποδοτικά αλλά έχουν αποκτήσει τη δυνατότητα υδρόλυσης της ρίζας ακύλ-ενζύμου. Οι β-λακταμάσες τάξης C όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος εν αντιθέσει με τις υπόλοιπες β-λακταμάσες σερίνης έχουν συντηρήσει τον καταλυτικό μηχανισμό των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών από τις οποίες προέκυψαν. Έτσι, διατηρώντας την απόδοση του μηχανισμού αυτού κατά την αντίδραση ακυλίωσης από τις κεφαλοσπορίνες και αυξάνοντας την ευελιξία του μορίου τους ώστε να ελαχιστοποιηθεί η στερεοχημική παρεμπόδιση που αποτρέπει την κατάρρευση του ακύλ-ενζύμου απέκτησαν υδρολυτική ικανότητα έναντι αυτών των υποστρωμάτων. Στην περίπτωση των οξυμίμο κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς οι ογκώδεις αλυσίδες δεν επηρεάζουν την αντίδραση ακυλίωσης εφόσον τα αντίστοιχα

υποστρώματα δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια στις κεφαλοσπορινάσες και ακυλιώνουν αποδοτικά την καταλυτική σερίνη. Τα ακυλένζυμα όμως που δημιουργούνται υδρολύονται αργά λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης της αντίδρασης απακυλίωσης όπως αποκάλυψε μία σειρά μελετών δομής-λειτουργίας (βλ. γενικό μέρος). Συνεπώς μεταλλάξεις που αυξάνουν την ευελιξία του μορίου των β-λακταμασών τάξης C ενδεχομένως οδηγούν σε αύξηση της ταχύτητας απακυλίωσης. Αυξημένες δονήσεις, ευελιξία και συζευγμένες εσωτερικές κινήσεις έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση άλλων ενζύμων τα οποία λειτουργούν μέσω αντιδράσεων μεταφοράς πρωτονίων (όπως οι β-λακταμάσες σερίνης). (Hammes-Schiffer S., 2002; Hammes G. G., 2002; Hammes-Schiffer S. και Benkovic S. J., 2006; Hammes G. G., 2008)

Εκτός από τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μία σειρά από προηγούμενες μελέτες δομής-λειτουργίας σε κεφαλοσπορινάσες εκτεταμένου φάσματος παρείχαν σαφείς ενδείξεις ότι οι παρατηρούμενες βιοχημικές ιδιότητες οφείλονται στην αύξηση της ευελιξίας του πρωτεϊνικού σκελετού. Οι εργαστηριακοί μεταλλάκτες της AmpC του *E. coli* Tyr221Gly, Glu219Lys, εισδοχή AlaAlaAla στη θέση 210, Thr70Ile και Val298Glu προκαλούν αύξηση στην ταχύτητα υδρόλυσης της κεφοταξίμης με ταυτόχρονη αύξηση της σταθεράς K_m (η οποία όπως αναφέρθηκε οφείλεται κυρίως στην αύξηση της ταχύτητας απακυλίωσης) ενώ παράλληλα μειώνουν τη θερμική και θερμοδυναμική σταθερότητα του ενζύμου. Δομική ανάλυση των πέντε πρώτων μεταλλαγμένων ενζύμων με κρυσταλλογραφία έδειξε ότι αυτό προκαλείται μέσω αύξησης της ευελιξίας της θηλειάς Ω. Οι μεταλλάξεις Tyr221Gly, Glu219Lys και εισδοχή AlaAlaAla στη θέση 210 εντοπίζονται στη δομή αυτή ενώ η θρεονίνη 70 αλληλεπιδρά στο ένζυμο αγρίου τύπου μέσω του υδροξυλίου της πλευρικής της αλυσίδας με το καρβονύλιο του σκελετού της Glu219 και αντικατάσταση με ισολευκίνη είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της αλληλεπίδρασης αυτής και τη μείωση της σταθερότητας της περιοχής 193-221 (θηλειά Ω). Η μετάλλαξη Val298Glu, αν και απομακρυσμένη κατά 20 Å από το ενεργό κέντρο είχε ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της περιοχής 285-296 που αντιστοιχεί στην θέση δέσμευσης των R2 πλευρικών αλυσίδων των κεφαλοσπορινών. (Thomas V. L. και συν., 2010)

Η GC1 κεφαλοσπορινάση εκτεταμένου φάσματος παρουσιάζει επίσης υψηλή αστάθεια στην περιοχή της θηλειάς Ω όπου έχουν εισαχθεί τα τρία αμινοξέα.

Κρυσταλλογραφική ανάλυση του ενζύμου συμπλοκοποιημένου με φωσφορονικό ανάλογο της κεφοταξίμης όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος αποκάλυψε μετατόπιση της Tyr224 (αντίστοιχη της Tyr221) η οποία, όπως έδειξαν οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, συνέβαινε και στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος τύπου CMY. Ανάλυση γρήγορης κινητικής των σταδίων πριν την επίτευξη της κατάστασης ισορροπίας και των σταδίων κατά την υδρόλυση κεφοταξίμης από το πατρικό ένζυμο της GC1 (P99) έδειξε ότι η απελευθέρωση των προϊόντων της υδρόλυσης οδηγούσε σε μία διαμόρφωση η οποία έπρεπε να ισομερισθεί ώστε να ξεκινήσει νέος κύκλος αντίδρασης με το στάδιο ισομερισμού να είναι πολύ αργό. Αντίθετα, στην GC1 δεν παρατηρήθηκε αυτό το στάδιο γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην μεγαλύτερη ευελιξία του ενζύμου η οποία προκαλούσε μεγάλη αύξηση της ταχύτητας ισομερισμού με την διαμόρφωση παγίδευσης ουσιαστικά να μην υφίσταται. (Kumar S. και συν., 2004)

Αυξημένη ευελιξία παρατηρήθηκε και στην περιοχή που ακολουθούσε την R2 θέση δέσμευσης στο ένζυμο εκτεταμένου φάσματος CMY-10 όπως αποκάλυψε σχετική κρυσταλλογραφική ανάλυση (Kim J. Y. και συν., 2006). Οι παραπάνω παρατηρήσεις θα μπορούσαν να ερμηνευθούν ως απόρροια της τροποποιημένης δυναμικής του συστήματος (θηλειάς Ω/H7 έλικας)-(θηλειάς Q120)-(H10 έλικας/R2 θηλειάς) στα ένζυμα εκτεταμένου φάσματος σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Η θηλειά R2 στην CMY-2 εκτελεί κινήσεις όταν το ένζυμο είναι σε μη συμπλοκοποιημένη μορφή. Οι κινήσεις αυτές θα μπορούσαν να σχετιστούν με τον ισομερισμό που παρατηρήθηκε στην P99 (τα δύο ένζυμα μοιράζονται 76% ταύτιση πρωτοταγούς δομής). Η εξασθένιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυλίων της κεφαταξιδίμης και καταλοίπων αργινίνης του ενεργού κέντρου πιθανότατα δεν σχετίζεται άμεσα με την αυξημένη υδρόλυση αλλά αποτελεί δευτερογενές αποτέλεσμα της ευελιξίας του ενεργού κέντρου. Η αλληλεπίδραση της Arg204 με το καρβοξύλιο της R1 πλευρικής αλυσίδας ίσως να σχετίζεται με τις καταλυτικές ιδιότητες των κεφαλοσπορινασών καθώς αντικατάσταση του συντηρημένου αυτού καταλοίπου στην P99 με βαλίνη, φαινυλαλανίνη ή σερίνη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας έναντι της κεφαταξιδίμης (Zhang Z. και συν., 2001).

Αντικατάσταση της συντηρημένης βαλίνης στη θέση 211 της CMY-2 με αλανίνη βρέθηκε ότι επίσης προκαλεί αύξηση της ενεργότητας έναντι των οξυμίνω

κεφαλοσπορινών. Η μετάλλαξη επιλέχθηκε *in vivo* κατά τη διάρκεια θεραπείας με κεφταζιδίμη και αζτρεονάμη σε ασθενή με κυστική ίνωση που είχε υποβληθεί σε μεταμόσχευση πνεύμονα. Ο ασθενής ήταν αποικισμένος με *E. coli* που παρήγαγε τη CMY-2 ενώ κατά την διάρκεια της θεραπείας προέκυψαν στελέχη που έφεραν τη Leu293Ser υποκατάσταση στην R2 θηλειά (CMY-94) και κατά την συνέχιση της επιλέχθηκαν στελέχη που έφεραν την παραπάνω υποκατάσταση και επιπλέον τη Val211Ala (CMY-95). Η υποκατάσταση στη θέση 211 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της MIC της αζτρεονάμης πάνω από 5 φορές (48 µg/ml CMY-94; \geq 256 µg/ml CMY-95). (Cremet L. και συν., 2013) Αν και στην συγκεκριμένη εργασία τα δύο ένζυμα δεν συγκρίθηκαν σε αυστηρώς ισογονικές συνθήκες και δεν προσδιορίστηκε το υδρολυτικό τους προφίλ, τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα της παρούσας μελέτης. Αλανίνη αντί βαλίνης στη θέση 211 θα έχει επίσης ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της Tyr221 της οποίας οι κινήσεις θα περιορίζονται από λιγότερο ογκώδη πλευρική αλυσίδα τροποποιώντας πάλι τις δυναμικές κινήσεις του ενεργού κέντρου.

Η διεύρυνση φάσματος λοιπόν στις πλασμιδιακές κεφαλοσπορινάσες τύπου CMY-2 οι οποίες είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες είναι εφικτή μέσω σημειακών μεταλλάξεων. Εκτός από τις CMY-30, CMY42 και CMY-95 ένα άλλος μεταλλάκτης της θηλειάς Ω, η CMY-32 (Gly214Glu), βρέθηκε να έχει αυξημένη υδρολυτική ικανότητα έναντι της κεφοταξίμης (Endimiani A. και συν., 2010). Αρκετές από τις διάφορες ποικιλίες CMY-2 που έχουν βρεθεί ενδέχεται να χαρακτηρίζονται επίσης από αυξημένη υδρολυτική ικανότητα έναντι των οξυίμινω υποστρωμάτων. Αυτό όμως δεν μπορεί να τεκμηριωθεί παρά μόνο με ισογονική έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων καθώς και με βιοχημικό χαρακτηρισμό του πατρικού και των μεταλλαγμένων ενζύμων. Η συχνότητα απομόνωσης των ποικιλιών CMY-2 με διαπιστωμένες ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος είναι περιορισμένη. Η CMY-30 έχει βρεθεί τουλάχιστον 2 φορές με την πρώτη να αφορά απομόνωση από κλινικό στέλεχος *E. coli* στη Νέα Ζηλανδία και τη δεύτερη από αντίστοιχο στέλεχος στην Ελβετία που συμπαρήγαγε την NDM-1 μέταλλο-β-λακταμάση (Pope C. E. και συν., 2009; Poirel L. και συν., 2011). Τρεις αναφορές για απομόνωση της CMY-42 υπάρχουν μέχρι τώρα. Αφορούν κλινικά στελέχη *E. coli* που βρέθηκαν στην Γερμανία (Hentschke M. και συν., 2011), τον Καναδά (επικοινωνία με τον Hentschke

M.) και την Κίνα με το τελευταίο στέλεχος, που ανήκε στον ST167, να παράγει ταυτόχρονα και την NDM-1 καρβαπενεμάση (Zhang X. και συν., 2013). Εν τούτοις η δυνατότητα της CMY-2 για διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων προς την υδρόλυση οξυίμινο β-λακταμικών μέσω σημειακών μεταλλάξεων είναι ιδιαίτερης κλινικής σημασίας καθώς το ένζυμο εμφανίζει αυξημένη διασπορά σε εντεροβακτηριακά στελέχη που μπορούν να προκαλέσουν χρόνιες λοιμώξεις σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις όπου απαιτούνται θεραπείες με τα παραπάνω αντιβιοτικά για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

B. Μηχανισμοί διεύρυνσης του φάσματος υποστρωμάτων στις τάξεις A β-λακταμάσες τύπου GES

Σύγκριση των φαινοτύπων ευαισθησίας στελεχών κατά την αναστολή τους από β-λακταμικά που παρήγαγαν τις φυσικές ποικιλίες των βΛτΑ τύπου GES και των κινητικών σταθερών υδρόλυσης αποκάλυψε κάποια μοτίβα ως προς τις αλληλεπιδράσεις με τα παραπάνω αντιβιοτικά τα οποία είναι ενδεικτικά του ρόλου των φυσικών μεταλλάξεων στις θέσεις 104 και 170. Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι:

- i) Η αντικατάσταση της Gly170 με Asn (GES-2 και GES-13) είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της καταλυτικής απόδοσης έναντι της βενζυλπενικιλίνης και της κεφαλοθίνης, τα οποία θεωρούνται "καλά" υποστρώματα για τις βΛτΑ. Οι περισσότερες β-λακταμάσες τάξης A στην συγκεκριμένη θέση φέρουν ασπαραγίνη η οποία συμμετέχει έμμεσα στον καταλυτικό μηχανισμό σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με το μόριο νερού w1 που δεσμεύεται στο Glu166 και έχει ρόλο τόσο στην ακυλίωση (ενεργοποιώντας την πυρηνόφιλη ομάδα της καταλυτικής σερίνης, βλ. γενικό μέρος) όσο και στην απακυλίωση αποτελώντας το υδρολυτικό νερό. Φαίνεται λοιπόν ότι η ύπαρξη της παραπάνω πλευρικής αλυσίδας στη θέση 170 στα ένζυμα τύπου GES δεν προάγει την αντίδραση ακυλίωσης ή/και απακυλίωσης της καταλυτικής σερίνης κατά την αλληλεπίδραση με πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς.
- ii) Σερίνη στη θέση 170 αντί γλυκίνης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδρολυτικής ικανότητας έναντι της κεφαμυκίνης κεφοξιτίνης από τα ένζυμα GES-5 και GES-6. Το β-λακταμικό αυτό διαθέτει μία 7α-μέθοξυ υποκατάσταση η

οποία δεν επιτρέπει στο υδρολυτικό νερό να προσεγγίσει τον εστερικό δεσμό ώστε να καταρρεύσει το ακυλένζυμο που δημιουργεί σχετικά αποδοτικά με τις βΛτΑ όπως έχει βρεθεί από κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου κεφοξιτίνης της CTX-M-9 (Chen Y. και συν., 2005).

- iii) Ασπαραγίνη ή σερίνη στη θέση 170 είχε επίσης ως αποτέλεσμα της αύξηση της καταλυτικής απόδοσης απενεργοποίησης της ιμιπενέμης η οποία στα ένζυμα με γλυκίνη στην αντίστοιχη θέση ήταν πολύ χαμηλή. Υψηλή ενεργότητα καρβαπενεμάσης ανιχνεύθηκε στην GES-5 και ακολουθούσαν η GES-6 και GES-2 με την GES-13 να παρουσιάζει ανάλογη υδρόλυση με την GES-1. Μέτρηση των μικροσκοπικών κινητικών σταθερών των επιμέρους σταδίων της κατάλυσης υδρόλυσης της ιμιπενέμης από τις GES-1, GES-2 και GES-5 από άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι το περιοριστικό στάδιο της αντίδρασης για την ποικιλία Gly170 ήταν η ακυλίωση, εν αντιθέσει με τις υπόλοιπες βΛτΑ που δεν υδρολύουν καρβαπενέμες. Η αντικατάσταση του καταλοίπου με ασπαραγίνη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας ακυλίωσης με την GES-2 να παρουσιάζει αυξημένη k_2 κατά 3 φορές σε σχέση με την GES-1. Αντικατάσταση με σερίνη επιδρούσε και στα δύο καταλυτικά στάδια προκαλώντας αύξηση των σταθερών ταχύτητας ακυλίωσης και απακυλίωσης στην GES-5 κατά 5000 και 15 φορές αντίστοιχα με το στάδιο υδρόλυσης του ακυλενζύμου να περιορίζει τώρα την αντίδραση (Frase H. και συν., 2009). Η ιμιπενέμη, όπως και οι υπόλοιπες καρβαπενέμες, διαθέτουν μία ύδροξυ-αιθύλ υποκατάσταση στον άνθρακα 6 του β-λακταμικού δακτυλίου σε α θέση η οποία μπορεί να θεωρηθεί αντίστοιχη με την 7α υποκατάσταση της κεφοξιτίνης οπότε η Ser170 ενδεχομένως επηρεάζει την υδρόλυση των δύο παραπάνω αντιβιοτικών κατά έναν παρόμοιο μηχανισμό.
- iv) Αντίθετα οι Asn170 και Ser170 παρουσία γλουταμικού οξέος στη θέση 104 προκαλούσαν σημαντική μείωση στην ταχύτητα υδρόλυσης των οξυμίμο κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς και ιδιαίτερα της κεφταζιδίμης. Η GES-2 διατηρούσε αυξημένη καταλυτική απόδοση κατά την υδρόλυση κεφοταξίμης.
- v) Αντικατάσταση του αρνητικού αμινοξέος στη θέση 104 με λυσίνη η οποία διαθέτει θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του χαρακτήρα καρβαπενεμάσης των αντίστοιχων ποικιλιών GES. Σύγκριση των

κινητικών σταθερών υδρόλυσης μεταξύ των GES-5 και GES-6 και μεταξύ των GES-2 και GES-13 έδειξε ότι η ελάττωση αυτή προκαλούνταν από μείωση της k_{cat} και αύξηση της K_m , οι οποίες πιθανότατα αντανακλούν μειωμένη απόδοση ακυλίωσης.

- vi) Η Glu104Lys υποκατάσταση σε όλες τις ποικιλίες GES που εξετάστηκαν προκαλούσε αύξηση της υδρόλυσης κεφταζιδίμης. Την υψηλότερη ενεργότητα κεφταζιδιμάσης εμφάνισε η GES-7 (Lys104, Gly170). Αν και η ελάττωση της K_m που παρατηρήθηκε στο ένζυμο GES-7 συγκρινόμενο με την GES-1 πιθανώς οφείλεται στη βελτίωση της συγγένειας, η σημαντική αύξηση της k_{cat} που σημειώθηκε λόγω της υποκατάστασης στις περιπτώσεις που η θέση 170 καταλαμβάνονταν από ασπαραγίνη ή σερίνη υποδεικνύει ότι επηρεάζονται τόσο οι ταχύτητες ακυλίωσης όσο και απακυλίωσης. Οι GES-7 και GES-13 ήταν επίσης περισσότερο ενεργές και κατά την υδρόλυση αζτρεονάμης η οποία διαθέτει την ίδια οξυμίμο πλευρική αλυσίδα με την κεφταζιδίμη.

Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την άποψη ότι οι υποκαταστάσεις στις θέσεις 104 και 170 που απαντούν σε φυσικά ένζυμα τύπου GES επάγουν σύνθετες αλλαγές στις βιοχημικές ιδιότητες των ενζύμων. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποκάλυψαν πιθανές δομικές αιτίες των παρατηρούμενων καταλυτικών ιδιοτήτων. Τα ένζυμα GES έχουν ιδιαίτερα ευέλικτο σκελετό ο οποίος στις GES-1 και GES-13 παρουσίασε τον υψηλότερο βαθμό θερμικών κινήσεων. Η υψηλή αυτή ευελιξία των GES πιθανότατα σχετίζεται με τον χαρακτήρα εκτεταμένου φάσματος ο οποίος αντανακλάται στην ικανότητα υδρόλυσης κεφοταξίμης από όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν. Ο χαρακτήρας εκτεταμένου φάσματος οφείλεται πιθανότατα και σε κάποιες αμινοξικές θέσεις οι οποίες μεταλλασσόμενες στις TEM-1/TEM-2 και SHV-1 πενικιλινάσες επάγουν την υδρόλυση οξυμίμο υποστρωμάτων. Έτσι τα ένζυμα GES στη θέση 237 φέρουν αμινοξύ με υδροξυλιωμένη πλευρική αλυσίδα (Thr) που θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με την ακυλομάδα των οξυμίμο πλευρικών αλυσίδων εν αντιθέσει με τις πενικιλινάσες οι οποίες στην αντίστοιχη θέση φέρουν αλανίνη. Επίσης οι θέσεις Ambler 238 και 240 των ενζύμων GES δεν φέρουν γλυκίνη και ασπαρτικό αλλά κυστεΐνη (η οποία γεφυροποιείται με την Cys69) και αλανίνη αντίστοιχα. Η απουσία αρνητικής

πλευρικής αλυσίδας στην θέση 240 πιθανώς να σχετίζεται με τη δυνατότητα ακυλίωσης και υδρόλυσης από κάποια οξυίμινο υποστρώματα καθώς όπως αναφέρθηκε αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος στη θέση 240 στις πενικιλινάσες επάγει την διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων.

