



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΛΛΟ-β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ (VIM-12)
ΑΠΟ *Klebsiella Pneumoniae***

ΙΟΥΛΙΑΝΑ ΚΡΙΣΤΟ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

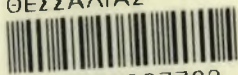
ΛΑΡΙΣΑ 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5016/1
Ημερ. Εισ.: 10-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΚΡΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087763

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε
στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Πουρνάρας Σπυρίδωνας, Λέκτορας Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Πουρνάρας Σπυρίδωνας, Λέκτορας Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- ❖ Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1.1. Γονιδιακές Μεταλλάξεις.....	6
1.1.2. Απόκτηση γονιδίων αντοχής.....	7
1.1.3. Μετάλλαξη επίκτητων γονιδίων.....	8
1.2. Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής.....	9
1.3. β-Λακταμικά αντιβιοτικά.....	10
1.4. β-Λακταμάσες και η ταξινόμησή τους.....	15
1.4.1. β-Λακταμάσες τάξης B (Μεταλλοβ-λακταμάσες).....	16
1.4.2. Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM.....	20
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	22
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	26
3.1.1. Αντιδραστήρια.....	26
3.1.2. Ένζυμα.....	28
3.1.3. Βακτηριακά κύτταρα.....	28
3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς.....	29
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
3.2.1. Μέθοδοι απομόνωσης, μεταφοράς και επεξεργασίας νουκλεϊκών οξέων.....	32
3.2.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
3.2.1.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR).....	32
3.2.1.3. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αγαρόζη.....	34
3.2.1.4. Εκχύλιση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	35
3.2.1.5. Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation).....	36
3.2.1.6. Μετασχηματισμός χημικά επιδεκτικών κυττάρων DH5α.....	36
3.2.1.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	37
3.2.1.8. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού.....	37
3.2.1.9. Σύνδεση του γονιδίου VIM 12 με τον πλασμιδιακό φορέα pET15b.....	38
3.2.1.10. Μετασχηματισμός κυττάρων BL21.....	38
3.2.2. Υπερέκφραση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης.....	39
3.2.3. Καθαρισμός της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης.....	39
3.2.3.1. Ομογενοποίηση των κυττάρων.....	40
3.2.3.2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας κάτω από φυσικές συνθήκες.....	41
3.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.....	42
3.2.5. Ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με την τεχνική ανοσοαπόπτωσης (Western blotting).....	45

3.2.6.	Βιοχημικός χαρακτηρισμός της μεταλλοβ-λακταμάσης VIM-12.....	48
3.2.6.1	Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου: pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση δισθενών μεταλλικών ιόντων και άλατος.....	48
3.2.7.	Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της VIM-12.....	48
3.2.8.	Επίδραση αναστολέων στην δράση της VIM12	50
3.2.9.	Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής για κάθε αναστολέα.....	50
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4.1.	Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου VIM12	51
4.2.	Υπερέκφραση, καθαρισμός και ανίχνευση της VIM12 μεταλλο-β- λακταμάσης.....	54
4.3	Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης της VIM12	56
4.4.	Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της μεταλλοβ-λακταμάσης VIM-12.....	58
4.5	Επίδραση αναστολέων στην δράση της VIM-12 και ο υπολογισμός.....	61
	της σταθεράς αναστολής.....	61
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι β-λακταμάσες είναι μία ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών με δομικές ομοιότητες οι οποίες αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά υδρολύοντας το δεσμό C-N. Η παραγωγή τους είναι ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς βακτηριακής αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Παρόλο που τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταλλοβ-λακταμάσες δείχνουν μία πολύ μικρή ομοιότητα στην πρωτογενή δομική αλληλουχία τους οι τρισδιάστατες δομές των γνωστών μεταλλοβ-λακταμασών είναι παρόμοιες και παρουσιάζουν επίσης παρόμοιες κινητικές ιδιότητες. Οι μεταλλοβ-λακταμάσες αποτελούν μία κατηγορία β-λακταμασών που χρειάζονται ιόντα ψευδαργύρου για τη δράση τους. Οι μεταλλοβ-λακταμάσες που κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε γενετικά μεταθετά στοιχεία, όπως αυτά τύπου VIM, αποτελούν μία σημαντική κλινική απειλή, καθώς τα γονίδια αυτά έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων, ακόμη και διαφορετικού γένους. Η ανησυχία για την εμφάνιση των επίκτητων αυτών μεταλλοβ-λακταμασών σε κλινικά στελέχη σημαντικών Gram-αρνητικών παθογόνων, όπως μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas aeruginosa*, προκύπτει από το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να υδρολύουν, συμπεριλαμβάνοντας τις καρβαπενέμες όπως και την αντίστασή τους στους αναστολείς β-λακταμασών. Στην εργασία αυτή ασχοληθήκαμε με την κλωνοποίηση, τον καθαρισμό και το βιοχημικό χαρακτηρισμό μίας καινούργιας μεταλλοβ-λακταμάσης, της VIM-12, που μοιάζει να έχει προκύψει από ανασυνδυασμό ανάμεσα στα γονίδια *bla*_{VIM-1} και *bla*_{VIM-2}. Η μελέτη αυτή έδειξε κάποιες διαφορές στις κινητικές παραμέτρους του ενζύμου σε σύγκριση με τις VIM-1 και VIM-2 μεταλλοβ-λακταμάσες.

ABSTRACT

β -Lactamases are a heterogeneous group of proteins with structural similarities which inactivate β -lactams antibiotics by disrupting the β -lactam bond C- N. Production of these enzymes is the most common mechanism of bacterial resistance to β -lactams antibiotics. Despite their low sequence homology, the overall folds of these enzymes are very similar and they exhibit similar kinetics characteristics. Metallo- β -lactamases represent a class of β -lactamases that require zinc for their activity. Metallo- β -lactamases that are encoded by genes located in transferable genetic elements, such as VIM metallo- β -lactamases, are a clinical threat because of their ability to be transferred among bacteria, even of different genera. The emerging concern about the acquired metallo- β -lactamases in clinical isolates of major Gram-negative pathogens, such as members of the family *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*, is based on from the broad spectrum of substrates that these enzymes can hydrolyze, including carbapenems, and their resistance to β -lactamase inhibitors. In this work we present the cloning, purification and biochemical characterization of a new VIM-12 metallo- β -lactamase (VIM-12), which appears to be a hybrid of *bla*_{VIM-1} and *bla*_{VIM-2} genes. The biochemical study of the new enzyme showed differences in its kinetics parameters of VIM12 compared to those of VIM-1 and VIM-2 metallo- β -lactamases.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι ένα καθημερινό κλινικό πρόβλημα, με ιδιαίτερα σημαντικές επιπτώσεις στους νοσοκομειακούς ασθενείς.

Τα αντιβακτηριακά φάρμακα έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Η υπερβολική όμως χρήση τους έχει συμβάλλει σημαντικά στην επιδείνωση του διεθνούς προβλήματος της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά.

Έτσι, σε ένα περιβάλλον όπου χρησιμοποιούνται ισχυροί αντιμικροβιακοί παράγοντες, η αντοχή που παρουσιάζουν τα βακτήρια στα αντιβιοτικά δεν είναι ούτε καινούργιο φαινόμενο ούτε απροσδόκητο. Η βολογική ποικιλομορφία των μικροβίων και οι σχετικά ειδικές δράσεις των αντιμικροβιακών παραγόντων επίσης συμβάλλουν στην εκτεταμένη αντοχή των βακτηρίων.

1.1. Γενετική βάση της αντιμικροβιακής αντοχής

Η αντίσταση στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι συγγεής ή επίκτητη. Η συγγεής αντοχή είναι ενδογενής και βασίζεται στο μηχανισμό δράσης του φαρμάκου. Η επίκτητη αντοχή προκύπτει από βιοχημικές διαδικασίες που κωδικοποιούνται από βακτηριακά γονίδια.

Η αντιμικροβιακή αντοχή μπορεί να προκύψει από:

1.1.1. Γονιδιακές Μεταλλάξεις

Όλα τα αντιβιοτικά έχουν στόχους που συχνά είναι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα βακτηριακά γονίδια και έχουν λειτουργική σημασία για την κυτταρική ανάπτυξη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιβιοτικών και πρωτεϊνών στόχων είναι συχνά πολύ ειδικές. Έτσι, η αλλαγή ενός μοναδικού αμινοξέος, ως αποτέλεσμα αλλαγής μιας βάσεως στο γονίδιο, μπορεί μερικές φορές να μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις αυτές. Μεταλλάξεις που

επιφέρουν αντοχή μπορούν να βρεθούν επίσης και σε γονίδια που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες.