Εν τούτοις η θέση 104 σε κάποια ένζυμα GES ενδέχεται να καταλαμβάνεται από αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο όπως και στις πενικιλινάσες. Η αντικατάσταση του αμινοξέος 104 με λυσίνη, σε αναλογία με αντίστοιχες μεταλλάξεις των TEM, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη υδρόλυση κεφταζιδίμης, αζτρεονάμης και σε μικρότερο συγκριτικά βαθμό της κεφοταξίμης. Προσομοίωση του συμπλόκου των ποικιλιών GES Glu104 και Lys104 με το μη-χειρόμορφο βορονικό ανάλογο της κεφταζιδίμης έδειξε ότι το θετικό αμινοξύ στην θέση αυτή μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα αρνητικά φορτία των οξυίμινο πλευρικών αλυσίδων αυξάνοντας την συγγένεια του ενεργού κέντρου ως προς τα υποστρώματα που φέρουν τις αντίστοιχες δομές. Η Glu104Lys υποκατάσταση πέρα από το στάδιο της δέσμευσης ενδέχεται να επηρεάζει και τα καταλυτικά στάδια που ακολουθούν σύμφωνα με ενδείξεις που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις MD των ελεύθερων ενζύμων.

Η ισχύς και η σταθερότητα του δικτύου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων επηρεάζονταν σημαντικά από τις υποκαταστάσεις στη θέση 170 και σε μικρότερο βαθμό από τη φύση του αμινοξέος στην θέση 104. Ο βαθμός σταθεροποίησης ήταν ανάλογος με την απόδοση ακυλίωσης από την ιμιπενέμη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του καρβοξυλίου του γλουταμικού οξέος στην θέση 166 με την σερίνη 70 και μεταξύ της λυσίνης στη θέση 73 με τα καταλυτικά αμινοξέα Ser70 και Ser130 ήταν ιδιαίτερα ισχυρές στην περίπτωση που η θέση 170 καταλαμβάνονταν από σερίνη (GES-5 και GES-6) ενώ ύπαρξη καταλοίπου λυσίνης στην θέση 104 προκαλούσε σχετικά μικρού βαθμού εξασθένιση (GES-6). Η ασπαραγίνη επίσης προκαλούσε σταθεροποίηση μικρότερου όμως βαθμού. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στη δομή της καταλυτικής μηχανής στις διάφορες ποικιλίες GES ενδέχεται να επηρεάζουν το μηχανισμό της αντίδρασης και ιδιαίτερα του σταδίου της ακυλίωσης. Όπως αναφέρθηκε, η ακυλίωση της καταλυτικής σερίνης στις βΛτΑ μπορεί να γίνει μέσω δύο δρόμων. Ο πρώτος περιλαμβάνει την απόσπαση του υδρογόνου του πυρηνόφιλου υδροξυλίου από το φορτισμένο αρνητικά Glu166 μέσω ενός μορίου νερού (που έχει αντίστοιχη θέση με το

υδρολυτικό νερό στην α-θέση του εστερικού δεσμού του ακύλ-ενζύμου) με την λυσίνη 73 να είναι θετικά φορτισμένη και να μεταφέρει ένα πρωτόνιο στην σερίνη 130 η οποία πρωτονιώνει το άζωτο του β-λακταμικού κατά τη διάσπαση του αμιδικού δεσμού. Η λυσίνη 73 επαναπρωτονιώνεται από την πλευρική αλυσίδα του Glu166 η οποία έχει αποσπάσει ένα υδρογόνο από το καταλυτικό νερό. Στο δεύτερο δρόμο η λυσίνη 73 είναι ουδέτερη και ενεργοποιεί την καταλυτική σερίνη ενώ το πρωτόνιο που αποσπά το μεταφέρει πάλι στην Ser130 η οποία όπως και παραπάνω αποδίδει το δικό της στο άζωτο της αποχωρούσας ομάδας. Η λυσίνη 73 στο ακυλένζυμο που δημιουργείται κατά τον δεύτερο δρόμο επαναπρωτονιώνεται από το Glu166 το οποίο πριν την ακυλίωση είναι ουδέτερο.

Κατά τις προσομοιώσεις των ελεύθερων ενζύμων GES θεωρήθηκε περισσότερο πιθανός ο πρώτος δρόμος και χρησιμοποιήθηκαν οι φορτισμένες μορφές των καταλοίπων Glu166 και Lys73. Οι αποστάσεις μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων στα ένζυμα με σερίνη στην θέση 170 δηλώνουν ότι η μεταφορά πρωτονίου στην σερίνη 130 από την λυσίνη 73 για την πρωτονίωση του αζώτου κατά την κατάρρευση της ρίζας οξυανιόντος της ακυλίωσης θα γίνεται περισσότερο αποδοτικά εφόσον η αλληλεπίδραση των δύο αμινοξέων είναι περισσότερο ισχυρή από ότι στα υπόλοιπα ένζυμα. Επίσης, φαίνεται ότι στα ένζυμα αυτά ο δεύτερος δρόμος ακυλίωσης θα μπορούσε να είναι επίσης εφικτός καθώς η αλληλεπίδραση μεταξύ Lys73 και Ser70 είναι περισσότερο ισχυρή από ότι στα υπόλοιπα ένζυμα αλλά για να υποστηριχθεί αυτό με μεγαλύτερη ασφάλεια απαιτούνται προσομοιώσεις όπου τα Glu166 και Lys73 θα είναι ουδέτερα. Τέλος, η απόσπαση του πρωτονίου της Ser70 από το Glu166 φαίνεται ότι επίσης συμβαίνει με διαφορετικό τρόπο στα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 από ότι στις υπόλοιπες ποικιλίες GES. Στις προσομοιώσεις των GES-5 και GES-6 το καρβοξύλιο του Glu166 αλληλεπιδρούσε απευθείας με την Ser70 χωρίς να παρεμβάλλεται κάποιο μόριο νερού όπως προϋποθέτει ο πρώτος μηχανισμός ακυλίωσης. Στις υπόλοιπες GES υπήρχαν μικρά χρονικά διαστήματα όπου ένα μόριο νερού παρεμβάλλονταν μεταξύ Ser70 και Glu166 αλλά και σε αυτές για μεγάλα διαστήματα των προσομοιώσεων τα δύο αμινοξέα αλληλεπιδρούσαν απευθείας. Αυτό δεν ίσχυε για την GES-1 η οποία εμφάνιζε τη μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των δύο αλληλεπιδρώντων ομάδων. Φαίνεται λοιπόν ότι στο ενεργό κέντρο των ενζύμων GES το φορτισμένο γλουταμικό οξύ στην θέση 166 μπορεί να δράσει και

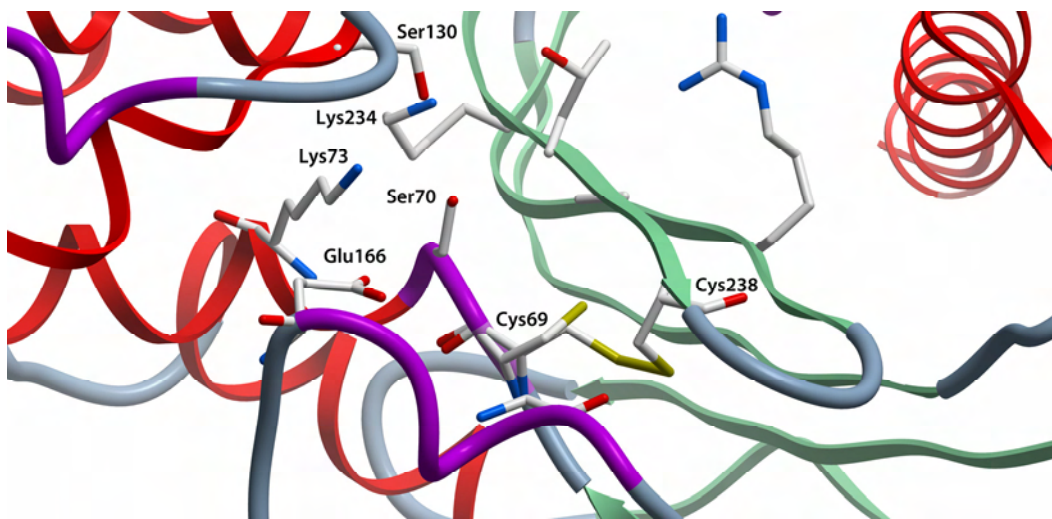
απευθείας ως βάση αποσπώντας το πρωτόνιο από το καρβοξύλιο της σερίνης 70. Στα ένζυμα με Ser170 η αλληλεπίδραση αυτή είναι ισχυρή και ακολουθούν τα ένζυμα με Asn170 και Gly170.

Όπως αναφέρθηκε η ισχυροποίηση των αλληλεπιδράσεων της καταλυτικής μηχανής επιτυγχάνεται μέσω των δεσμών υδρογόνου που μπορεί να σχηματίσει η σερίνη ή η ασπαραγίνη στη θέση 170 με το γλουταμικό οξύ 166. Την χρονική περίοδο που έλαβε χώρα η παρούσα μελέτη δεν είχαν λυθεί κρυσταλλογραφικές δομές ενζύμων GES με ασπαραγίνη ή σερίνη στη θέση 170. Στο διάστημα που ακολούθησε όμως τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής των αποενζύμων των έξι ποικιλιών GES, οι δομές των GES-2, GES-5 και GES-18 (Val80Ile, Ser170) αναλύθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και επιβεβαίωσαν σε μεγάλο βαθμό τα ευρήματα της παρούσας μελέτης (Fraser H. και συν., 2011; Smith C. A. και συν., 2012; Bebrone C. και συν., 2013). Έτσι λοιπόν βρέθηκε ότι όντως ασπαραγίνη ή σερίνη στην θέση 170 αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου με το Glu166. Στα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 το Glu166 πλησίαζε αρκετά την καταλυτική Ser70 και μάλιστα στα αποένζυμα των GES-5 και GES-18 δεν ανιχνεύθηκε μόριο νερού με ανάλογη θέση με αυτή του υδρολυτικού (w1) που να αλληλεπιδρούσε με το γλουταμικό οξύ (πίνακας 1, το ίδιο έχει βρεθεί και για κάποιες δομές της SME-1 καρβαπενεμάσης; ; Smith C. A. και συν., 2012). Στο ακύλ-ένζυμο της GES-5 με την ιμιπενέμη το αντίστοιχο νερό ανιχνεύθηκε (Smith C. A. και συν., 2012). Έτσι φαίνεται ότι τουλάχιστον για τα ένζυμα με σερίνη στη θέση 170 σε περίπτωση φορτισμένου Glu166 η ενεργοποίηση της Ser70 κατά την ακυλίωση γίνεται απευθείας χωρίς τη μεσολάβηση μορίου νερού.

Πίνακας 1: Αποστάσεις μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων σε κρυσταλλογραφικές δομές αποενζύμων GES και αυτών της TEM-1, SME-1 KPC-2 σε Å. Δηλώνεται επίσης η παρουσία/απουσία του νερού w1.

Ένζυμο	PDB (αποένζυμο)	Glu166 ^{Oε1/Oε2} -Ser70 ^{Oγ}	Lys73 ^{Nζ} - Ser70 ^{Oγ}	Lys73 ^{Nζ} - Ser130 ^{Oγ}	w1 H ₂ O
GES-1 ^{G170}	2QPN	3,95	3,05	3,38	+
GES-2 ^{N170}	3NI9	4,38	2,75	3,27	+
GES-5 ^{S170}	4GNU	2,97	2,67	3,08	-
GES-18 ^{S170}	3V3S	3,06	2,59	3,22	-
TEM-1	1M40	4,45	2,77	3,18	+
KPC-2	3DW0	4,00	2,74	4,79	+

Αν και οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις που προέκυψαν από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενζύμων GES επιβεβαίωσαν τις αντίστοιχες μικροσκοπικές που εξήχθησαν από τις προσομοιώσεις της GES-5, στα αποένζυμα των GES-1 και GES-2 σημειώθηκαν κάποιες αποκλίσεις. Ενδεχομένως αύξηση του χρόνου της προσομοίωσης πάνω από 10 ns να αναπαρήγαγε με μεγαλύτερη ακρίβεια την συμπεριφορά των ενζύμων αυτών. Το παραπάνω βέβαια μπορεί να οφείλεται και σε διαφορετική κατάσταση πρωτονίωσης των αμινοξέων Glu166 και Lys73 στις GES-1 και GES-2 από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις. Όπως αναφέρθηκε τα δύο αμινοξέα στις διάφορες βΛτΑ μπορεί να είναι είτε φορτισμένα είτε ουδέτερα με τις pKa των ιονιζόμενων ομάδων τους να επηρεάζονται από το ηλεκτροστατικό μικροπεριβάλλον τους. Αν και η πιο πιθανή κατάσταση πρωτονίωσης των δύο καταλοίπων είναι αυτή κατά την οποία είναι φορτισμένα, δεν αποκλείεται σε ένα παρασκεύασμα συγκεκριμένων ενζύμων τάξης A να υπάρχει ένας αυξημένος αριθμός μορίων που τα Glu166 και Lys73 θα είναι ουδέτερα. Επίσης, όσον αφορά την GES-1, υπάρχει η πιθανότητα η γέφυρα θείου Cys69-S-S-Cys238 να μην υφίσταται στο σύνολο των μορίων. Στην κρυσταλλογραφική δομή της GES-1 (PDB ID: 2QPN) η ηλεκτρονική πυκνότητα που παρατηρήθηκε στην περιοχή της Cys69 και στις δύο υπομονάδες της ασύμμετρης μονάδας υποδείκνυε ότι η πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος αυτού είχε δύο διαμορφώσεις στο σύνολο των μορίων με τη μία να αντιστοιχεί σε γεφυροποίηση με την Cys238 και την άλλη όχι (Εικόνα 1). Πράγματι, στις προσομοιώσεις της GES-1 όπου επιλέχθηκε η γεφυροποιημένη διαμόρφωση παρατηρήθηκε υψηλή αστάθεια στην κυστεΐνη 69.

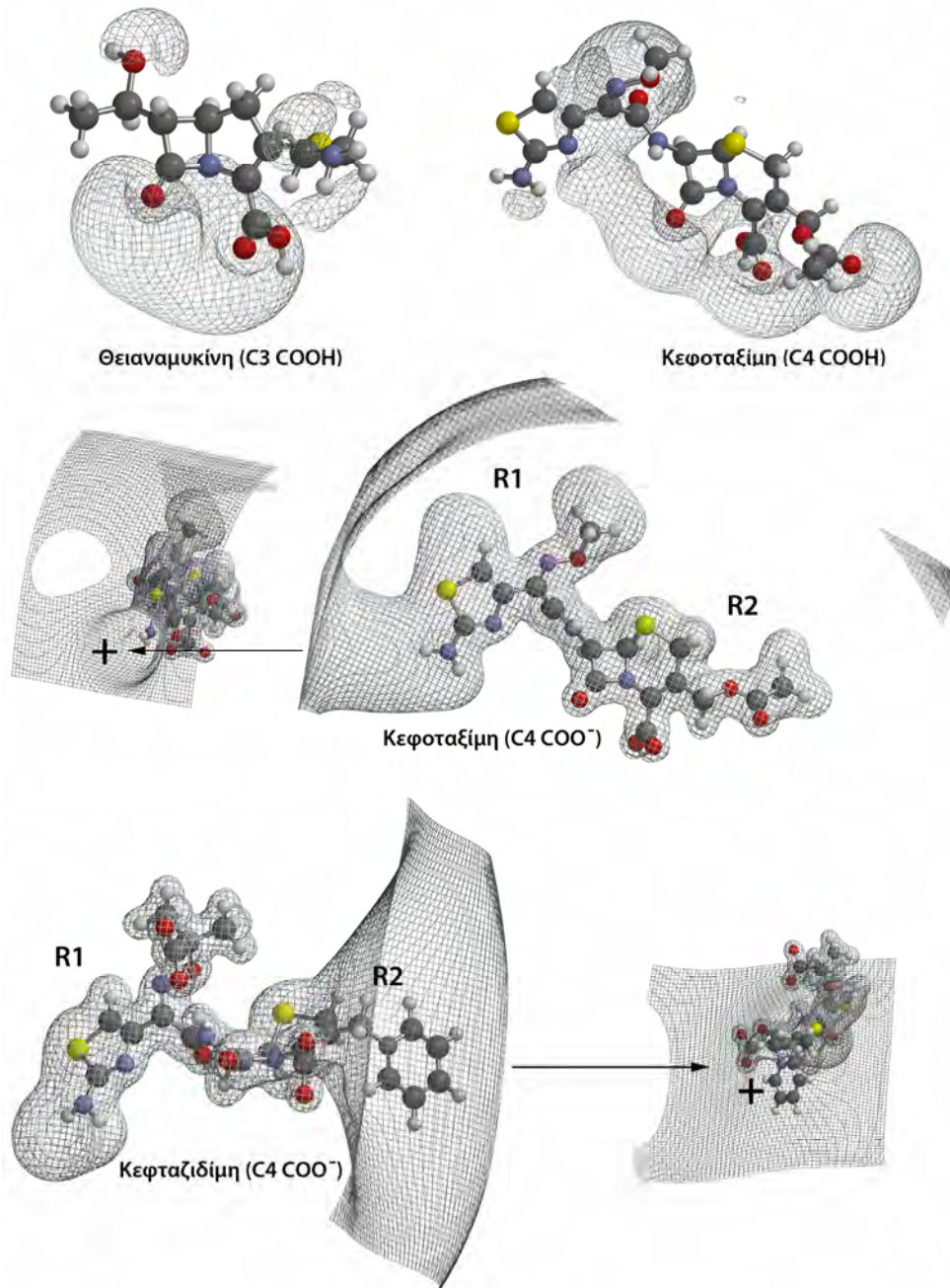


Εικόνα 1: Οι δύο διαμορφώσεις της Cys69 στην κρυσταλλογραφική δομή της GES-1 2QPN.

Η ισχύς των αλληλεπιδράσεων των καταλυτικών αμινοξέων όταν τα ένζυμα ήταν σε ελεύθερη κατάσταση επηρέαζε με διαφορετικό τρόπο την καταλυτική απόδοση κατά την υδρόλυση των διαφόρων κατηγοριών β-λακταμικών αντιβιοτικών. Η ακυλίωση από ιμιπενέμη ευνοούνταν από τις ισχυρές αλληλεπιδράσεις ενώ η υδρόλυση οξυμίμο υποστρωμάτων και ειδικά της κεφταζιδίμης επηρεαζόταν αρνητικά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα δεσμευμένα β-λακταμικά φέρουν επίσης φορτισμένες ομάδες οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα αμινοξέα της καταλυτικής μηχανής τροποποιώντας τις σχετικές pKa και οδηγώντας το ένζυμο σε διαφορετικά μονοπάτια μεταφοράς πρωτονίων τα οποία θα χαρακτηρίζονται από διαφορετικές αποδόσεις (Lamotte-Brasseur J. και συν., 1999). Στην Εικόνα 2 δίνεται η μορφή των ηλεκτρικών πεδίων της θειαναμυκίνης, της κεφοταξίμης και της κεφταζιδίμης, όπως υπολογίστηκαν με προσομοίωση QM στο HF/6-31G* επίπεδο της θεωρίας μοριακών τροχιακών, όπου απεικονίζεται σαφώς η διαφοροποίηση μεταξύ καρβαπενεμών και οξυμίμο μορίων αλλά και μεταξύ των δύο κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς.