1.1.2. Απόκτηση γονιδίων αντοχής

Οι περισσότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι φυσικά προϊόντα ή ημισυνθετικά παράγωγα φυσικών προϊόντων. Έτσι, γονίδια αντοχής για τα περισσότερα αντιβιοτικά συχνά υπάρχουν στο μικροβιακό κόσμο, είτε στα είδη που παράγουν αντιβιοτικά, είτε στα είδη που ζουν στο ίδιο οικολογικό περιβάλλον με αυτά. Η πρόκληση για τα ευαίσθητα παθογόνα είναι να βρουν και να αποκτήσουν τα ανθεκτικά στοιχεία. Για τον σκοπό αυτό τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μία σειρά από τεχνικές που προάγουν την γονιδιακή ανταλλαγή. Η πιο απλή από αυτές είναι η φυσική μεταμόρφωση (transformation) που αναφέρεται στην ικανότητα κάποιων βακτηριακών ειδών να προσλαμβάνουν τμήματα DNA από το περιβάλλον κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Τα τμήματα αυτά DNA ενσωματώνονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Σε μερικές περιπτώσεις από αυτόν τον ανασυνδυασμό προκύπτουν λειτουργικά γονίδια.

Ένας άλλος μηχανισμός, που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια για την απόκτηση ξένων γονιδίων αντοχής, είναι η βακτηριακή σύζευξη, με μεταφορά συζευκτικών πλασμιδίων. Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικό αντιγραφόμενο DNA και μπορούν να κωδικοποιούν μία μεγάλη ποικιλία σημαντικών γονιδίων. Κάποια πλασμίδια έχουν ένα στενό φάσμα ξενιστών ενώ άλλα μεταφέρονται και αντιγράφονται σε διάφορα είδη. Η συχνότητα μεταφοράς μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, όπως στην περίπτωση του παράγοντα F του *E.coli* ή πλασμιδίων υπεύθυνων για φερομόνες. Τα πλασμίδια μπορούν να ενσωματώνονται και στο χρωμόσωμα αυξάνοντας έτσι την σταθερότητα της γενετικής πληροφορίας που μεταφέρουν.

Τα βακτήρια επωφελούνται επίσης, από τους βακτηριοφάγους για γενετική ανταλλαγή. Οι βακτηριοφάγοι παρέχουν στα μη μολυσμένα κύτταρα μία ποσότητα DNA που πλησιάζει το μέγεθος του γενόματός τους (~4kb). Κατά τη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων των φάγων, μερικές φορές, μαζί με το ιϊκό DNA παγιδεύονται και

κομμάτια χρωμοσωμικού DNA που γειτονεύουν με τη θέση ενσωμάτωσης του ιού στο χρωμόσωμα ή άλλες φορές περιλαμβάνεται ένα πλασμίδιο κατάλληλου μεγέθους ή ένα τμήμα χρωμοσωμικού DNA μη σχετικό με το ενσωματωμένο γένωμα του φάγου. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μεταγωγή (transduction).

Επίσης, τα μεταθετά στοιχεία έχουν ενοχοποιηθεί για την μεταφορά γονιδίων αντοχής. Τα μεταθετά στοιχεία κωδικοποιούν την ικαύτητά τους για μεταφορά. Σε μερικές περιπτώσεις, τα μεταθετά στοιχεία κωδικοποιούν και συζευκτικές λειτουργίες που τους επιτρέπουν να μεταφέρονται από βακτηριακό χρωμόσωμα σε βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα μεταθετά στοιχεία που στερούνται συζευκτικών λειτουργιών μπορούν επίσης, να μεταφέρονται μεταξύ στελεχών. Ο πιο κοινός μηχανισμός με τον οποίο το επιτυγχάνουν αυτό είναι η παροδική ή και πιο μόνιμη ενσωμάτωσή τους σε μεταφερόμενα πλασμίδια.