Εκτός από τα δεσμευμένα β-λακταμικά και τη δυναμική του δικτύου αλληλεπιδράσεων των καταλυτικών αμινοξέων, επιπλέον αμινοξικές θέσεις ενδέχεται να επηρεάζουν την κατάσταση πρωτονίωσης της Glu166 και της Lys73. Η θέση 104 είναι μία από αυτές καθώς εντοπίζεται πάνω από τα δύο καταλυτικά αμινοξέα. Αντικατάσταση του αρνητικού αμινοξέος στην θέση αυτή με κάποιο θετικό, πιθανότατα θα τροποποιούσε το ηλεκτροστατικό μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου. Κατά τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ανιχνεύθηκε επίσης και μία άλλη επίδραση της υποκατάστασης Glu104Lys που θα μπορούσε να επηρεάσει την απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης. Η Trp105 μετατοπίζονταν προς την κοιλότητα του ενεργού κέντρου στα ένζυμα με λυσίνη στη θέση 104, τα οποία όπως αναφέρθηκε υδρόλυαν λιγότερο αποδοτικά την ιμιπενέμη. Η κίνηση αυτή θα μπορούσε να παρεμποδίζει τη δέσμευση των καρβαπενεμών ή την κατάσταση πρωτονίωσης της καταλυτικής μηχανής καθώς θα προκαλούσε αύξηση στην υδροφοβικότητα της κοιλότητας του ενεργού κέντρου. Οι βΛτΑ στη θέση αυτή φέρουν πάντα αμινοξύ με δακτυλίους το οποίο αλληλεπιδρά με αντίστοιχες ομάδες των δεσμευμένων β-λακταμικών. Τρυπτοφάνη στην θέση 105 φέρει και η KPC-2 και έχει

βρεθεί με πειράματα μεταλλαξογένεσης ότι επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τις καρβαπενέμες αλλά και με τους αναστολείς αυτοκτονίας.



Εικόνα 2: Διαφοροποίηση των καρβαπενεμών και οξυζιμινο κεφαλοσπορινών ως προς τα ηλεκτρικά πεδία που περιβάλλουν το μορίο τους. Η θειαναμυκίνη και η κεφοταξίμη προσομοιώθηκαν με το καρβοξύλιο των συστημάτων καρβαπενέμης και κέφεμης πρωτονιωμένο αντίστοιχα δηλαδή με τη μορφή που θα έχει στο σύμπλοκο *Michaelis* όπου θα έχει αποσπασθεί από το διάλυμα. Η κεφοταξίμη προσομοιώθηκε επίσης με το καρβοξύλιο της φορτισμένο, σε μορφή δηλαδή που θα έχει σε υδατικό διάλυμα πριν την αλληλεπίδραση με το ένζυμο, και παρατηρήθηκε έλλειμμα αρνητικού φορτίου στην αμινομάδα του δακτυλίου αμινοθειαζόλης της R1. Αντίθετα η κεφταζιδίμη ήταν ηλεκτραρνητική στο σημείο αυτό αλλά εμφάνιζε θετικό φορτίο στον δακτύλιο πυριδίνιου της R2 πλευρικής αλυσίδας.

Εκτός από τον ρόλο των μεταλλάξεων στη θέση 170 στην αντίδραση ακυλίωσης κατά την αλληλεπίδραση με καρβαπενέμες, η προσομοίωση του ακυλενζύμου της κεφοξιτίνης αποκάλυψε πιθανές επιδράσεις στο στάδιο της υδρόλυσης του ακυλενζύμου. Ο σταθερός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ της Ser170 και του Glu166 των GES-5 και GES-6 σχηματίζει μία επιφάνεια η οποία τοποθετεί την 7α μέθοξυ υποκατάσταση σε θέση όπου δεν εμποδίζει την προσέγγιση του υδρολυτικού νερού στην α -θέση του εστερικού δεσμού. Το παραπάνω ενδέχεται να έχει επίδραση και κατά την υδρόλυση των ακυλενζύμων της ιμιπενέμης η οποία διαθέτει ανάλογη ομάδα. Κρυσταλλογραφία των ακυλενζύμων της ιμιπενέμης με την GES-1 και την GES-5 που δημοσιεύθηκε πρόσφατα έδειξε ότι αυτή έχει ακριβώς την ίδια διαμόρφωση στα δύο ένζυμα, με το υδροξύλιο της 6α-ύδροξυ-αιθύλ υποκατάστασης να αλληλεπιδρά με την Asn132 και τη μεθυλομάδα να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του Glu166. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής των δύο παραπάνω ακυλενζύμων όπως και του ακυλενζύμου της TEM-1 με την ιμιπενέμη επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθώς ανίχνευσαν την ίδια επίδραση της επιφάνειας Ser170-Glu166 στην τοποθέτηση του υδρολυτικού νερού.

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι για τις βΛτΑ δεν μπορεί να προταθεί ένας κοινός μηχανισμός μέσω του οποίου διαμεσολαβείται η διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων. Η δυναμική του μορίου φαίνεται να διαδραματίζει και εδώ σημαντικό ρόλο τροποποιώντας τόσο τη δέσμευση των διαφόρων υποστρωμάτων όσο και τις αλληλεπιδράσεις των καταλυτικών αμινοξέων με πιθανές επιπτώσεις στο μονοπάτι μεταφοράς πρωτονίων που θα λειτουργήσει κάθε φορά. Αντίθετα με τις AmpC, τα ένζυμα τάξης A εξελίχθηκαν από τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες τροποποιώντας τον καταλυτικό μηχανισμό ώστε να είναι εφικτή η υδρόλυση των σταθερών ακυλενζύμων. Η τροποποίηση αυτή αφορά ένα αρνητικό αμινοξύ στη μη παρεμποδισμένη α -θέση του εστερικού δεσμού το οποίο λειτουργεί ως βάση για την ενεργοποίηση του υδρολυτικού νερού. Το καταλυτικό Glu166 όμως, πέρα από το πλεονέκτημα που προσέδωσε στην κατάρρευση του ακύλ-ενζύμου, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης ακυλίωσης καθώς προκαλεί αύξηση της pKa της Lys73 η οποία στις αντίστοιχες πενικιλινοδεσμευτικές είναι ουδέτερη και ενεργοποιεί την καταλυτική σερίνη. Η ακυλίωση στις βΛτΑ φαίνεται ότι επάγεται κυρίως από το Glu166 το οποίο

εμμέσως λειτουργεί ως βάση και ενεργοποιεί την καταλυτική σερίνη. Είναι πολύ πιθανό ότι τροποποιήσεις στο ηλεκτροστατικό μικροπεριβάλλον των δύο παραπάνω αμινοξέων θα έχουν ως αποτέλεσμα μικρές αλλαγές στην pKa της Lys73 ώστε ο "αρχαίος" δρόμος ακυλίωσης να επαναλειτουργεί για κάποια τουλάχιστον μόρια. Αυτό θα μπορούσε να μεταφράζεται σε αύξηση της απόδοσης ακυλίωσης για συγκεκριμένες ομάδες β-λακταμικών.

Ενδείξεις για τέτοιου είδους μεταβολές μέσω σημειακών μεταλλάξεων που προάγουν την ακυλίωση των GES από συγκεκριμένα β-λακταμικά προέκυψαν από τα αποτελέσματα της ισοηλεκτρικής εστίασης των ενζύμων με λυσίνη στη θέση 104. Το αμινοξύ αυτό από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (αλλά και από κρυσταλλογραφικές δομές TEM ΕΦΒΛ) δεν είναι καλυμμένο εντός κάποιας κοιλότητας του ενεργού κέντρου αλλά αλληλεπιδρά με το διάλυμα. Έτσι η κατάσταση πρωτονίωσης του είναι άμεση συνάρτηση του pH του διαλύματος. Τα ισοηλεκτρικά σημεία των GES-7, GES-13 και GES-6 που μετρήθηκαν πειραματικά παρουσίαζαν μία απόκλιση από τις θεωρητικές τιμές και ήταν αυξημένα κατά 0,56 μονάδες σε σχέση με αυτές. Αφαιρώντας ένα κατάλοιπο γλουταμικού οξέος από την αλληλουχία του κάθε ενζύμου και προσδιορίζοντας το θεωρητικό pI με το εργαλείο ProtParam του ExPaSy βρέθηκε ότι αυτό αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο που μετρήθηκε. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε λοιπόν να οφείλεται είτε στην απομάκρυνση ενός καταλοίπου Glu από το αμινοτελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης είτε στην πρωτονίωση κάποιου "θαμμένου" γλουταμικού οξέος. Οι ώριμες GES φέρουν γλουταμικό οξύ στη θέση 2 αλλά το γεγονός ότι τα ένζυμα με Glu104 δεν παρουσιάζουν απόκλιση από το θεωρητικό pI δηλώνει ότι το γλουταμικό οξύ του αμινοτελικού άκρου είναι παρόν στα ένζυμα που εκκρίνονται στον περιπλασματικό χώρο. Συνεπώς απομένει μόνο η πιθανότητα της πρωτονίωσης κάποιου "θαμμένου" Glu λόγω της υποκατάστασης Glu104Lys και σύμφωνα με τα παραπάνω αυτό πιθανότατα είναι το καταλυτικό Glu166.

Παρόμοιου βαθμού απόκλιση παρατηρήθηκε και στα ισοηλεκτρικά σημεία των εργαστηριακών μεταλλακτών της θέσης 104 ανεξάρτητα από το αν το αμινοξύ που αντικαθιστούσε το Glu ήταν θετικά φορτισμένο ή όχι. Έτσι λοιπόν φαίνεται ότι στα ένζυμα GES η ύπαρξη αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος στη θέση 104 προάγει την αποπρωτονιωμένη μορφή της Glu166 ενώ αντικατάστασή του με κάποιο από τα Lys,

Arg, Pro, Asn, Ala και Tyr έχει ως αποτέλεσμα την ουδετεροποίηση του καταλυτικού αυτού αμινοξέος με προφανείς επιδράσεις στην αντίδραση ακυλίωσης. Αντικατάσταση του Glu104 με κάποιο από τα παραπάνω αμινοξέα οδηγεί σε διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων προς οξυίμινο υποστρώματα και ιδιαίτερα της κεφταζιδίμης αλλά και προς κάρβοξυ-πενικιλίνες (τικαρκιλλίνη) με τα Arg, Pro, Asn και Ala να έχουν την εντονότερη επίδραση. Συνεπώς διεύρυνση του φάσματος με μεταλλάξεις της θέσης 104 δεν προκαλείται μόνο από θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Αρα ο μηχανισμός που διέπει τα παρατηρούμενα φαινόμενα δεν αφορά μόνο αύξηση της συγγένειας (η οποία επάγεται από την απομάκρυνση της αρνητικής πλευρικής αλυσίδας του Glu που παρεμποδίζει τη δέσμευση αρνητικά φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων) αλλά και γεγονότα που πιθανότατα σχετίζονται με την τροποποίηση των καταστάσεων πρωτονίωσης της καταλυτικής μηχανής. Μέτρηση των pKa των καταλυτικών αμινοξέων στους παραπάνω εργαστηριακούς μεταλλάκτες μέσω πειραματικών και θεωρητικών τεχνικών κατά την αλληλεπίδρασή τους με διάφορα β-λακταμικά θα αποκαλύψει τυχόν διαφοροποιήσεις που θα σχετίζονται με τις καταλυτικές τους ιδιότητες.

Γ. Επίλογος

Η λεπτομερής ανάλυση των βιοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών των ενζύμων τάξης C τύπου CMY-2 και τάξης A τύπου GES που παρουσιάζουν διευρυμένο φάσμα υποστρωμάτων ανέδειξε κάποιες πτυχές του μηχανισμού λειτουργίας τους. Τα δεδομένα έδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά φέρουν ήδη κάποια από τα χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να υδρολύουν τις διάφορες ομάδες β-λακταμικών και μέσω σημειακών μεταλλάξεων που τροποποιούν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες μπορούν να αποκτήσουν νέες βελτιωμένες καταλυτικές ικανότητες. Η "πληροφορία" για την υδρόλυση συγκεκριμένων β-λακταμικών μορίων είναι αποθηκευμένη στη δυναμική συμπεριφορά των ενζύμων και πειραματικές ή θεωρητικές τεχνικές οι οποίες επιτρέπουν την παρατήρηση των διαφόρων διαμορφώσεων που μπορούν να αποκτήσουν τα ένζυμα σε υδατικό διάλυμα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος θα αποκαλύψουν τον τρόπο με τον οποίο αυτά λειτουργούν. Σύμμαχος στην αποσαφήνιση της λειτουργίας των β-

λακταμασών είναι η φύση η οποία επιλέγει τις μεταλλάξεις εκείνες που είναι σημαντικές για τη διεύρυνση του φάσματος υπό συνθήκες έντονης πίεσης επιλογής. Η εξελικτική διαδικασία που επιλέγει νέες β-λακταμάσες είναι πολύ αποδοτική και η δράση των ενζύμων αυτών είναι δύσκολο να παρακαμφθεί με νέα β-λακταμικά που δεν υδρολύονται, ή να ανασταλεί με μόρια που παρεμβάλλονται στον καταλυτικό μηχανισμό. Έτσι αν και ο στόχος των μελετών δομής λειτουργίας των β-λακταμασών είναι η εύρεση μορίων με τα παραπάνω χαρακτηριστικά η δυνατότητα επιλογής μεταλλακτών ή νέου τύπου ενζύμων με βελτιωμένες ιδιότητες που θα υδρολύουν τα νέα β-λακταμικά ή δε θα απενεργοποιούνται από τους νέους αναστολείς "αυτοκτονίας" προεξοφλεί την αποτυχία σε κάποιο χρονικό διάστημα των αντίστοιχων θεραπειών. Τα βακτήρια εξάλλου βρίσκονται μερικές εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια πιο μπροστά από τον άνθρωπο όσον αφορά τη βιολογία των β-λακταμικών. Παρ'όλα αυτά η μελέτη των β-λακταμασών προσφέρει τη δυνατότητα της διατύπωσης ενός ενιαίου μηχανισμού που θα εξηγεί τη καταλυτική δράση των ενζύμων σε ατομικό επίπεδο καθώς αυτό αποτελεί αντικείμενο μελέτης και διχογνωμιών τα τελευταία 50 χρόνια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham EP (1979) Obituary: Sir Ernst Boris Chain. *The Journal of antibiotics* **32**: 1080-1081
- Abraham EP (1980) Ernst Chain and Paul Garrod. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **6**: 423-424
- Abraham EP (1987) Sir Robert Robinson and the early history of penicillin. *Natural product reports* **4**: 41-46
- Abraham E P, Chain . (1940) An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin *Nature* **146** (3713): 837
- Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA. (1941) Further observations on penicillin *The Lancet* **238** (6155): 177 - 189
- Abraham E P, Newton G G F, Schenck J R, Hargie M P, Olson B H, Schuurmans D M, Fisher M W, Fusari SA (1955) Identity of cephalosporin N and synnematin B. *Nature* **176**: 551
- Accogli M, Fortini D, Giufre M, Graziani C, Dolejska M, Carattoli A, Cerquetti M (2013) IncI1 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**: E238-240
- Aibinu I, Pfeifer Y, Peters F, Ogunsola F, Adenipekun E, Odugbemi T, Koenig W (2012) Emergence of bla(CTX-M-15), qnrB1 and aac(6')-Ib-cr resistance genes in *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cloacae* from Nigeria (sub-Saharan Africa). *Journal of medical microbiology* **61**: 165-167
- Alba J, Bauvois C, Ishii Y, Galleni M, Masuda K, Ishiguro M, Ito M, Frere JM, Yamaguchi K (2003) A detailed kinetic study of Mox-1, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *FEMS microbiology letters* **225**: 183-188
- Alksne LE, Rasmussen BA (1997) Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *Journal of bacteriology* **179**: 2006-2013
- Ambler RP (1975) The amino acid sequence of *Staphylococcus aureus* penicillinase. *The Biochemical journal* **151**: 197-218
- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG (1991) A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *The Biochemical journal* **276** (Pt 1): 269-270
- Antunes P, Coque TM, Peixe L (2010) Emergence of an IncIgamma plasmid encoding CMY-2 ss-lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing ss-lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug-resistant clone. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**: 2097-2100
- Aoki H, Sakai H, Kohsaka M, Konomi T, Hosoda J (1976) Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* **29**: 492-500
- Avila P, Grinstead J, de la Cruz F (1988) Analysis of the variable endpoints generated by one-ended transposition of Tn21. *Journal of bacteriology* **170**: 1350-1353
- Bae IK, Lee YN, Jeong SH, Hong SG, Lee JH, Lee SH, Kim HJ, Youn H (2007) Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **58**: 465-468
- Barber M, Waterworth PM (1964) Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. *British medical journal* **2**: 344-349

Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A (1998) Salmonella enteritidis: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from Morganella morganii. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 2352-2358

Barnaud G, Benzerara Y, Gravisse J, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Labia R, Arlet G (2004) Selection during cefepime treatment of a new cephalosporinase variant with extended-spectrum resistance to cefepime in an Enterobacter aerogenes clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 1040-1042

Barnaud G, Labia R, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Philippon A, Arlet G (2001) Extension of resistance to cefepime and ceftiofime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an Enterobacter cloacae clinical isolate. *FEMS microbiology letters* **195**: 185-190

Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews* **32**: 168-207

Barry AL, Thornsberry C, Jones RN, Gavan TL (1985) Aztreonam: antibacterial activity, beta-lactamase stability, and interpretive standards and quality control guidelines for disk-diffusion susceptibility tests. *Reviews of infectious diseases* **7 Suppl 4**: S594-604

Basker MJ, Boon RJ, Hunter PA (1980) Comparative antibacterial properties in vitro of seven olivanic acid derivatives: MM 4550, MM 13902, MM 17880, MM 22380, MM 22381, MM 22382 and MM 22383. *The Journal of antibiotics* **33**: 878-884

Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C (2009) Current status of newer carbapenems. *Current medicinal chemistry* **16**: 564-575

Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U (1999) A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a Klebsiella pneumoniae strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 1924-1931

Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H (1996) Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**: 221-224

Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Wilhelm R, Chong Y (1996) Comparative characterization of the cephamycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other beta-lactamase genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**: 1926-1930

Bauvois C, Ibuka AS, Celso A, Alba J, Ishii Y, Frere JM, Galleni M (2005) Kinetic properties of four plasmid-mediated AmpC beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 4240-4246

Bayes M, Rabasseda X, Prous JR (2007) Gateways to clinical trials. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* **29**: 697-735

Beadle BM, Shoichet BK (2002) Structural basis for imipenem inhibition of class C beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 3978-3980

Beadle BM, Trehan I, Focia PJ, Shoichet BK (2002) Structural milestones in the reaction pathway of an amide hydrolase: substrate, acyl, and product complexes of cephalothin with AmpC beta-lactamase. *Structure* **10**: 413-424

Bebrone C, Bogaerts P, Delbruck H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM (2013) GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**: 396-401

- Bebrone C, Bogaerts P, Delbruck H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM (2013) GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**: 396-401
- Becker O M, MacKerell Jr A D, Roux B, Watanabe M (Eds.). (2001). Computational biochemistry and biophysics. CRC Press.
- Bengtsson E, Strandell T, Svanbom M, Tunevall G (1972) Azidocillin treatment of enterococcal septicemia. *Scandinavian journal of infectious diseases* **4**: 143-148
- Bentzen AJ, Vejlsgaard R, Jacobsen J, Tybring L (1975) Clinical evaluation of a novel beta-lactam antibiotic: pivmecillinam (FL 1039). *Infection* **3**: 154-160
- Bethel CR, Hujer AM, Hujer KM, Thomson JM, Rusczycky MW, Anderson VE, Pusztai-Carey M, Taracila M, Helfand MS, Bonomo RA (2006) Role of Asp104 in the SHV beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 4124-4131
- Birnbaum J, Stapley EO, Miller AK, Wallick H, Hendlin D, Woodruff HB (1978) Cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin: a microbiological overview. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **4**: 15-32
- Bodin NO, Ekstrom B, Forsgren U, Jalar LP, Magni L, Ramsay CH, Sjoberg B (1975) Bacampicillin: a new orally well-absorbed derivative of ampicillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **8**: 518-525
- Bonner DP, Sykes RB (1984) Structure activity relationships among the monobactams. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **14**: 313-327
- Bonnet R (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 1-14
- Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J (2001) Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 2269-2275
- Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Sirot J (2003) Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **52**: 29-35
- Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, Labia R, Sirot J (2000) A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 3061-3068
- Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J (2000) A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 1936-1942
- Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P (2012) A novel and hybrid composite transposon at the origin of acquisition of bla(RTG-5) in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents* **40**: 257-259
- Bonomo RA, Dawes CG, Knox JR, Shlaes DM (1995) beta-Lactamase mutations far from the active site influence inhibitor binding. *Biochimica et biophysica acta* **1247**: 121-125
- Bonomo RA, Liu J, Chen Y, Ng L, Hujer AM, Anderson VE (2001) Inactivation of CMY-2 beta-lactamase by tazobactam: initial mass spectroscopic characterization. *Biochimica et biophysica acta* **1547**: 196-205

- Bonomo RA, Rice LB (1999) Inhibitor resistant class A beta-lactamases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **4**: e34-41
- Bosch F, Rosich L (2008) The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* **82**: 171-179
- Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreulx D (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS microbiology reviews* **32**: 208-233
- Bradford PA (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews* **14**: 933-951, table of contents
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**: 563-569
- Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G (1998) CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 1980-1984
- Bradley SG, Ritzi D (1968) Composition and ultrastructure of *Streptomyces venezuelae*. *Journal of bacteriology* **95**: 2358-2364
- Brogden RN, Carmine A, Heel RC, Morley PA, Speight TM, Avery GS (1981) Cefoperazone: A review of its in vitro antimicrobial activity, pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **22**: 423-460
- Brogden RN, Heel RC (1986) Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **31**: 96-130
- Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, Rolinson GN (1976) Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *The Journal of antibiotics* **29**: 668-669
- Brown RP, Aplin RT, Schofield CJ (1996) Inhibition of TEM-2 beta-lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid: observation of intermediates by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **35**: 12421-12432
- Bulychev A, Bellettini J, O'Brien M, Crocker P J, Samama J P, Miller M J, Mobashery S (2000) N-Sulfonyloxy- β -lactam inhibitors for β -lactamases. *Tetrahedron* **56**:5719-5728.
- Bulychev A, Massova I, Miyashita K, Mobashery S (1997) Nuances of mechanisms and their implications for evolution of the versatile β -lactamase activity: from biosynthetic enzymes to drug resistance factors. *Journal of the american chemical society*, **119**(33): 7619-7625.
- Bulychev A, Mobashery S (1999) Class C beta-lactamases operate at the diffusion limit for turnover of their preferred cephalosporin substrates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 1743-1746
- Burman LG, Park JT, Lindstrom EB, Boman HG (1973) Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. *Journal of bacteriology* **116**: 123-130
- Bush K (1988) Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical microbiology reviews* **1**: 109-123

- Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 969-976
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 1211-1233
- Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA, Lee VJ, Yang Y (1993) Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**: 851-858
- Buynak JD (2006) Understanding the longevity of the beta-lactam antibiotics and of antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations. *Biochemical pharmacology* **71**: 930-940
- Buynak JD, Chen H, Vogeti L, Gadhachanda VR, Buchanan CA, Palzkill T, Shaw RW, Spencer J, Walsh TR (2004) Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine-beta-lactamases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **14**: 1299-1304
- Buynak JD, Doppalapudi VR, Adam G (2000) The synthesis and evaluation of 3-substituted-7-(alkylidene)cephalosporin sulfones as beta-lactamase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **10**: 853-857
- Buynak JD, Rao AS, Doppalapudi VR, Adam G, Petersen PJ, Nidamarthy SD (1999) The synthesis and evaluation of 6-alkylidene-2'beta-substituted penam sulfones as beta-lactamase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **9**: 1997-2002
- Buynak JD, Vogeti L, Doppalapudi VR, Solomon GM, Chen H (2002) Cephalosporin-derived inhibitors of beta-lactamase. Part 4: The C3 substituent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **12**: 1663-1666
- Cabeen MT, Jacobs-Wagner C (2005) Bacterial cell shape. *Nature reviews Microbiology* **3**: 601-610
- Canica MM, Caroff N, Barthelemy M, Labia R, Krishnamoorthy R, Paul G, Dupret JM (1998) Phenotypic study of resistance of beta-lactamase-inhibitor-resistant TEM enzymes which differ by naturally occurring variations and by site-directed substitution at Asp276. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 1323-1328
- Canton R, Coque TM (2006) The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology* **9**: 466-475
- Canton R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG (2008) IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14 Suppl 1**: 53-62
- Carattoli A, Villa L, Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P (2012) Evolution of IncA/C blaCMY-(2)-carrying plasmids by acquisition of the blaNDM-(1) carbapenemase gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**: 783-786
- Caroff N, Espaze E, Berard I, Richet H, Reynaud A (1999) Mutations in the ampC promoter of Escherichia coli isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS microbiology letters* **173**: 459-465
- Carr PD, Ollis DL (2009) Alpha/beta hydrolase fold: an update. *Protein and peptide letters* **16**: 1137-1148
- Cassidy PJ, Albers-Schonberg G, Goegelman RT, Miller T, Arison B, Stapley EO, Birnbaum J (1981) Epithienamycins. II. Isolation and structure assignment. *The Journal of antibiotics* **34**: 637-648
- Chaibi EB, Peduzzi J, Farzaneh S, Barthelemy M, Sirot D, Labia R (1998) Clinical inhibitor-resistant mutants of the beta-lactamase TEM-1 at amino-acid position 69. Kinetic analysis and molecular modelling. *Biochimica et biophysica acta* **1382**: 38-4

- Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R (1999) Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **43**: 447-458
- Chain E, Florey H W, Gardner A D, Heatley N G, Jennings M A, Orr-Ewing J, and Sanders A G (1940) Penicillin as a chemotherapeutic agent *Lancet* **226**
- Chanal-Clariss C, Sirot D, Bret L, Chatron P, Labia R, Sirot J (1997) Novel extended-spectrum TEM-type beta-lactamase from an Escherichia coli isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalothin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**: 715-716
- Chang TW, Weinstein L (1963) In Vitro Biological Activity of Cephalothin. *Journal of bacteriology* **85**: 1022-1027
- Chen Y, Delmas J, Sirot J, Shoichet B, Bonnet R (2005) Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *Journal of molecular biology* **348**: 349-362
- Chen Y, McReynolds A, Shoichet BK (2009) Re-examining the role of Lys67 in class C beta-lactamase catalysis. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**: 662-669
- Chen Y, Minasov G, Roth TA, Prati F, Shoichet BK (2006) The deacylation mechanism of AmpC beta-lactamase at ultrahigh resolution. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 2970-2976
- Chen Y, Shoichet B, Bonnet R (2005) Structure, function, and inhibition along the reaction coordinate of CTX-M beta-lactamases. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 5423-5434
- Choury D, Szajnert MF, Joly-Guillou ML, Azibi K, Delpech M, Paul G (2000) Nucleotide sequence of the bla(RTG-2) (CARB-5) gene and phylogeny of a new group of carbenicillinases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 1070-1074
- Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, Ramphal R, Wagener MM, Miyashiro DK, Yu VL (1991) Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Annals of internal medicine* **115**: 585-590
- Christensen H, Martin MT, Waley SG (1990) Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *The Biochemical journal* **266**: 853-861
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S18.
- Comroe JH, Jr. (1978) Pay dirt: the story of streptomycin. Part I. From Waksman to Waksman. *The American review of respiratory disease* **117**: 773-781
- Copar A, Prevec T, Anzic B, Mesar T, Selic L, Vilar M, Solmajer T (2002) Design, synthesis and bioactivity evaluation of tribactam beta lactamase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **12**: 971-975
- Copeland R A (2000) Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, 2nd ed. Wiley-VCH, Inc., New York, NY
- Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A (2003) AmpC cephalosporinase hyperproduction in Acinetobacter baumannii clinical strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **52**: 629-635

- Crement L, Caroff N, Giraudeau C, Reynaud A, Caillon J, Corvec S (2013) Detection of clonally related *Escherichia coli* isolates producing different CMY beta-lactamases from a cystic fibrosis patient. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**: 1032-1035
- Cricco JA, Vila AJ (1999) Class B beta-lactamases: the importance of being metallic. *Current pharmaceutical design* **5**: 915-927
- Crichlow GV, Kuzin AP, Nukaga M, Mayama K, Sawai T, Knox JR (1999) Structure of the extended-spectrum class C beta-lactamase of *Enterobacter cloacae* GC1, a natural mutant with a tandem tripeptide insertion. *Biochemistry* **38**: 10256-10261
- Crowfoot D, Bunn C W, Rogers-Low B W, Turner-Jones A (1949) X-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin. In Clarke, H. T.; Johnson, J. R.; Robinson, R. (ed). *Chemistry of Penicillin*. Princeton University Press. pp. 310-367
- Curley K, Pratt RF (2000) The Oxyanion Hole in Serine beta-Lactamase Catalysis: Interactions of Thiono Substrates with the Active Site. *Bioorganic chemistry* **28**: 338-356
- Cuzon G, Naas T, Nordmann P (2011) Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 5370-5373
- D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V (2011) Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 2735-2742
- Datta N, Kontomichalou P (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* **208**: 239-241
- Dayan L, Ooi C (2005) Syphilis treatment: old and new. *Expert opinion on pharmacotherapy* **6**: 2271-2280
- De Meester F, Joris B, Reckinger G, Bellefroid-Bourguignon C, Frere JM, Waley SG (1987) Automated analysis of enzyme inactivation phenomena. Application to beta-lactamases and DD-peptidases. *Biochemical pharmacology* **36**: 2393-2403
- Decousser JW, Poirel L, Nordmann P (2001) Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 3595-3598
- Delbruck H, Bogaerts P, Kupper MB, Rezende de Castro R, Bennink S, Glupczynski Y, Galleni M, Hoffmann KM, Bebrone C (2012) Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**: 5618-5625
- Delmas J, Chen Y, Prati F, Robin F, Shoichet BK, Bonnet R (2008) Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of molecular biology* **375**: 192-201
- Delmas J, Leyssene D, Dubois D, Birck C, Vazeille E, Robin F, Bonnet R (2010) Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes. *Journal of molecular biology* **400**: 108-120
- Demain AL, Elander RP (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**: 5-19

- Diaz N, Suarez D, Sordo TL (2006) Molecular dynamics simulations of class C beta-lactamase from *Citrobacter freundii*: insights into the base catalyst for acylation. *Biochemistry* **45**: 439-451
- Domagk G (1935) Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Deutsch. Med. Wschr.*, **61**: 250
- Doi Y, Wachino J, Ishiguro M, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Shibayama K, Yokoyama K, Kato H, Yagi T, Arakawa Y (2004) Inhibitor-sensitive AmpC beta-lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 2652-2658
- Doublet B, Boyd D, Douard G, Praud K, Cloeckart A, Mulvey MR (2012) Complete nucleotide sequence of the multidrug resistance IncA/C plasmid pR55 from *Klebsiella pneumoniae* isolated in 1969. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **67**: 2354-2360
- Doucet N, De Wals PY, Pelletier JN (2004) Site-saturation mutagenesis of Tyr-105 reveals its importance in substrate stabilization and discrimination in TEM-1 beta-lactamase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 46295-46303
- Drawz SM, Bethel CR, Hujer KM, Hurlless KN, Distler AM, Caselli E, Prati F, Bonomo RA (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
- Drawz SM, Bonomo RA (2010) Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews* **23**: 160-201
- Drews G (1999) Ferdinand Cohn, among the Founder of Microbiology. *ASM News* **65** (8): 547
- Dubois V, Poirel L, Demarthe F, Arpin C, Coulange L, Minarini LA, Beziau MC, Nordmann P, Quentin C (2008) Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 3792-3794
- Dubus A, Ledent P, Lamotte-Brasseur J, Frere JM (1996) The roles of residues Tyr150, Glu272, and His314 in class C beta-lactamases. *Proteins* **25**: 473-485
- Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. (1982) Azlocillin, mezlocillin, and piperacillin: new broad-spectrum penicillins. *Annals of internal medicine* **97**: 755-760
- Endimiani A, Doi Y, Bethel CR, Taracila M, Adams-Haduch JM, O'Keefe A, Hujer AM, Paterson DL, Skalweit MJ, Page MG, Drawz SM, Bonomo RA (2010) Enhancing resistance to cephalosporins in class C beta-lactamases: impact of Gly214Glu in CMY-2. *Biochemistry* **49**: 1014-1023
- English AR, Retsema JA, Girard AE, Lynch JE, Barth WE (1978) CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **14**: 414-419
- Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A (2008) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology* **426**: 145-159
- Eykyn S, Jenkins C, King A, Phillips I (1976) Antibacterial activity of cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic, compared with that of cephaloridine, cephalothin, and cefamandole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **9**: 690-695
- Farmer TH, Page JW, Payne DJ, Knowles DJ (1994) Kinetic and physical studies of beta-lactamase inhibition by a novel penem, BRL 42715. *The Biochemical journal* **303** (Pt 3): 825-830

- Fenollar-Ferrer C, Frau J, Donoso J, Munoz F (2003) Role of beta-lactam carboxyl group on binding of penicillins and cephalosporins to class C beta-lactamases. *Proteins* **51**: 442-452
- Fernandez-Alarcon C, Singer RS, Johnson TJ (2011) Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PloS one* **6**: e23415
- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. Macmillan.
- Field M J (1999) A practical introduction to the simulation of molecular systems. Cambridge University Press.
- Fisher J, Belasco JG, Charnas RL, Khosla S, Knowles JR (1980) Beta-lactamase inactivation by mechanism-based reagents. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **289**: 309-319
- Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S (2005) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical reviews* **105**: 395-424
- Fisher JF, Mobashery S (2009) Three decades of the class A beta-lactamase acyl-enzyme. *Current protein & peptide science* **10**: 401-407
- Fleming A (1929) On the antibacterial action of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* **10**: 226-236
- Flores AR, Parsons LM, Pavelka MS, Jr. (2005) Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology* **151**: 521-532
- Florey HW (1949) [Chemotherapy in perspective; steps that led to the therapeutic application of microbial antagonism (transl.)]. *Gazeta medica portuguesa* **2**: 647-664
- Florey HW (1955) Antibiotic products of a versatile fungus. *Annals of internal medicine* **43**: 480-490
- Florey HW, Chain EB, Heatley NG, Jennings MA, Sanders AG, Abranam EP & Florey ME (1949) Antibiotics, vol. 2. Oxford University Press, London
- Fonseca F, Chudyk EI, van der Kamp MW, Correia A, Mulholland AJ, Spencer J (2012) The basis for carbapenem hydrolysis by class A beta-lactamases: a combined investigation using crystallography and simulations. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 18275-18285
- Fonseca F, Sarmiento AC, Henriques I, Samyn B, van Beeumen J, Domingues P, Domingues MR, Saavedra MJ, Correia A (2007) Biochemical Characterization of SFC-1, a class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 4512-4514
- Foord RD (1976) Cefuroxime: human pharmacokinetics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **9**: 741-747
- Fortineau N, Poirel L, Nordmann P (2001) Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **47**: 207-210
- Foster W, Raoult A (1974) Early descriptions of antibiosis. *The Journal of the Royal College of General Practitioners* **24**: 889-894

- Frase H, Shi Q, Testero SA, Mobashery S, Vakulenko SB (2009) Mechanistic basis for the emergence of catalytic competence against carbapenem antibiotics by the GES family of beta-lactamases. *The Journal of biological chemistry* **284**: 29509-29513
- Frase H, Smith CA, Toth M, Champion MM, Mobashery S, Vakulenko SB (2011) Identification of products of inhibition of GES-2 beta-lactamase by tazobactam by x-ray crystallography and spectrometry. *The Journal of biological chemistry* **286**: 14396-14409
- Frase H, Toth M, Champion MM, Antunes NT, Vakulenko SB (2011) Importance of position 170 in the inhibition of GES-type beta-lactamases by clavulanic acid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 1556-1562
- Frere JM (1995) Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular microbiology* **16**: 385-395
- Fuchs PC, Jones RN, Barry AL (1988) In vitro antimicrobial activity of tigemonam, a new orally administered monobactam. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **32**: 346-349
- Fujimoto S, Makinoda S, Tanaka T, Ichinohe K (1985) [Clinical review and antibacterial effect of aztreonam in infections in obstetrics and gynecology]. *The Japanese journal of antibiotics* **38**: 3513-3519
- Fukasawa M, Sumita Y, Harabe ET, Tanio T, Nouda H, Kohzuki T, Okuda T, Matsumura H, Sunagawa M (1992) Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **36**: 1577-1579
- Gaillot O, Clement C, Simonet M, Philippon A (1997) Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **39**: 85-87
- Gall YM, Konashev MB (2001) The discovery of Gramicidin S: the intellectual transformation of G.F. Gause from biologist to researcher of antibiotics and on its meaning for the fate of Russian genetics. *History and philosophy of the life sciences* **23**: 137-150
- Galleni M, Amicosante G, Frere JM (1988) A survey of the kinetic parameters of class C beta-lactamases. Cephalosporins and other beta-lactam compounds. *The Biochemical journal* **255**: 123-129
- Galleni M, Frere JM (1988) A survey of the kinetic parameters of class C beta-lactamases. Penicillins. *The Biochemical journal* **255**: 119-122
- Galleni M, Frere JM (2007) Kinetics of beta-lactamases and penicillin binding proteins, p. 195-213. In R. A. Bonomo and M. E. Tolmasky (ed.), *Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition*. ASM Press, Washington, DC.
- Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Raquet X, Dubus A, Monnaie D, Knox JR, Frere JM (1995) The enigmatic catalytic mechanism of active-site serine beta-lactamases. *Biochemical pharmacology* **49**: 1171-1178
- Garau G, Di Guilmi AM, Hall BG (2005) Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 2778-2784
- Garcia-Fernandez A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A (2010) An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 4178-4184
- Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A (2012) *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**: 2143-2145

Gatti-Lafranconi P, Natalello A, Rehm S, Doglia SM, Pleiss J, Lotti M (2010) Evolution of stability in a cold-active enzyme elicits specificity relaxation and highlights substrate-related effects on temperature adaptation. *Journal of molecular biology* **395**: 155-166

Gaucher B, Dantier C, Desarbre E, Page M G P (2007) Novel mono and bicyclic monobactams as potent inhibitors of class C beta-lactamases, abstr. F1-310. Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., Chicago, IL.

Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouveleki LS (1998) Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 1259-1262

Gherman BF, Goldberg SD, Cornish VW, Friesner RA (2004) Mixed quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) study of the deacylation reaction in a penicillin binding protein (PBP) versus in a class C beta-lactamase. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 7652-7664

Ghuysen JM (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual review of microbiology* **45**: 37-67

Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E (2000) IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 2247-2253

Giles WP, Benson AK, Olson ME, Hutkins RW, Whichard JM, Winokur PL, Fey PD (2004) DNA sequence analysis of regions surrounding bla_{CMY-2} from multiple *Salmonella* plasmid backbones. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 2845-2852

Goffin C, Ghuysen JM (2002) Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **66**: 702-738, table of contents

Golemi-Kotra D, Meroueh SO, Kim C, Vakulenko SB, Bulychev A, Stemmler AJ, Stemmler TL, Mobashery S (2004) The importance of a critical protonation state and the fate of the catalytic steps in class A beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* **279**: 34665-34673

Gonzalez Leiza M, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K, Baquero F (1994) Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new Amp^C-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**: 2150-2157

Gootz TD (2010) The global problem of antibiotic resistance. *Critical reviews in immunology* **30**: 79-93

Graham DW, Ashton WT, Barash L, Brown JE, Brown RD, Canning LF, Chen A, Springer JP, Rogers EF (1987) Inhibition of the mammalian beta-lactamase renal dipeptidase (dehydropeptidase-I) by (Z)-2-(acylamino)-3-substituted-propenoic acids. *Journal of medicinal chemistry* **30**: 1074-1090

Greenwood D, Pearson NJ, O'Grady F (1976) Cefuroxime: a new cephalosporin antibiotic with enhanced stability to enterobacterial beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2**: 337-343

Guo YF, Zhang WH, Ren SQ, Yang L, Lu DH, Zeng ZL, Liu YH, Jiang HX (2014) IncA/C Plasmid-Mediated Spread of CMY-2 in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* from Food Animals in China. *PloS one* **9**: e96738

- Gutmann L, Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein F, Tran Van Nhieu G, Lu T, Carlet J, Collatz E, Williamson R (1988) Plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. *Reviews of infectious diseases* **10**: 860-866
- Guttmann P and Ehrlich P (1891) "Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria" (On the effect of methylene blue on malaria), *Berliner Klinische Wochenschrift*, **28**: 953-956
- Hale CW, Newton GG, Abraham EP (1961) Derivatives of cephalosporin C formed with certain heterocyclic tertiary bases. The cephalosporin C-A family. *The Biochemical journal* **79**: 403-408
- Hall BG, Barlow M (2004) Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **7**: 111-123
- Hall BG, Barlow M (2005) Revised Ambler classification of beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **55**: 1050-1051
- Hall BG, Salipante SJ, Barlow M (2004) Independent origins of subgroup B1 + B2 and subgroup B3 metallo-beta-lactamases. *Journal of molecular evolution* **59**: 133-141
- Hall RM, Collis CM (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular microbiology* **15**: 593-600
- Hammes GG (2002) Multiple conformational changes in enzyme catalysis. *Biochemistry* **41**: 8221-8228
- Hammes GG (2008) How do enzymes really work? *The Journal of biological chemistry* **283**: 22337-22346
- Hammes-Schiffer S (2002) Impact of enzyme motion on activity. *Biochemistry* **41**: 13335-13343
- Hammes-Schiffer S, Benkovic SJ (2006) Relating protein motion to catalysis. *Annual review of biochemistry* **75**: 519-541
- Hammond GS (1955) A correlation of reaction rates. *Journal of the American Chemical Society* **77**(2): 334-338.
- Hammond SM, Lambert PA, Rycroft AN (1984) The bacterial cell surface Croom Helm Ltd, p. 23-27
- Hancock RE, Bellido F (1992) Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **29 Suppl A**: 1-6
- Hanson ND, Sanders CC (1999) Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Current pharmaceutical design* **5**: 881-894
- Hara K, Matsumoto F (1987) [New antimicrobial agent series XXVIII: cefuzonam]. *The Japanese journal of antibiotics* **40**: 1953-1963
- Hardy LW, Kirsch JF (1984) Diffusion-limited component of reactions catalyzed by *Bacillus cereus* beta-lactamase I. *Biochemistry* **23**: 1275-1282
- Hashimoto M, Komori T, Kamiya T (1976) Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic II. Structure determination of nocardicins A and B. *The Journal of antibiotics* **29**: 890-901
- Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsuhashi M (1984) Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *The Journal of antibiotics* **37**: 394-400

- Hata M, Fujii Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Ishii M, Neya S, Tsuda M, Hoshino T (2006) Substrate deacylation mechanisms of serine-beta-lactamases. *Biological & pharmaceutical bulletin* **29**: 2151-2159
- Hebeisen P, Heinze-Krauss I, Angehrn P, Hohl P, Page MG, Then RL (2001) In vitro and in vivo properties of Ro 63-9141, a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 825-836
- Heffron F, Sublett R, Hedges RW, Jacob A, Falkow S (1975) Origin of the TEM-beta-lactamase gene found on plasmids. *Journal of bacteriology* **122**: 250-256
- Heinze-Krauss I, Angehrn P, Charnas RL, Gubernator K, Gutknecht EM, Hubschwerlen C, Kania M, Oefner C, Page MG, Sogabe S, Specklin JL, Winkler F (1998) Structure-based design of beta-lactamase inhibitors. 1. Synthesis and evaluation of bridged monobactams. *Journal of medicinal chemistry* **41**: 3961-3971
- Helfand MS, Bethel CR, Hujer AM, Hujer KM, Anderson VE, Bonomo RA (2003) Understanding resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in the SHV beta-lactamase: lessons from the mutagenesis of SER-130. *The Journal of biological chemistry* **278**: 52724-52729
- Henderson TA, Young KD, Denome SA, Elf PK (1997) AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **179**: 6112-6121
- Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A (2004) Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 2321-2324
- Hentschke M, Kotsakis SD, Wolters M, Heisig P, Miriagou V, Aepfelbacher M (2011) CMY-42, a novel plasmid-mediated CMY-2 variant AmpC beta-lactamase. *Microbial drug resistance* **17**: 165-169
- Hermann JC, Ridder L, Holtje HD, Mulholland AJ (2006) Molecular mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modelling of deacylation in a class A beta-lactamase. *Organic & biomolecular chemistry* **4**: 206-210
- Herzberg O, Kapadia G, Blanco B, Smith TS, Coulson A (1991) Structural basis for the inactivation of the P54 mutant of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1. *Biochemistry* **30**: 9503-9509
- Hidri N, Barnaud G, Decre D, Cerceau C, Lalande V, Petit JC, Labia R, Arlet G (2005) Resistance to ceftazidime is associated with a S220Y substitution in the omega loop of the AmpC beta-lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **55**: 496-499
- Hikida M, Kawashima K, Yoshida M, Mitsuhashi S (1992) Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase-I from porcine and human renal cortex. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **30**: 129-134
- Hill SL, Bilton D, Johnson MM, Pye A, Mitchell JL, Stockley RA (1994) Sputum and serum pharmacokinetics of loracarbef (LY163892) in patients with chronic bronchial sepsis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **33**: 129-136
- Hirakawa H, Nishino K, Yamada J, Hirata T, Yamaguchi A (2003) Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **52**: 576-582
- Hokenson MJ, Cope GA, Lewis ER, Oberg KA, Fink AL (2000) Enzyme-induced strain/distortion in the ground-state ES complex in beta-lactamase catalysis revealed by FTIR. *Biochemistry* **39**: 6538-6545

- Holmquist M (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Current protein & peptide science* **1**: 209-235
- Holtje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**: 181-203
- Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, Kato N (1993) Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**: 984-990
- Hossain A, Reisbig MD, Hanson ND (2004) Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC overexpression in a clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53**: 964-970
- Hou JP, Poole JW (1971) Beta-lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *Journal of pharmaceutical sciences* **60**: 503-532
- Howard-Jones N (1984) Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary. *Br Med J (Clin Res Ed)* **288**: 379-381
- Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, Chen WL, Zhang R, Chen GX (2013) Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Applied and environmental microbiology* **79**: 5988-5996
- Huang W, Palzkill T (1997) A natural polymorphism in beta-lactamase is a global suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 8801-8806
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A (2002) Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 3045-3049
- Hunwicke RF (1946) Ambiguous inhibition of staphylococci by penicillin inactivated with penicillinase. *British medical journal* **2**: 855
- Ichiye T, Karplus M (1991) Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins* **11**: 205-217
- Imada A, Kitano K, Kintaka K, Muroi M, Asai M (1981) Sulfazecin and isosulfazecin, novel beta-lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature* **289**: 590-591
- Imtiaz U, Billings EM, Knox JR, Mobashery S (1994) A structure-based analysis of the inhibition of class A beta-lactamases by sulbactam. *Biochemistry* **33**: 5728-5738
- Isoda T, Ushiroguchi H, Satoh K, Takasaki T, Yamamura I, Sato C, Mihira A, Abe T, Tamai S, Yamamoto S, Kumagai T, Nagao Y (2006) Syntheses and pharmacokinetic studies of prodrug esters for the development of oral carbapenem, L-084. *The Journal of antibiotics* **59**: 241-247
- Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *The EMBO journal* **13**: 4684-4694
- Jacoby GA (2009) AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* **22**: 161-182, Table of Contents
- Jacoby GA (2009) AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* **22**: 161-182, Table of Contents

- Jago M (1964) Antibacterial Activity of Some Derivatives of 7-Aminocephalosporanic Acid against *Staphylococcus Aureus* and Synergism between These and Other Antibiotics. *British journal of pharmacology and chemotherapy* **22**: 22-33
- Jamieson CE, Lambert PA, Simpson IN (2003) In vitro activities of novel oxapenems, alone and in combination with ceftazidime, against gram-positive and gram-negative organisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 2615-2618
- Jamieson CE, Lambert PA, Simpson IN (2003) In vitro and in vivo activities of AM-112, a novel oxapenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 1652-1657
- Jansen G, Barbosa C, Schulenburg H (2014) Experimental evolution as an efficient tool to dissect adaptive paths to antibiotic resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*
- Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S (2013) Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1277**: 54-75
- Jones RN (1988) Cefotetan: a review of the microbiologic properties and antimicrobial spectrum. *American journal of surgery* **155**: 16-23
- Jones RN (1989) Review of the in-vitro spectrum and characteristics of cefmetazole (CS-1170). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **23 Suppl D**: 1-12
- Jones RN, Barry AL (1987) Antimicrobial activity of ceftriaxone, cefotaxime, desacetylcefotaxime, and cefotaxime-desacetylcefotaxime in the presence of human serum. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**: 818-820
- Jones RN, Barry AL, Thornsberry C, Gerlach EH, Fuchs PC, Gavan TL, Sommers HM (1981) Ceftazidime, a pseudomonas-active cephalosporin: in-vitro antimicrobial activity evaluation including recommendations for disc diffusion susceptibility tests. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **8 Suppl B**: 187-211
- Jones RN, Pfaller MA, Allen SD, Gerlach EH, Fuchs PC, Aldridge KE (1991) Antimicrobial activity of ceftiprome. An update compared to five third-generation cephalosporins against nearly 6000 recent clinical isolates from five medical centers. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **14**: 361-364
- Jones RN, Thornsberry C (1982) Cefotaxime: a review of in vitro antimicrobial properties and spectrum of activity. *Reviews of infectious diseases* **4 Suppl**: S300-315
- Jonhson J R, Woodward R B, Robinson R (1949) *The Chemistry of Penicillin* Princeton University Press: Princeton p 443.
- Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A (2005) Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 4733-4738
- Juan C, Moya B, Perez JL, Oliver A (2006) Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 1780-1787
- Jukes TH (1985) Some historical notes on chlortetracycline. *Reviews of Infectious Diseases* **7(5)**:702-707
- Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Miller AK, Hendlin D, Mochales S, Hernandez S, Woodruff HB, Birnbaum J (1979) Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics* **32**: 1-12

Kalp M, Carey PR (2008) Carbapenems and SHV-1 beta-lactamase form different acyl-enzyme populations in crystals and solution. *Biochemistry* **47**: 11830-11837

Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Endo S, Arai K, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Nishimaki K, Kitagawa M, Kunishima H, Kaku M (2011) High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and qnr determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66**: 2255-2262

Kariyone K, Harada H, Kurita M, Takano T (1970) Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. I. Synthesis and chemical properties of cefazolin. *The Journal of antibiotics* **23**: 131-136

Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA, van den Akker F (2007) Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases. *Biochemistry* **46**: 5732-5740

Kessler RE, Bies M, Buck RE, Chisholm DR, Pursiano TA, Tsai YH, Misiek M, Price KE, Leitner F (1985) Comparison of a new cephalosporin, BMY 28142, with other broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **27**: 207-216

Kim JY, Jung HI, An YJ, Lee JH, Kim SJ, Jeong SH, Lee KJ, Suh PG, Lee HS, Lee SH, Cha SS (2006) Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *Molecular microbiology* **60**: 907-916

Kimura S, Ishiguro M, Ishii Y, Alba J, Yamaguchi K (2004) Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 1454-1460

Knox JR (1995) Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 2593-2601

Kobayashi F, Saino Y, Koshi T, Hattori Y, Nakayama M, Iwasaki A, Mori T, Mitsuhashi S (1982) Antimicrobial and beta-lactamase inhibitory activities of carpetimycins A and B, new carbapenem antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **21**: 536-544

Koch AL (2000) Penicillin binding proteins, beta-lactams, and lactamases: offensives, attacks, and defensive countermeasures. *Critical reviews in microbiology* **26**: 205-220

Koch AL (2003) Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clinical microbiology reviews* **16**: 673-687

Koch, R. (1876) "Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*" (Investigations into bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of *Bacillus anthracis*), *Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, 2 (2)

Koch R. (1882) Die Aetiologie der Tuberculose, *Berliner Klinische Wochenschrift*, 19 : 221-230.

Koga T, Masuda N, Kakuta M, Namba E, Sugihara C, Fukuoka T (2008) Potent in vitro activity of tompopenem (CS-023) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 2849-2854

Kotsakis SD, Caselli E, Tzouvelekis LS, Petinaki E, Prati F, Miriagou V (2013) Interactions of oximino-substituted boronic acids and beta-lactams with the CMY-2-derived extended-spectrum cephalosporinases CMY-30 and CMY-42. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**: 968-976

Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E, Tzouvelekis LS (2010) Comparative biochemical and computational study of the role of naturally occurring mutations at Ambler positions 104 and 170 in GES beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 4864-4871

- Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouveleki LS (2010) GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 1331-1333
- Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Tzouveleki LS, Miriagou V (2009) Extended-spectrum properties of CMY-30, a Val211Gly mutant of CMY-2 cephalosporinase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 3520-3523
- Kotsakis SD, Tzouveleki LS, Petinaki E, Tzelepi E, Miriagou V (2011) Effects of the Val211Gly substitution on molecular dynamics of the CMY-2 cephalosporinase: implications on hydrolysis of expanded-spectrum cephalosporins. *Proteins* **79**: 3180-3192
- Kropp H, Sundelof JG, Hajdu R, Kahan FM (1982) Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **22**: 62-70
- Kropp H, Sundelof J G, Kahan J S, Kahan F M, Birnbaum J (1979) Abstr. 19th Intersci. Conf Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 231. American Society for Microbiology, Washington, DC
- Kuga A, Okamoto R, Inoue M (2000) ampR gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 561-567
- Kumar S, Adedirin SA, Nukaga M, Pratt RF (2004) Kinetics of turnover of cefotaxime by the *Enterobacter cloacae* P99 and GCl beta-lactamases: two free enzyme forms of the P99 beta-lactamase detected by a combination of pre- and post-steady state kinetics. *Biochemistry* **43**: 2664-2672
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lamotte-Brasseur J, Dive G, Dideberg O, Charlier P, Frere JM, Ghuysen JM (1991) Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G. *The Biochemical journal* **279** (Pt 1): 213-221
- Lamotte-Brasseur J, Knox J, Kelly JA, Charlier P, Fonze E, Dideberg O, Frere JM (1994) The structures and catalytic mechanisms of active-site serine beta-lactamases. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **12**: 189-230
- Lamotte-Brasseur J, Lounnas V, Raquet X, Wade RC (1999) pKa calculations for class A beta-lactamases: influence of substrate binding. *Protein science : a publication of the Protein Society* **8**: 404-409
- Larentzos JP, Criscenti LJ (2008) A molecular dynamics study of alkaline earth metal-chloride complexation in aqueous solution. *The journal of physical chemistry B* **112**: 14243-14250
- Laskowski R A, Macarthur M W, Moss D S, Thornton J M (1994) Procheck—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**: 283-291.
- Lassaux P, Traore DA, Loisel E, Favier A, Docquier JD, Sohier JS, Laurent C, Bebrone C, Frere JM, Ferrer JL, Galleni M (2011) Biochemical and structural characterization of the subclass B1 metallo-beta-lactamase VIM-4. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 1248-1255
- Laurent G, Durant F, Frere JM, Klein D, Ghuysen JM (1984) Des-, syn- and anti-oxyimino-delta 3-cephalosporins. Intrinsic reactivity and reaction with RTEM-2 serine beta-lactamase and D-alanyl-D-alanine-cleaving serine and Zn²⁺-containing peptidases. *The Biochemical journal* **218**: 933-937

- Lee CH, Liu JW, Li CC, Chien CC, Tang YF, Su LH (2011) Spread of ISCR1 elements containing blaDHA-(1) and multiple antimicrobial resistance genes leading to increase of flomoxef resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 4058-4063
- Lee KY, Hopkins JD, O'Brien TF, Syvanen M (1991) Gly-238-Ser substitution changes the substrate specificity of the SHV class A beta-lactamases. *Proteins* **11**: 45-51
- Lee SH, Jeong SH, Park YM (2003) Characterization of blaCMY-10 a novel, plasmid-encoded AmpC-type beta-lactamase gene in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes*. *Journal of applied microbiology* **95**: 744-752
- Lemke T (2008) Foye's principles of medicinal chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1028-1082.
- Leonard DA, Bonomo RA, Powers RA (2013) Class D beta-lactamases: a reappraisal after five decades. *Accounts of chemical research* **46**: 2407-2415
- Lesch, JE (2007) The first miracle drugs: how the sulfa drugs transformed medicine. Chapter 3: Prontosil. Oxford University Press
- Lett MC (1988) Tn3-like elements: molecular structure, evolution. *Biochimie* **70**: 167-176
- Levin BR, Perrot V, Walker N (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**: 985-997
- Levine DP (2006) Vancomycin: a history. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **42 Suppl 1**: S5-12
- Levitt PS, Papp-Wallace KM, Taracila MA, Hujer AM, Winkler ML, Smith KM, Xu Y, Harris ME, Bonomo RA (2012) Exploring the role of a conserved class A residue in the Omega-Loop of KPC-2 beta-lactamase: a mechanism for ceftazidime hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* **287**: 31783-31793
- Li J, Cross JB, Vreven T, Meroueh SO, Mobashery S, Schlegel HB (2005) Lysine carboxylation in proteins: OXA-10 beta-lactamase. *Proteins* **61**: 246-257
- Lietz EJ, Truher H, Kahn D, Hokenson MJ, Fink AL (2000) Lysine-73 is involved in the acylation and deacylation of beta-lactamase. *Biochemistry* **39**: 4971-4981
- Lin CW, Huang YW, Hu RM, Chiang KH, Yang TC (2009) The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Research in microbiology* **160**: 152-158
- Lister PD, Gardner VM, Sanders CC (1999) Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 882-889
- Livermore DM (1987) Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *European journal of clinical microbiology* **6**: 439-445
- Livermore DM, Akova M, Wu PJ, Yang YJ (1989) Clavulanate and beta-lactamase induction. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **24 Suppl B**: 23-33
- Livermore DM, Hope R, Mushtaq S, Warner M (2008) Orthodox and unorthodox clavulanate combinations against extended-spectrum beta-lactamase producers. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14 Suppl 1**: 189-193

Livermore DM, Yang YJ (1987) Beta-lactamase lability and inducer power of newer beta-lactam antibiotics in relation to their activity against beta-lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of infectious diseases* **155**: 775-782

Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P (1999) Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 2430-2436

Lloyd NC, Morgan HW, Nicholson BK, Ronimus RS (2005) The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century-old debate. *Angewandte Chemie* **44**: 941-944

Lobkovsky E, Billings EM, Moews PC, Rahil J, Pratt RF, Knox JR (1994) Crystallographic structure of a phosphonate derivative of the *Enterobacter cloacae* P99 cephalosporinase: mechanistic interpretation of a beta-lactamase transition-state analog. *Biochemistry* **33**: 6762-6772

Lobkovsky E, Moews PC, Liu H, Zhao H, Frere JM, Knox JR (1993) Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2-Å resolution of cephalosporinase from the *ampC* gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 11257-11261

Lovering AL, de Castro LH, Lim D, Strynadka NC (2007) Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* **315**: 1402-1405

Luengo JM (1995) Enzymatic synthesis of hydrophobic penicillins. *The Journal of antibiotics* **48**: 1195-1212

Luo Y, Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Chen Y, Han X, Zhao J, Tian S, Han L (2014) Characterization of KPC-2-Producing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Klebsiella oxytoca* Isolates from a Chinese Hospital. *Microbial drug resistance*

Lynn B (1965) The Semi-Synthetic Penicillins. *Antibiotica et chemotherapia Fortschritte Advances Progres* **13**: 125-226

Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A (2006) Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS microbiology reviews* **30**: 673-691

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2005. Βιολογία των μικροοργανισμών, Τόμος 1. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Majiduddin FK, Palzkill T (2003) Amino acid sequence requirements at residues 69 and 238 for the SME-1 beta-lactamase to confer resistance to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 1062-1067

Majiduddin FK, Palzkill T (2005) Amino acid residues that contribute to substrate specificity of class A beta-lactamase SME-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 3421-3427

Mammeri H, Poirel L, Bemer P, Drugeon H, Nordmann P (2004) Resistance to cefepime and ceftipime due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC beta-lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 716-720

Mammeri H, Poirel L, Fortineau N, Nordmann P (2006) Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 2573-2576

Manageiro V, Ferreira E, Canica M, Manaia CM (2013) GES-5 among the beta-lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. *FEMS microbiology letters*

Mandell L (2009) Doripenem: a new carbapenem in the treatment of nosocomial infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **49 Suppl 1**: S1-3

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). Molecular cloning: a laboratory manual (Vol. 545). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Manten A, Schot PK (1965) [the Antibacterial Action of Semi-Synthetic Penicillins, Measured with the Oxford Stock of Staphylococcus Aureus]. *Pharmaceutisch weekblad* **100**: 321-331

Maravic A, Skocibusic M, Samanic I, Fredotovic Z, Cvjetan S, Jutronic M, Puizina J (2013) Aeromonas spp. simultaneously harbouring bla(CTX-M-15), bla(SHV-12), bla(PER-1) and bla(FOX-2), in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia. *International journal of food microbiology* **166**: 301-308

Margalith P, Beretta G (1960) Rifomycin. XI. Taxonomic study on *Streptomyces mediterranei* nov. sp. *Mycopathol Mycol Appl* **8(4)**: 321-330

Marchot P, Chatonnet A (2012) Enzymatic activity and protein interactions in alpha/beta hydrolase fold proteins: moonlighting versus promiscuity. *Protein and peptide letters* **19**: 132-143

Mariotte-Boyer S, Nicolas-Chanoine MH, Labia R (1996) A kinetic study of NMC-A beta-lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. *FEMS microbiology letters* **143**: 29-33

Martin JF, Gutierrez S (1995) Genes for beta-lactam antibiotic biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**: 181-200

Martin R, Chabert J, Surear B, Demoures C (1951) [Penicillinase-producing staphylococci]. *El Dia medico* **23**: 1680-1682

Martinez JL (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* **276**: 2521-2530

Maruyama T, Yamamoto Y, Kano Y, Kurazono M, Matsuhisa E, Takata H, Takata T, Atsumi K, Iwamatsu K, Shitara E (2007) CP5484, a novel quaternary carbapenem with potent anti-MRSA activity and reduced toxicity. *Bioorganic & medicinal chemistry* **15**: 6379-6387

Maruyama T, Yamamoto Y, Kano Y, Kurazono M, Shitara E, Iwamatsu K, Atsumi K (2009) Synthesis of novel di- and tricationic carbapenems with potent anti-MRSA activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**: 447-450

Massova I, Kollman PA (2002) pKa, MM, and QM studies of mechanisms of beta-lactamases and penicillin-binding proteins: acylation step. *Journal of computational chemistry* **23**: 1559-1576

Massova I, Kollman PA (1999) Quantum Mechanical Study of β -Lactam Reactivity: The Effect of Solvation on Barriers of Reaction and Stability of Transition States and Reaction Intermediates. *The Journal of Physical Chemistry B*, **103(40)**: 8628-8638.

Massova I, Mobashery S (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 1-17

Masuyoshi S, Inoue M, Takaoka M, Mitsunashi S (1981) Cefotaxime: binding affinity to penicillin-binding proteins and morphological changes of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arzneimittel-Forschung* **31**: 1070-1072

- Matagne A, Dubus A, Galleni M, Frere JM (1999) The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Natural product reports* **16**: 1-19
- Matagne A, Galleni M, Laraki N, Amicosante G, Rossolini, G (2001) β -Lactamases, an Old but Ever Renascent Problem. *Novel Frontiers in the Production of Compounds for Biomedical Use* **1**: 117.
- Matagne A, Frere JM (1995) Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A beta-lactamases. *Biochimica et biophysica acta* **1246**: 109-127
- Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM (1998) Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *The Biochemical journal* **330** (Pt 2): 581-598
- Matagne A, Ledent P, Monnaie D, Felici A, Jamin M, Raquet X, Galleni M, Klein D, Francois I, Frere JM (1995) Kinetic study of interaction between BRL 42715, beta-lactamases, and D-alanyl-D-alanine peptidases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 227-231
- Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW (1975) The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *Journal of general microbiology* **88**: 169-178
- Matsumoto Y, Inoue M (1999) Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 307-313
- Matsumura N, Minami S, Mitsuhashi S (1998) Sequences of homologous beta-lactamases from clinical isolates of *Serratia marcescens* with different substrate specificities. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 176-179
- Matthew M, Hedges RW, Smith JT (1979) Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **138**: 657-662
- Maveyraud L, Mourey L, Kotra LP, Pedelacq JD, Guillet V, Mobashery S, Samama JP (1998) Structural basis for clinical longevity of carbapenem antibiotics in the face of challenge by the common class A β -lactamases from the antibiotic-resistant bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, **120**(38): 9748-9752.
- Mavroidi A, Miriagou V, Malli E, Stefos A, Dalekos GN, Tzouvelekis LS, Petinaki E (2012) Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 beta-lactamase. *International journal of antimicrobial agents* **39**: 247-250
- Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A, Miriagou V, Sofianou D, Tzouvelekis LS (2001) An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **48**: 627-630
- McGowan SJ, Sebahia M, O'Leary S, Hardie KR, Williams P, Stewart GS, Bycroft BW, Salmond GP (1997) Analysis of the carbapenem gene cluster of *Erwinia carotovora*: definition of the antibiotic biosynthetic genes and evidence for a novel beta-lactam resistance mechanism. *Molecular microbiology* **26**: 545-556
- Mead T H, Stack M V (1948) Penicillin precursors in cornsteep liquor. *Biochem J* **42**: xviii
- Medeiros AA (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **24 Suppl 1**: S19-45

- Melano R, Petroni A, Garutti A, Saka HA, Mange L, Pasteran F, Rapoport M, Rossi A, Galas M (2002) New carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 2162-2168
- Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S (2006) Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4404-4409
- Meroueh S, Cha J, Mobashery S (2007) Inhibition of class A β -lactamases, p. 101–114. In R. A. Bonomo and M. E. Tolmasey (ed.), *Enzyme mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition*. ASM Press, Washington, DC.
- Meroueh SO, Fisher JF, Schlegel HB, Mobashery S (2005) Ab initio QM/MM study of class A beta-lactamase acylation: dual participation of Glu166 and Lys73 in a concerted base promotion of Ser70. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 15397-15407
- Minasov G, Wang X, Shoichet BK (2002) An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 5333-5340
- Miriagou V, Carattoli A, Tzelepi E, Villa L, Tzouveleki LS (2005) IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 3541-3543
- Miriagou V, Tzouveleki LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM (2003) Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 1297-1300
- Miriagou V, Tzouveleki LS, Villa L, Lebessi E, Vatoopoulos AC, Carattoli A, Tzelepi E (2004) CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 3172-3174
- Miyadera T, Sugimura Y, Hashimoto T, Tanaka T, Iino K, Shibata T, Sugawara S (1983) Synthesis and in vitro activity of a new carbapenem, RS-533. *The Journal of antibiotics* **36**: 1034-1039
- Mlynarczyk A, Szymanek K, Sawicka-Grzelak A, Pazik J, Buczkowska T, Durlik M, Lagiewska B, Pacholczyk M, Chmura A, Paczek L, Mlynarczyk G (2009) CTX-M and TEM as predominant types of extended spectrum beta-lactamases among *Serratia marcescens* isolated from solid organ recipients. *Transplantation proceedings* **41**: 3253-3255
- Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM, Sentochnik DE (1989) The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **24 Suppl A**: 1-7
- Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, Diepeveen-de Bruin M, Nguyen-Disteche M, de Kruijff B, Breukink E (2011) Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO journal* **30**: 1425-1432
- Monks J, Waley SG (1988) Imipenem as substrate and inhibitor of beta-lactamases. *The Biochemical journal* **253**: 323-328
- Morandi F, Caselli E, Morandi S, Focia PJ, Blazquez J, Shoichet BK, Prati F (2003) Nanomolar inhibitors of AmpC beta-lactamase. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 685-695

- Mourey L, Kotra LP, Bellettini J, Bulychev A, O'Brien M, Miller MJ, Mobashery S, Samama JP (1999) Inhibition of the broad spectrum nonmetallocarbapenamase of class A (NMC-A) beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* by monocyclic beta-lactams. *The Journal of biological chemistry* **274**: 25260-25265
- Murakami K, Doi M, Yoshida T (1982) Asparenomyocins A, B and C, new carbapenem antibiotics. V. Inhibition of beta-lactamases. *The Journal of antibiotics* **35**: 39-45
- Murakami K, Yoshida T (1981) Role of the 7 alpha-methoxy and side-chain carboxyl of moxalactam in beta-lactamase stability and antibacterial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **19**: 1-7
- Naas T, Nordmann P (1994) Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7693-7697
- Naas T, Nordmann P (1999) OXA-type beta-lactamases. *Current pharmaceutical design* **5**: 865-879
- Naas T, Poirel L, Nordmann P (2008) Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14 Suppl 1**: 42-52
- Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P (1994) Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**: 1262-1270
- Nagano R, Adachi Y, Imamura H, Yamada K, Hashizume T, Morishima H (1999) Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various beta-lactamases, including class B metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 2497-2503
- Nagarajan R, Boeck LD, Gorman M, Hamill RL, Higgins CE, Hoehn MM, Stark WM, Whitney JG (1971) Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society* **93**: 2308-2310
- Nangia A, Biradha K, Desiraju GR (1996) Correlation of biological activity in β -lactam antibiotics with Woodward and Cohen structural parameters: A Cambridge database study. *J Chem Soc, Perkin Trans* **2(5)**: 943-53
- Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, Inoue M (2004) CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 1151-1158
- Nakayama M, Iwasaki A, Kimura S, Mizoguchi T, Tanabe S, Murakami A, Watanabe I, Okuchi M, Itoh H, Saino Y, Kobayashi F, Mori T (1980) Carpetimycins A and B, new beta-lactam antibiotics. *The Journal of antibiotics* **33**: 1388-1390
- Nardini M, Dijkstra BW (1999) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology* **9**: 732-737
- Nathwani D, Wood MJ (1993) Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* **45**: 866-894
- Nevers P, Saedler H (1977) Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature* **268**: 109-115
- Newton GGF, Abraham EP (1955) Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulfur and D-aminoadipic acid. *Nature* **175**: 548
- Nikaido H (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* **78**: 119-146

- Nikaido H, Liu W, Rosenberg EY (1990) Outer membrane permeability and beta-lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**: 337-342
- Nishida K, Kunugita C, Uji T, Higashitani F, Hyodo A, Unemi N, Maiti SN, Phillips OA, Spevak P, Atchison KP, Salama SM, Atwal H, Micetich RG (1999) In vitro and in vivo activities of Syn2190, a novel beta-lactamase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 1895-1900
- Nishida M, Matsubara T, Murakawa T, Mine Y, Yokota Y (1970) Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. II. In vitro and in vivo antimicrobial activity. *The Journal of antibiotics* **23**: 137-148
- Nishikawa J, Tori K (1984) 3-Substituent effect and 3-methylene substituent effect on the structure-reactivity relationship of 7 beta-(acylamino)-3-cephem-4-carboxylic acid derivatives studied by carbon-13 and IR spectroscopies. *Journal of medicinal chemistry* **27**: 1657-1663
- Noel GJ, Bush K, Bagchi P, Ianus J, Strauss RS (2008) A randomized, double-blind trial comparing ceftobiprole medocaril with vancomycin plus ceftazidime for the treatment of patients with complicated skin and skin-structure infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**: 647-655
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R (1993) Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**: 962-969
- Norrby SR, Alestig K, Bjornegard B, Burman LA, Ferber F, Huber JL, Jones KH, Kahan FM, Kahan JS, Kropp H, Meisinger MA, Sundelof JG (1983) Urinary recovery of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **23**: 300-307
- Nouda H, Harabe ET, Sumita Y, Okuda T, Fukasawa M (1992) Beta-lactamase stability and inhibitory activity of meropenem combined with a potent antibacterial activity. *Chemotherapy* **38**: 218-224
- Nozaki Y, Imada A, Yoneda M (1979) SCE-963, a new potent cephalosporin with high affinity for penicillin-binding proteins 1 and 3 of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **15**: 20-27
- Nukaga M, Bethel CR, Thomson JM, Hujer AM, Distler A, Anderson VE, Knox JR, Bonomo RA (2008) Inhibition of class A beta-lactamases by carbapenems: crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. *Journal of the American Chemical Society* **130**: 12656-12662
- Nukaga M, Haruta S, Tanimoto K, Kogure K, Taniguchi K, Tamaki M, Sawai T (1995) Molecular evolution of a class C beta-lactamase extending its substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **270**: 5729-5735
- Nukaga M, Kumar S, Nukaga K, Pratt RF, Knox JR (2004) Hydrolysis of third-generation cephalosporins by class C beta-lactamases. Structures of a transition state analog of cefotaxime in wild-type and extended spectrum enzymes. *The Journal of biological chemistry* **279**: 9344-9352
- Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, Knox JR (2002) Structure of an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Proteus vulgaris* K1. *Journal of molecular biology* **317**: 109-117
- Nukaga M, Mayama K, Hujer AM, Bonomo RA, Knox JR (2003) Ultrahigh resolution structure of a class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *Journal of molecular biology* **328**: 289-301

- O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH (1972) Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1**: 283-288
- O'Callaghan CH, Sykes RB, Ryan DM, Foord RD, Muggleton PW (1976) Cefuroxime - a new cephalosporin antibiotic. *The Journal of antibiotics* **29**: 29-37
- Oefner C, D'Arcy A, Daly JJ, Gubernator K, Charnas RL, Heinze I, Hubschwerlen C, Winkler FK (1990) Refined crystal structure of beta-lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for beta-lactam hydrolysis. *Nature* **343**: 284-288
- Okabe M, Azuma S, Kojima I, Kouno K, Okamoto R, Fukagawa Y, Ishikura T (1982) Studies on the OA-6129 group of antibiotics, new carbapenem compounds. I. Taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics* **35**: 1255-1263
- Okamura K, Hirata S, Okumura Y, Fukagawa Y, Shimauchi Y, Kouno K, Ishikura T (1978) PS-5, a new beta-lactam antibiotic from *Streptomyces*. *The Journal of antibiotics* **31**: 480-482
- Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blazquez J (2004) Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 4226-4233
- Oliynyk M, Samborskyy M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nature biotechnology* **25**: 447-453
- Orencia MC, Yoon JS, Ness JE, Stemmer WP, Stevens RC (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nature structural biology* **8**: 238-242
- Osono T, Watanabe S, Saito T, Gushima H, Murakami K, Takahashi I, Yamaguchi H, Sasaki T, Susaki K, Takamura S, Miyoshi T, Oka Y (1980) Oganomycins, new 7-methoxy-cephalosporins produced by precursor fermentation with heterocyclic thiols. *The Journal of antibiotics* **33**: 1074-1078
- Otten H (1986) Domagk and the development of the sulphonamides. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **17**: 689-696
- Padayatti PS, Sheri A, Totir MA, Helfand MS, Carey MP, Anderson VE, Carey PR, Bethel CR, Bonomo RA, Buynak JD, van den Akker F (2006) Rational design of a beta-lactamase inhibitor achieved via stabilization of the trans-enamine intermediate: 1.28 A crystal structure of wt SHV-1 complex with a penam sulfone. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 13235-13242
- Page MG (1993) The kinetics of non-stoichiometric bursts of beta-lactam hydrolysis catalysed by class C beta-lactamases. *The Biochemical journal* **295** (Pt 1): 295-304
- Page MG (2008) Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14 Suppl 1**: 63-74
- Page MG, Heim J (2009) New molecules from old classes: revisiting the development of beta-lactams. *IDrugs : the investigational drugs journal* **12**: 561-565
- Page MI (1992) *The Chemistry of beta-Lactams*; Blackie Academic & Professional: London p 351
- Page MI (1984) The mechanisms of reactions of beta-lactam antibiotics. *Acc. Chem. Res.* **17**(4): 144-151
- Page MI, Laws AP (1998) The mechanism of catalysis and the inhibition of β -lactamases. *Chemical Communications*, **16**: 1609-1617.

Papagiannitsis CC, Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Arlet G, Miriagou V (2007) SCO-1, a novel plasmid-mediated class A beta-lactamase with carbenicillinase characteristics from *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 2185-2188

Papagiannitsis CC, Miriagou V, Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC (2013) Characterization of pKP1433, a novel KPC-2-encoding plasmid from *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**: 3427-3429

Papagiannitsis CC, Miriagou V, Kotsakis SD, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Petinaki E, Tzouvelekis LS (2012) Characterization of a transmissible plasmid encoding VEB-1 and VIM-1 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**: 4024-4025

Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Kotsakis SD, Tzelepi E, Miriagou V (2011) Sequence of pR3521, an IncB plasmid from *Escherichia coli* encoding ACC-4, SCO-1, and TEM-1 beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 376-381

Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Miriagou V (2009) Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active p2 promoter. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 277-280

Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Miriagou V (2007) Plasmid-encoded ACC-4, an extended-spectrum cephalosporinase variant from *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 3763-3767

Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA (1990) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**: 2200-2209

Papp-Wallace KM, Bethel CR, Distler AM, Kasuboski C, Taracila M, Bonomo RA (2010) Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 890-897

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 4943-4960

Papp-Wallace KM, Taracila M, Wallace CJ, Hujer KM, Bethel CR, Hornick JM, Bonomo RA (2010) Elucidating the role of Trp105 in the KPC-2 beta-lactamase. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**: 1714-1727

Papp-Wallace KM, Taracila MA, Gatta JA, Ohuchi N, Bonomo RA, Nukaga M (2013) Insights into beta-lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. *The Journal of biological chemistry* **288**: 19090-19102

Parker WL, Rathnum ML, Wells JS, Jr., Trejo WH, Principe PA, Sykes RB (1982) SQ 27,860, a simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*. *The Journal of antibiotics* **35**: 653-660

Partridge SR (2007) Genetic environment of ISEcp1 and blaACC-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 2658-2659; author reply 2659

Partridge SR, Hall RM (2005) Evolution of transposons containing blaTEM genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 1267-1268

Pasquali F, Kehrenberg C, Manfreda G, Schwarz S (2005) Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella Typhimurium*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **55**: 562-565

- Patera A, Blaszcak L C, Shoichet B K (2000) Crystal structures of substrate and inhibitor complexes with AmpC β -lactamase: Possible implications for substrate-assisted catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **122(43)**: 10504-10512.
- Pattanaik P, Bethel CR, Hujer AM, Hujer KM, Distler AM, Taracila M, Anderson VE, Fritsche TR, Jones RN, Pagadala SR, van den Akker F, Buynak JD, Bonomo RA (2009) Strategic design of an effective beta-lactamase inhibitor: LN-1-255, a 6-alkylidene-2'-substituted penicillin sulfone. *The Journal of biological chemistry* **284**: 945-953
- Paukner S, Hesse L, Prezelj A, Solmajer T, Urleb U (2009) In vitro activity of LK-157, a novel tricyclic carbapenem as broad-spectrum β -lactamase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 505-511
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA (2007) The continuing challenge of ESBLs. *Current opinion in pharmacology* **7**: 459-469
- Perry CM, Ibbotson T (2002) Biapenem. *Drugs* **62**: 2221-2234; discussion 2235
- Petit A, Maveyraud L, Lenfant F, Samama JP, Labia R, Masson JM (1995) Multiple substitutions at position 104 of beta-lactamase TEM-1: assessing the role of this residue in substrate specificity. *The Biochemical journal* **305 (Pt 1)**: 33-40
- Petrella S, Clermont D, Casin I, Jarlier V, Sougakoff W (2001) Novel class A beta-lactamase Sed-1 from *Citrobacter sedlakii*: genetic diversity of beta-lactamases within the *Citrobacter* genus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 2287-2298
- Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W (2008) Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**: 3725-3736
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 1-11
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P (2012) Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**: 883-893
- Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P (2005) BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 3743-3748
- Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, Faccone D, Galas M, Drugeon H, Cattoir V, Nordmann P (2007) Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 2179-2184
- Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P (2002) Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **50**: 1031-1034
- Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P (2005) ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 447-450

- 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, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P (1999) Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 573-581
- Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P (2001) CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 3355-3361
- Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P (2011) Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66**: 1730-1733
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, 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
- Pope CE, Carter PE, Heffernan HM (2009) CMY-29 and CMY-30, two novel plasmid-mediated AmpC beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 3178
- Potron A, Poirel L, Croize J, Chantepedrix V, Nordmann P (2009) Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type beta-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 3010-3016
- Poulsen LR, Lopez-Marques RL, Palmgren MG (2008) Flippases: still more questions than answers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 3119-3125
- Power P, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G (2006) Biochemical and molecular characterization of three new variants of AmpC beta-lactamases from *Morganella morganii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 962-967
- Powers RA, Caselli E, Focia PJ, Prati F, Shoichet BK (2001) Structures of ceftazidime and its transition-state analogue in complex with AmpC beta-lactamase: implications for resistance mutations and inhibitor design. *Biochemistry* **40**: 9207-9214
- Pratt RF (2002) Functional evolution of the serine β -lactamase active site. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**: 851-861
- Pratt RF (2008) Substrate specificity of bacterial DD-peptidases (penicillin-binding proteins). *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 2138-2155
- Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouveleki LS (1997) Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**: 838-840
- Proctor P, Gensmantel N P, Page M I (1982) The chemical reactivity of penicillins and other β -lactam antibiotics *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**: 1185-1192
- Queenan AM, Bush K (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* **20**: 440-458, table of contents

- Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K (2004) Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *Journal of clinical microbiology* **42**: 269-275
- Queenan AM, Jenkins S, Bush K (2001) Cloning and biochemical characterization of FOX-5, an AmpC-type plasmid-encoded beta-lactamase from a New York City *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 3189-3194
- Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K (2010) Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 565-569
- Queenan AM, Shang W, Kania M, Page MG, Bush K (2007) Interactions of ceftobiprole with beta-lactamases from molecular classes A to D. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 3089-3095
- Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J (2006) SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 3485-3487
- Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K (2000) SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 3035-3039
- Ramdani-Bouguessa N, Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Tazir M, Canica M (2011) Role of SHV beta-lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to beta-lactams in an Algerian hospital. *Journal of medical microbiology* **60**: 983-987
- Raquet X, Lamotte-Brasseur J, Fonze E, Goussard S, Courvalin P, Frere JM (1994) TEM beta-lactamase mutants hydrolysing third-generation cephalosporins. A kinetic and molecular modelling analysis. *Journal of molecular biology* **244**: 625-639
- Raquet X, Vanhove M, Lamotte-Brasseur J, Goussard S, Courvalin P, Frere JM (1995) Stability of TEM beta-lactamase mutants hydrolyzing third generation cephalosporins. *Proteins* **23**: 63-72
- Rasia RM, Vila AJ (2002) Exploring the role and the binding affinity of a second zinc equivalent in *B. cereus* metallo-beta-lactamase. *Biochemistry* **41**: 1853-1860
- Raskine L, Borrel I, Barnaud G, Boyer S, Hanau-Bercot B, Gravisse J, Labia R, Arlet G, Sanson-Le-Pors MJ (2002) Novel plasmid-encoded class C beta-lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 2262-2265
- Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA (1996) Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**: 2080-2086
- Reading C, Cole M (1977) Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **11**: 852-857
- Reisbig MD, Hanson ND (2002) The ACT-1 plasmid-encoded AmpC beta-lactamase is inducible: detection in a complex beta-lactamase background. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **49**: 557-560
- Reisbig MD, Hanson ND (2004) Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated ampC beta-lactamase gene blaMIR-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 4177-4182

- Rice KC, Bayles KW (2008) Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **72**: 85-109, table of contents
- Richmond MH (1982) Susceptibility of moxalactam to beta-lactamase. *Reviews of infectious diseases* **4 Suppl**: S522-526
- Richter HG, Angehrn P, Hubschwerlen C, Kania M, Page MG, Specklin JL, Winkler FK (1996) Design, synthesis, and evaluation of 2 beta-alkenyl penam sulfone acids as inhibitors of beta-lactamases. *Journal of medicinal chemistry* **39**: 3712-3722
- Robin F, Delmas J, Chanal C, Sirot D, Sirot J, Bonnet R (2005) TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 beta-lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 4443-4447
- Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P (2009) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 4783-4788
- Rosenblum G, Meroueh S, Toth M, Fisher JF, Fridman R, Mobashery S, Sagi I (2007) Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a matrix metalloproteinase zymogen: challenging the cysteine switch dogma. *Journal of the American Chemical Society* **129**: 13566-13574
- Rowe-Magnus DA, Mazel D (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International journal of medical microbiology : IJMM* **292**: 115-125
- Sampson JM, Ke W, Bethel CR, Pagadala SR, Nottingham MD, Bonomo RA, Buynak JD, van den Akker F (2011) Ligand-dependent disorder of the Omega loop observed in extended-spectrum SHV-type beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 2303-2309
- Sader H, Jones R N (1992). Historical overview of the cephalosporin spectrum: Four generations of structural evolution. *Antimicrobial Newsletter* **8(12)**: 75-82
- Salyers AA, Whitt DD (1994) Bacterial pathogenesis a molecular approach. ASM press
- Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS (2008) Clavulanic acid: a review. *Biotechnology advances* **26**: 335-351
- Scheffers DJ (2007) Cell wall growth during elongation and division: one ring to bind them? *Molecular microbiology* **64**: 877-880
- Scheffers DJ, Pinho MG (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **69**: 585-607
- Schmidtke AJ, Hanson ND (2006) Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 2030-2037
- Schneider I, Queenan AM, Markovska R, Markova B, Keuleyan E, Bauernfeind A (2009) New variant of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases, CTX-M-71, with a Gly238Cys substitution in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Bulgaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 4518-4521
- Schneider T, Senn MM, Berger-Bachi B, Tossi A, Sahl HG, Wiedemann I (2004) In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* **53**: 675-685
- Shadomy S, Wagner G, Carver M (1978) In vitro and in vivo studies with BL-S786, cefoxitin, and cefamandole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **13**: 412-415

- Shaheen M, Li J, Ross AC, Vederas JC, Jensen SE (2011) Paenibacillus polymyxa PKB1 produces variants of polymyxin B-type antibiotics. *Chemistry & biology* **18**: 1640-1648
- Shen MY, Sali A (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science : a publication of the Protein Society* **15**: 2507-2524
- Shinnick T (2006) Mycobacterium leprae in The Prokaryotes PART B, 1, 934-944
- Sideraki V, Huang W, Palzkill T, Gilbert HF (2001) A secondary drug resistance mutation of TEM-1 beta-lactamase that suppresses misfolding and aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 283-288
- Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, Ledezma L (2000) TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 997-1003
- Silver LL (2012) Rational approaches to antibiotic discovery: pre-genomic directed and phenotypic screening, 2.4.2 Screens for spheroplast formation. In: Thomas Dougherty, Michael J. Pucci, Antibiotic Discovery and Development. Chap. 2, p. 46
- Sirot D (1995) Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **36 Suppl A**: 19-34
- Smith CA, Antunes NT, Stewart NK, Toth M, Kumarasiri M, Chang M, Mobashery S, Vakulenko SB (2013) Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23 beta-lactamase from Acinetobacter baumannii. *Chemistry & biology* **20**: 1107-1115
- Smith CA, Caccamo M, Kantardjieff KA, Vakulenko S (2007) Structure of GES-1 at atomic resolution: insights into the evolution of carbapenemase activity in the class A extended-spectrum beta-lactamases. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **63**: 982-992
- Smith CA, Frase H, Toth M, Kumarasiri M, Wiafe K, Munoz J, Mobashery S, Vakulenko SB (2012) Structural basis for progression toward the carbapenemase activity in the GES family of beta-lactamases. *Journal of the American Chemical Society* **134**: 19512-19515
- Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS (2003) Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in Klebsiella pneumoniae isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51**: 711-714
- Sorin EJ, Pande VS (2005) Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. *Biophysical journal* **88**: 2472-2493
- Sougakoff W, L'Hermite G, Pernot L, Naas T, Guillet V, Nordmann P, Jarlier V, Delette J (2002) Structure of the imipenem-hydrolyzing class A beta-lactamase SME-1 from Serratia marcescens. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **58**: 267-274
- Spencer RC (1990) Temocillin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **26**: 735-737
- Spizek J, Rezanka T (2004) Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology* **63**: 510-519
- Stapley EO, Jackson M, Hernandez S, Zimmerman SB, Currie SA, Mochales S, Mata JM, Woodruff HB, Hendlin D (1972) Cephamycins, a new family of beta-lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including Streptomyces lactamdurans sp. n. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2**: 122-131

- Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature reviews Cancer* **8**: 473-480
- Strynadka NC, Adachi H, Jensen SE, Johns K, Sielecki A, Betzel C, Sutoh K, James MN (1992) Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* **359**: 700-705
- Sugihara K, Sugihara C, Matsushita Y, Yamamura N, Uemori M, Tokumitsu A, Inoue H, Kakuta M, Namba E, Nasu H, Koga T (2010) In vivo pharmacodynamic activity of tomopenem (formerly CS-023) against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine thigh infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**: 5298-5302
- Sutherland R, Croydon EA, Rolinson GN (1970) Flucloxacillin, a new isoxazolyl penicillin, compared with oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. *British medical journal* **4**: 455-460
- Swabb EA (1985) Clinical pharmacology of aztreonam in healthy recipients and patients: a review. *Reviews of infectious diseases* **7 Suppl 4**: S605-612
- Swabb EA (1985) Review of the clinical pharmacology of the monobactam antibiotic aztreonam. *The American journal of medicine* **78**: 11-18
- Swaren P, Maveyraud L, Raquet X, Cabantous S, Duez C, Pedelacq JD, Mariotte-Boyer S, Mourey L, Labia R, Nicolas-Chanoine MH, Nordmann P, Frere JM, Samama JP (1998) X-ray analysis of the NMC-A beta-lactamase at 1.64-Å resolution, a class A carbapenemase with broad substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **273**: 26714-26721
- Sykes RB, Bonner DP, Bush K, Georgopapadakou NH, Wells JS (1981) Monobactams--monocyclic beta-lactam antibiotics produced by bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **8 Suppl E**: 1-16
- Tacao M, Moura A, Correia A, Henriques I (2014) Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Water research* **48**: 100-107
- Tafi A, Agamennone M, Tortorella P, Alcaro S, Gallina C, Botta M (2005) AMBER force field implementation of the boronate function to simulate the inhibition of beta-lactamases by alkyl and aryl boronic acids. *European journal of medicinal chemistry* **40**: 1134-1142
- Taibi P, Mobashery S (1995) Mechanism of turnover of imipenem by the TEM. beta.-lactamase revisited. *Journal of the American Chemical Society* **117(29)**: 7600-7605.
- Tamaki M, Nukaga M, Sawai T (1994) Replacement of serine 237 in class A beta-lactamase of *Proteus vulgaris* modifies its unique substrate specificity. *Biochemistry* **33**: 10200-10206
- Tan SY, Rogers L (2007) Louis Pasteur (1822-1895): the germ theorist. *Singapore medical journal* **48**: 4-5
- Tavakoli N, Comanducci A, Dodd HM, Lett MC, Albiger B, Bennett P (2000) IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* **44**: 66-84
- Thomas VL, McReynolds AC, Shoichet BK (2010) Structural bases for stability-function tradeoffs in antibiotic resistance. *Journal of molecular biology* **396**: 47-59
- Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, Wang HN, Doi Y (2011) PME-1, an extended-spectrum beta-lactamase identified in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 2710-2713

- Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W (2008) Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. *Journal of clinical microbiology* **46**: 3080-3083
- Tidwell TT (2008) Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of beta-lactam synthesis. *Angewandte Chemie* **47**: 1016-1020
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **70**: 296-316
- Tréfouël J T, Nitti F, Bovet D (1935) Activité du p-aminophénylsulfamide sur l'infection streptococcique expérimentale de la souris et du lapin. *C. R. Soc. Biol.*, **120**: 756
- Trehan I, Morandi F, Blaszcak LC, Shoichet BK (2002) Using steric hindrance to design new inhibitors of class C beta-lactamases. *Chemistry & biology* **9**: 971-980
- Tripathi R, Nair NN (2013) Mechanism of acyl-enzyme complex formation from the Henry-Michaelis complex of class C beta-lactamases with beta-lactam antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* **135**: 14679-14690
- Tsuji A, Nakashima E, Deguchi Y, Nishide K, Shimizu T, Horiuchi S, Ishikawa K, Yamana T (1981) Degradation kinetics and mechanism of aminocephalosporins in aqueous solution: cefadroxil. *Journal of pharmaceutical sciences* **70**: 1120-1128
- Tsukamoto K, Nishida N, Tsuruoka M, Sawai T (1990) Function of the conserved triad residues in the class C beta-lactamase from *Citrobacter freundii* GN346. *FEBS letters* **271**: 243-246
- Tsukamoto K, Ohno R, Sawai T (1990) Extension of the substrate spectrum by an amino acid substitution at residue 219 in the *Citrobacter freundii* cephalosporinase. *Journal of bacteriology* **172**: 4348-4351
- Tuomanen E, Cozens R (1987) Changes in peptidoglycan composition and penicillin-binding proteins in slowly growing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **169**: 5308-5310
- Turck M, Belcher DW, Ronald A, Smith RH, Wallace JF (1967) New cephalosporin antibiotic--cephaloridine. Clinical and laboratory evaluation. *Archives of internal medicine* **119**: 50-59
- Turner PJ (2005) Extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **41 Suppl 4**: S273-275
- Tybring L, Melchior NH (1975) Mecillinam (FL 1060), a 6beta-amidinopenicillanic acid derivative: bactericidal action and synergy in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **8**: 271-276
- Tyndall J. (1881). *Essays on the floating-matter of the air in relation to putrefaction and infection*. London: Longmans i (1882). New York: D. Appleton and Co. i (1966). New York and London: Johnson Reprint Corp.
- Tzouvelekis LS, Bonomo RA (1999) SHV-type beta-lactamases. *Current pharmaceutical design* **5**: 847-864
- Tzouvelekis LS, Gazouli M, Prinarakis EE, Tzelepi E, Legakis NJ (1997) Comparative evaluation of the inhibitory activities of the novel penicillanic acid sulfone Ro 48-1220 against beta-lactamases that belong to groups 1, 2b, and 2be. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**: 475-477

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL (2012) Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews* **25**: 682-707

Vakulenko SB, Taibi-Tronche P, Toth M, Massova I, Lerner SA, Mobashery S (1999) Effects on substrate profile by mutational substitutions at positions 164 and 179 of the class A TEM(pUC19) beta-lactamase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **274**: 23052-23060

Valvano MA (2008) Undecaprenyl phosphate recycling comes out of age. *Molecular microbiology* **67**: 232-235

Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry* **26**: 1701-1718

Van Krimpen PC, Van Bennekom WP, Bult A (1987) Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharmaceutisch weekblad Scientific edition* **9**: 1-23

Vanhove M, Raquet X, Palzkill T, Pain RH, Frere JM (1996) The rate-limiting step in the folding of the cis-Pro167Thr mutant of TEM-1 beta-lactamase is the trans to cis isomerization of a non-proline peptide bond. *Proteins* **25**: 104-111

Venkatesan AM, Agarwal A, Abe T, Ushiroguchi H, Yamamura I, Ado M, Tsuyoshi T, Dos Santos O, Gu Y, Sum FW, Li Z, Francisco G, Lin YI, Petersen PJ, Yang Y, Kumagai T, Weiss WJ, Shlaes DM, Knox JR, Mansour TS (2006) Structure-activity relationship of 6-methylidene penems bearing 6,5 bicyclic heterocycles as broad-spectrum beta-lactamase inhibitors: evidence for 1,4-thiazepine intermediates with C7 R stereochemistry by computational methods. *Journal of medicinal chemistry* **49**: 4623-4637

Verma V, Testero SA, Amini K, Wei W, Liu J, Balachandran N, Monoharan T, Stynes S, Kotra LP, Golemi-Kotra D (2011) Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of biological chemistry* **286**: 37292-37303

Viau RA, Hujer AM, Marshall SH, Perez F, Hujer KM, Briceno DF, Dul M, Jacobs MR, Grossberg R, Toltzis P, Bonomo RA (2012) "Silent" dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates bearing K. pneumoniae carbapenemase in a long-term care facility for children and young adults in Northeast Ohio. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **54**: 1314-1321

Vilar M, Galleni M, Solmajer T, Turk B, Frere JM, Matagne A (2001) Kinetic study of two novel enantiomeric tricyclic beta-lactams which efficiently inactivate class C beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 2215-2223

Vollmer W, Bertsche U (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **1778**: 1714-1734

Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS microbiology reviews* **32**: 259-286

Vollmer W, Seligman SJ (2010) Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in microbiology* **18**: 59-66

Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouvelekis LS (2004) Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS microbiology letters* **234**: 209-213

- 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
- Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y (2006) Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 534-541
- Wainwright M, Swan HT (1986) C.G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy. *Medical history* **30**: 42-56
- Walkiewicz K, Benitez Cardenas AS, Sun C, Bacorn C, Saxer G, Shamooy Y (2012) Small changes in enzyme function can lead to surprisingly large fitness effects during adaptive evolution of antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 21408-21413
- Wang JM, Cieplak P, Kollman P A (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J Comp Chem* **21**: 1049-1074.
- Walsh C, Wright G (2005) Introduction: antibiotic resistance. *Chemical reviews* **105**: 391-394
- Wan KF, Wang S, Brown CJ, Yu VC, Entzeroth M, Lane DP, Lee MA (2009) Differential scanning fluorimetry as secondary screening platform for small molecule inhibitors of Bcl-XL. *Cell cycle* **8**: 3943-3952
- Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of molecular graphics & modelling* **25**: 247-260
- Wang X, Minasov G, Blazquez J, Caselli E, Prati F, Shoichet BK (2003) Recognition and resistance in TEM beta-lactamase. *Biochemistry* **42**: 8434-8444
- Wang X, Minasov G, Shoichet BK (2002) Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. *Journal of molecular biology* **320**: 85-95
- Wang X, Minasov G, Shoichet BK (2002) The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *The Journal of biological chemistry* **277**: 32149-32156
- Waxman DJ, Yocum RR, Strominger JL (1980) Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **289**: 257-271
- Weigel BJ, Burgett SG, Chen VJ, Skatrud PL, Frolik CA, Queener SW, Ingolia TD (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology* **170**: 3817-3826
- Weiss WJ, Petersen PJ, Murphy TM, Tardio L, Yang Y, Bradford PA, Venkatesan AM, Abe T, Isoda T, Mihira A, Ushiroguchi H, Takasake T, Projan S, O'Connell J, Mansour TS (2004) In vitro and in vivo activities of novel 6-methylidene penems as beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 4589-4596
- Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W, Thomas CM, Williams AP (2013) The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases* **13**: 155-165

Wietzerbin J, Das BC, Petit JF, Lederer E, Leyh-Bouille M, Ghuysen JM (1974) Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of Mycobacteria. *Biochemistry* **13**: 3471-3476

Wilmoth-Lerner B., Lerner L K (2006) "Robert Koch." World of Microbiology and Immunology. Detroit: Gale

Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM (2004) Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 4793-4799

Wright AJ, Wilkowske CJ (1987) The penicillins. *Mayo Clinic proceedings* **62**: 806-820

Wu TL, Chia JH, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Ma L, Siu LK (2007) CMY-2 beta-lactamase-carrying community-acquired urinary tract *Escherichia coli*: genetic correlation with *Salmonella enterica* serotypes Choleraesuis and Typhimurium. *International journal of antimicrobial agents* **29**: 410-416

Wyckoff TJ, Taylor JA, Salama NR (2012) Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases. *Trends in microbiology* **20**: 540-547

Yamana T, Tsuji A (1976) Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanisms of degradation. *Journal of pharmaceutical sciences* **65**: 1563-1574

Yang Y, Bhachech N, Bush K (1995) Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **35**: 75-84

Yang Y, Janota K, Tabei K, Huang N, Siegel MM, Lin YI, Rasmussen BA, Shlaes DM (2000) Mechanism of inhibition of the class A beta-lactamases PC1 and TEM-1 by tazobactam. Observation of reaction products by electrospray ionization mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* **275**: 26674-26682

Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC (2003) Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 3881-3889

Yoshida T, Matsuura S, Mayama M, Kameda Y, Kuwahara S (1980) Moxalactam (6059-S), a novel 1-oxa-beta-lactam with an expanded antibacterial spectrum: laboratory evaluation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **17**: 302-312

Young KD (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **70**: 660-703

Zafarella G, Mobashery S (1992) Facilitation of the $\Delta 2 \rightarrow \Delta 1$ pyrroline tautomerization of carbapenem antibiotics by the highly conserved arginine-244 of class A β -lactamases during the course of turnover. *Journal of the American Chemical Society* **114(4)**: 1505-1506.

Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF (2001) A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* **291**: 1962-1965

Zhang W, Shi Q, Meroueh SO, Vakulenko SB, Mobashery S (2007) Catalytic mechanism of penicillin-binding protein 5 of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **46**: 10113-10121

Zhang X, Lou D, Xu Y, Shang Y, Li D, Huang X, Li Y, Hu L, Wang L, Yu F (2013) First identification of coexistence of blaNDM-1 and blaCMY-42 among *Escherichia coli* ST167 clinical isolates. *BMC microbiology* **13**: 282

Zhang Z, Yu Y, Musser JM, Palzkill T (2001) Amino acid sequence determinants of extended spectrum cephalosporin hydrolysis by the class C P99 beta-lactamase. *The Journal of biological chemistry* **276**: 46568-46574

Zioga A, Whichard JM, Kotsakis SD, Tzouveleki LS, Tzelepi E, Miriagou V (2009) CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 1256-1259

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν τους περισσότερο επιτυχημένους αντιμικροβιακούς παράγοντες με την χρήση τους να είναι ευρεία τόσο σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα αλλά και για την καταπολέμηση λοιμώξεων της κοινότητας. Η αντοχή στα β-λακταμικά διαμεσολαβείται από ποικίλους μηχανισμούς οι οποίοι για τα Gram αρνητικά βακτήρια και ιδιαίτερα για αυτά της οικογένειας των Εντεροβακτηρίων αφορούν ενζυμική απενεργοποίηση του αντιβιοτικού μέσω υδρόλυσης που καταλύεται από τις β-λακταμάσες. Οι β-λακταμάσες σερίνης που ανήκουν στη μοριακή τάξη A συνιστούν σημαντική παράμετρο του προβλήματος καθώς αντιπρόσωποι αυτών διαθέτουν την ικανότητα για υδρόλυση νεότερων κεφαλοσπορινών (εκτεταμένου φάσματος ή οξυίμινο κεφαλοσπορίνες) και καρβαπενεμών [Εκτεταμένου Φάσματος β-Λακταμάσες (ΕΦΒΛ) και τάξης A καρβαπενεμάσες αντίστοιχα] ενώ μέσω μεταλλάξεων ένζυμα της κατηγορίας που δεν υδρολύουν τα παραπάνω αντιβιοτικά μπορούν να διευρύνουν το φάσμα προς αυτά συσσωρεύοντας μεταλλάξεις. Διεύρυνση φάσματος προς την υδρόλυση οξυίμινο κεφαλοσπορινών μέσω μεταλλάξεων παρουσιάζουν και οι β-λακταμάσες τάξης C οι οποίες αποτελούν επίσης κλινικά σημαντικά ένζυμα. Η γνώση των μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται διεύρυνση του φάσματος υποστρωμάτων στις κλινικά σημαντικές β-λακταμάσες θα αποκαλύψει πιθανούς τρόπους αναστολής ή παράκαμψης της δράσης τους μέσω απενεργοποιητικών μορίων ή β-λακταμικών που δε θα υδρολύονται από αυτές. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι β-λακταμάσες τάξης C τύπου CMY-2 (πλασμιδιακά ένζυμα με ευρεία εξάπλωση) αποκτούν την ικανότητα υδρόλυσης οξυίμινο κεφαλοσπορινών καθώς και αυτών που διέπουν την ικανότητα των ενζύμων τάξης A τύπου GES να ενισχύουν τον χαρακτήρα εκτεταμένου φάσματος και καρβαπενεμάσης μέσω φυσικών μεταλλάξεων με μελέτες δομής-λειτουργίας.

Αρχικά εξετάστηκαν οι καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου CMY-30 το οποίο απομονώθηκε το 2008 στη Νέα Ζηλανδία και είχε προκύψει από την CMY-2 μέσω της Val211Gly υποκατάστασης. Προσδιορισμός των φαινοτύπων ευαισθησίας βακτηριακών στελεχών *E. coli* που παρήγαγαν τις CMY-2 και CMY-30 υπό ισογονικές συνθήκες και των καταλυτικών σταθερών των ενζύμων κατά την υδρόλυση β-λακταμικών έδειξε ότι η

υποκατάσταση Val211Gly οδηγεί σε αυξημένη υδρόλυση κεφταζιμίμης και κεφταζιδίμης. Ανιχνεύθηκε και ενεργότητα υδρόλυσης αζτρεονάμης η οποία φέρει την οξυίμινο πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης. Χαρακτηρισμός της CMY-42, ενός ενζύμου που απομονώθηκε στην Γερμανία το 2010 και είχε προκύψει από τη CMY-2 μέσω της Val211Ser υποκατάστασης, έδειξε ότι και σε αυτήν την περίπτωση προκαλείται διεύρυνση φάσματος. Προσδιορισμός της συγγένειας του ενεργού κέντρου των τριών ενζύμων με τις οξυίμινο πλευρικές αλυσίδες των παραπάνω β-λακταμικών εκτιμώντας τις σταθερές αναστολής που εμφανίζουν βορονικά οξέα που φέρουν τις δομές αυτές κατά την αλληληπίδρασή τους με τις CMY έδειξε ότι το εκτεταμένο φάσμα συνοδεύονταν από μείωση της ισχύος δέσμησης. Μέτρηση της σταθερότητας των ενζύμων με πειράματα θερμικής αποδιάταξης έδειξε ότι οι CMY-30 και CMY-42 χαρακτηρίζονταν από υψηλότερη αστάθεια τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και συμπλοκοποιημένες με οξυίμινο β-λακταμικά και βορονικά οξέα σε σύγκριση με τη CMY-2. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ελευθέρων ενζύμων, ακύλ-ενζύμων κεφταζιδίμης και ομοιοπολικών συμπλόκων με βορονικό οξύ που έφερε την πλευρική αλυσίδα αυτής (ανάλογο κατάστασης μετάπτωσης απαकुλίωσης) έδειξαν ότι τα ένζυμα με ιδιότητες εκτεταμένου φάσματος χαρακτηρίζονταν από αυξημένη ευελιξία στη θηλειά Ω όπου απαντά η μετάλλαξη και στην H7 α-έλικα. Το παραπάνω οφείλονταν στους υψηλούς βαθμούς ελευθερίας της πλευρικής αλυσίδας της Tyr221 η οποία στην CMY-2 σχηματίζει μία επιφάνεια με την πλευρική αλυσίδα της Val211 στην περιοχή δέσμησης των R1 πλευρικών αλυσίδων των οξυίμινο μορίων που δεν επέτρεπε την κίνησή τους. Η δυναμική του ενζύμου είχε τροποποιηθεί και σε άλλες δομές που εντοπίζονται στην περιφέρεια του ενεργού κέντρου (θηλειά 120 και H10 έλικα/R2 θηλειά) οι οποίες παρουσίαζαν συζευγμένες κινήσεις με τη θηλειά Ω και την H7 έλικα. Οι κινήσεις αυτές οδηγούσαν σε αυξημένες δονήσεις τόσο της κεφταζιδίμης όσο και του βορονικού αναλόγου αυτής στο ενεργό κέντρο των ενζύμων εκτεταμένου φάσματος. Τα παραπάνω είχαν ως αποτέλεσμα i) η κεφταζιδίμη και το ενεργό κέντρο των ακύλ-ενζύμων των CMY-30 και CMY-42 να αποκτούν πιο συχνά διαμορφώσεις που ομοιάζαν δομικά με το σύμπλοκο του βορονικού οξέος (κατάσταση μετάπτωσης απαकुλίωσης) και ii) την ανεμπόδιστη πρόσβαση μορίων νερού στην β-επιφάνεια του εστερικού δεσμού. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ταχύτερη υδρόλυση οξυίμινο υποστρωμάτων

από τις ποικιλίες Gly211 και Ser211 οφείλεται στην αύξηση της συχνότητας εμφάνισης διαμορφώσεων που επιτρέπουν τη δημιουργία των ριζών απακυλίωσης και άρα στην αποδοτικότερη κατάρρευση του ακύλ-ενζύμου το οποίο αποτελεί περιοριστικό στάδιο της αντίδρασης.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης διερευνήθηκαν οι σχέσεις δομής και λειτουργίας των φυσικών ενζύμων GES που διαφοροποιούνται στις αμινοξικές θέσεις 104 και 170 ήτοι GES-1 (Glu104, Gly170), GES-2 (Glu104, Asn170), GES-5 (Glu104, Ser170), GES-6 (Lys104, Ser170), GES-7 (Lys104, Gly170) και GES-13 (Lys104, Asn170). Παραγωγή των ενζύμων από εργαστηριακά στελέχη *E. coli* υπό ισογονικές συνθήκες επέτρεψε την εκτίμηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που οφείλονται στην δράση του κάθε ενζύμου ενώ μέσω προσδιορισμού των κινητικών σταθερών υδρόλυσης χαρακτηρίστηκαν οι καταλυτικές τους ιδιότητες. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των θέσεων 104 και 170 αποκάλυψε τα εξής: i) ασπαραγίνη στη θέση 170 οδηγούσε σε μειωμένη υδρόλυση πενικιλινών και κεφαλοσπορινών πρώτης γενιάς, ii) ασπαραγίνη ή σερίνη στη θέση 170 προκαλούσε μείωση της υδρόλυσης κεφταζιδίμης ενώ η υδρόλυση κεφοταξίμης επηρεάζονταν μόνο από την σερίνη, iii) η παρουσία των δύο παραπάνω καταλοίπων οδηγούσε σε αύξηση της υδρόλυσης ιμιπενέμης με τις ποικιλίες Ser170 να αποτελούν τις πλέον αποδοτικές καρβαπενεμάσες, το οποίο πιθανότατα οφειλόταν σε αύξηση τόσο της ταχύτητας ακυλίωσης όσο και της απακυλίωσης, iv) τα ένζυμα αυτά (GES-5 και GES-6) υδρόλυαν επίσης και την κεφοξιτίνη που φέρει 7-α-μέθοξυ υποκατάσταση η οποία είναι ανάλογη με την 6-α-ύδροξυ-αιθύλ ομάδα της ιμιπενέμης, v) αντικατάσταση του αρνητικού καταλοίπου Glu104 με τη θετική λυσίνη προκαλούσε διεύρυνση του φάσματος προς την υδρόλυση οξυμινο υποστρωμάτων με τη μέγιστη επίδραση να προκαλείται παρουσία Gly170 και Asn170. Η αύξηση της καταλυτικής απόδοσης οφείλονταν τόσο σε αύξηση της συγγένειας όσο και σε αύξηση των ταχυτήτων ακυλίωσης και απακυλίωσης, vi) η Glu104Lys υποκατάσταση προκαλούσε επίσης μείωση της ενεργότητας καρβαπενεμάσης. Οι δομικές ιδιότητες των ενζύμων διερευνήθηκαν με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής όπου αποκαλύφθηκε ότι τα ένζυμα με σερίνη ή ασπαραγίνη στη θέση 170 προκαλούσαν σταθεροποίηση στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων της καταλυτικής μηχανής του ενεργού κέντρου μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με το Glu166. Τα ένζυμα με Ser170 χαρακτηρίζονταν από τις

περισσότερο ισχυρές αλληλεπιδράσεις. Η κύρια επίδραση της μετάλλαξης Glu104Lys στις προσομοιώσεις ελευθέρων ενζύμων αφορούσε μετατόπιση της τρυπτοφάνης στη θέση 105 προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου. Ερμηνεύοντας τα παραπάνω υπό το πρίσμα των λειτουργικών ιδιοτήτων των ενζύμων προέκυψε ότι η ισχυροποίηση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των καταλυτικών αμινοξέων έχει θετική επίδραση στην ταχύτητα υδρόλυσης ιμιπενέμης, πιθανώς λόγω αύξησης της ταχύτητας ακυλίωσης ενώ μετατόπιση της Trp105 προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου δρά αρνητικά. Προσομοιώσεις συμπλόκων των ενζύμων με την κεφοξιτίνη έδειξαν ότι η σερίνη στη θέση 170 επάγει επίσης την ανεμπόδιστη προσέγγιση του καταλυτικού νερού στην α-επιφάνεια του εστερικού δεσμού στα αντίστοιχα ακύλ-ένζυμα αντίθετα με τις ποικιλίες GES όπου το αντίστοιχο κατάλοιπο είναι γλυκίνη ή ασπαραγίνη. Δομική ανάλυση των συμπλόκων με βορονικό οξύ που φέρει την πλευρική αλυσίδα της κεφταζιδίμης έδειξε ότι λυσίνη στη θέση 104 θα μπορούσε να αυξάνει την συγγένεια για τις αρνητικά φορτισμένες R1 πλευρικές αλυσίδες. Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της μετάλλαξης στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων ενδέχεται να οφείλεται σε επιπλέον φαινόμενα. Αυτό έδειξε περαιτέρω χαρακτηρισμός της θέσης 104 με πειράματα μεταλλαξογένεσης όπου από τον προσδιορισμό των MIC που εμφάνιζαν β-λακταμικά κατά την αναστολή στελεχών *E. coli* που παρήγαγαν τους εργαστηριακούς μεταλλάκτες GES προέκυψε ότι διεύρυνση του φάσματος προς την υδρόλυση οξυμίμο υποστρωμάτων προκαλείται επίσης και από μη-πολικά κατάλοιπα (π.χ. προλίνη).

SUMMARY

β -Lactams are highly successful antimicrobial agents with their use being extensive for the treatment of nosocomial and community acquired infections. Resistance to β -lactams is due to various mechanisms which for the Gram negative bacteria and especially those of the family of *Enterobacteriaceae* concern mainly enzymatic inactivation of the drug through hydrolysis by β -lactamases. Serine reactive β -lactamases of molecular class A consist and important parameter of the problem as enzymes of this group possess the ability to hydrolyze newer cephalosporins (i.e. expanded-spectrum or oxyimino cephalosporins) and carbapenems (Extended Spectrum beta-Lactamases, ESBLs and class A carbapenemases respectively). The various enzymes of this group that cannot hydrolyze the above drugs can extend their spectrum towards them through acquisition of mutations. Class C β -lactamases, enzymes with high clinical importance, can also extend their substrate spectrum towards hydrolysis of oxyimino cephalosporins. Deciphering the exact mechanisms through which the clinically important beta-lactamases extend their substrate spectrum could reveal likely ways of inactivation and circumvention of their function by novel inhibitory compounds and beta-lactams. In the current study the mechanisms that cause substrate expansion of class C beta-lactamases of the CMY-2 type (plasmidic enzymes with wide dissemination) and those that lead to enhancement of the extended spectrum and carbapenemase character of the class A beta-lactamases of the GES type were assessed through structure function studies.

The catalytic properties of the novel Val211Gly variant of CMY-2, named CMY-30 and discovered in 2008 in New Zealand, were initially assessed. Resistance phenotypes of laboratory *E. coli* strains that produced CMY-2 and CMY-30 under isogenic conditions as well as determination of catalytic constants during hydrolysis of beta-lactams showed that the Val211Gly substitution caused increased hydrolysis rates of cefotaxime and ceftazidime. Activity against aztreonam, a monobactam that is substituted by the side chain of ceftazidime, was also increased in CMY-30. Biochemical and phenotypic characterization of CMY-42, an enzyme that was isolated in Germany in 2010 and carried a serine residue at 211, revealed that substrate expansion is also induced by the Val211Ser substitution. Examining the affinity exhibited by the active site of the three

enzymes against the oxyimino side chains of beta-lactams by determining inhibition constants of boronic acids substituted by the above structures showed that substrate expansion is correlated with reduction in binding strength. Thermal denaturation experiments enabled the assessment of the enzyme stability that was reduced for CMY-30 and CMY-42 compared to CMY-2. The above was evident in free enzymes as well as in complexes with oxyimino beta-lactams and boronic acids. Molecular dynamics simulations of free enzymes, ceftazidime acyl-enzymes and complexes with the boronic acid analogue of ceftazidime (deacylation transition state analogue) showed that the extended spectrum enzymes were characterized by increased flexibility in the Ω loop (where the mutated residue is located) and in the H7 α -helix. The above was the result of the higher degrees of freedom of the side chain of Tyr221 that in CMY-2 was forming a surface with that of Val211 in the R1 binding cleft constraining their movement. Enzyme dynamics were also affected in other structures located in the periphery of the active site (120-loop and H10 helix/R2-loop) that underwent correlated movements with the Ω -loop and the H7 α -helix. The above motions caused increased vibrations of ceftazidime and its boronic acid analogue in the active site of the extended spectrum enzymes. The above resulted in i) the active site of CMY-30 and CMY-42 and ceftazidime in the respective acyl-enzymes to adapt conformations that were more structurally similar with the boronate-enzyme complexes (deacylation transition state) and ii) the unobstructed approach of hydrolytic water into the β -face of the esteric bond. These results suggested that the faster hydrolysis of oxyimino substrates by Gly211 and Ser211 variants is due to the higher frequency of adapted conformations that permit the formation of deacylation high energy species and hence the more efficient collapse of the acyl-enzyme that is the rate limiting step of the reaction.

In the second part of the study structure-function relationships of natural GES enzymes differed in positions 104 and 170 [i.e. GES-1 (Glu104, Gly170), GES-2 (Glu104, Asn170), GES-5 (Glu104, Ser170), GES-6 (Lys104, Ser170), GES-7 (Lys104, Gly170) και GES-13 (Lys104, Asn170)] were assessed. Production of the enzymes by *E. coli* laboratory strains under isogenic conditions enabled the assessment of the phenotypic characteristics caused by the action of each enzyme while through the determination of kinetic hydrolysis constants their catalytic properties were revealed. The functional

characterization of positions 104 and 170 revealed the following: i) asparagine in position 170 caused reduced hydrolysis of penicillins and first generation cephalosporins, ii) asparagine or serine in position 170 negatively affected hydrolysis of ceftazidime while that of cefotaxime was reduced only by Ser170, iii) the above amino acids increased hydrolysis of imipenem with Ser170 variants to be the more effective carbapenemases probably due to higher acylation and deacylation rates, iv) these enzymes (GES-5 and GES-6) exhibited hydrolysis of cefoxitin that is substituted at C7 with an α -methoxy group that is analogous with the 6- α -hydro-ethyl substitution of imipenem, v) substitution of the negatively charged residue Glu104 with the positive lysine extend the spectrum towards oxyimino beta-lactams with a marked increase being observed in the presence of Gly170 or Asn170. The above was probably resulted from higher affinity in conjunction with higher acylation and deacylation rates, vi) the Glu104Lys substitution caused a reduction in carbapenemase activity of GES enzymes. The structural properties of the GES variants were examined by molecular dynamics simulations where it was shown that serine or asparagine in position 170 stabilize the interactions of residues forming the active site catalytic apparatus, through their interactions with Glu166. The Ser170 variants exhibited the most potent interactions between the catalytic amino acids. The main effect of the Glu104Lys substitution was a movement of tryptophane 105 towards the interior of the active site. The above, interpreted under the functional properties of the enzymes, suggested that the strength of the interactions between catalytic residues is correlated with higher acylation rates by imipenem while movement of Trp105 into the active site cavity has a negative effect on hydrolysis of this compound. Simulations of enzyme complexes with cefoxitin showed that serine in 170 could permit the unobstructed approach of the hydrolytic water in the α -face of the esteric bond in the respective acyl-enzymes in contrast to Gly170 and Asn170 GES variants. Structural analysis of the boronate-enzyme complexes showed that lysine in position 104 could increase the affinity for the negatively charged R1 side chains. Nevertheless, the effects of the substitution in the catalytic properties of GES enzymes could resulted from additional phenomena. To this end pointed further mutagenic experiments in position 104 where beta-lactams MIC against *E. coli* clones producing the laboratory mutants of GES

showed that substrate expansion towards hydrolysis of oxyimino compounds could also be caused by non-polar residues (proline).