1.1.3. Μετάλλαξη επίκτητων γονιδίων

Τα βακτήρια απαντάνε στην πρόκληση αντιμικροβιακών παραγόντων αναπτύσσοντας διάφορους μηχανισμούς αντοχής. Αυτό έχει σαν επακόλουθο την ανάπτυξη καινούργιων αντιμικροβιακών παραγόντων που είναι δραστηριοί ενάντια στα ανθεκτικά στελέχη. Η αντοχή στα αντιβιοτικά που οφείλεται στις βλακταμάσες αποτελεί ένα διδακτικό παράδειγμα στην αλληλεπίδραση αυτή. Η αμπικιλίνη αναπτύχθηκε ως η πρώτη πενικιλίνη με σημαντική κλινική δράση ενάντια στους Gram αρνητικούς βακίλους. Μέσα σε λίγα χρόνια από την κλινική χρήση της αμπικιλίνης αναφέρθηκαν στελέχη *E. coli* ανθεκτικά σ' αυτό το αντιβιοτικό ως αποτέλεσμα παραγωγής μιας πλασμιδιακής βλακταμάσης, ονομαζόμενης TEM. Ο *S. aureus* έκφραζε επίσης, μία παρόμοια βλακταμάση ωθώντας έτσι τη φαρμακευτική βιομηχανία για την ανάπτυξη βλακταμικών αντιβιοτικών ανθεκτικών στην υδρόλυση. Από τις πιο πετυχημένες ενώσεις ήταν η μεθικιλίνη, οι κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες, με ευρεία δράση ενάντια πολλών ειδών που παράγουν βλακταμάσες, όπως και οι αναστολείς βλακταμασών που αποκαθιστούν τη δράση βλακταμικών ευαίσθητων στην υδρόλυση. Τέτοιοι αναστολείς είναι το κλαβουλανικό οξύ, η σουλβακτάμη και η ταζοβακτάμη. Οι κεφαλοσπορίνες

αποτελούν την πιο πετυχημένη και ευρεία αναπτυγμένη κατηγορία. Δυστυχώς όμως, η αυξημένη κλινική τους χρήση σχετίζεται με την εμφάνιση αθεκτικών Gram αρνητικών βακίλων, ειδικά *K. pneumoniae*. Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι στα ανθεκτικά αυτά στελέχη η αντοχή οφείλεται σε βλακταμάσες οι περισσότερες από τις οποίες είναι παράγωγα της αρχικής TEM λακταμάσης που έχουν προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις.

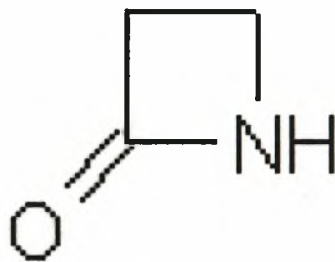
1.2. Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής

Οι τρεις κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής είναι οι ακόλουθοι:

- ❖ Μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε αλλαγές της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών μικροβίων.
- ❖ Μετατροπή του στόχου δράσης, όπου μία απλή μετάλλαξη στο σημείο που φυσιολογικά προσδένεται το αντιβιοτικό μπορεί να είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή στο φάρμακο.
- ❖ Παραγωγή βακτηριακών ενζύμων που μεταβάλλουν την δομή του αντιβιοτικού. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι μη υδρολυτικά (ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες) ή υδρολυτικά όπως στην περίπτωση των βλακταμασών που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

1.3. β-Λακταμικά αντιβιοτικά

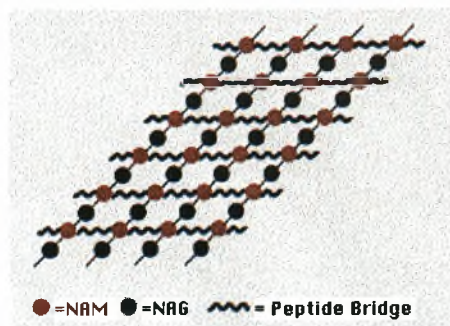
Οι β-λακτάμες είναι μία κατηγορία αντιβιοτικών που διαθέτουν ένα τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο (Εικόνα 1) και αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.



Εικόνα 1. β-λακταμικός δακτύλιος.

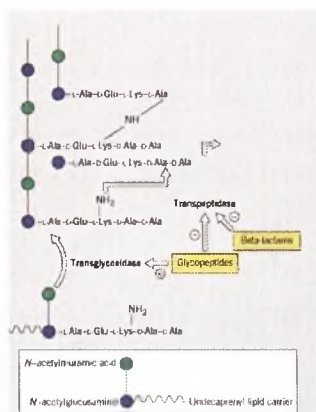
Τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων αποτελούνται από μία σύνθετη πολυμερή ουσία, την πεπτιδογλυκάνη, η οποία περιέχει αμινοξέα και μινোসάκχαρα (Εικόνα 2). Τα αμινοσάκχαρα είναι δύο ειδών:

- N-ακετυλογλυκοσαμίνη (NAG)
- N-ακετυλομουραμικό οξύ (NAM)



Εικόνα 2. Βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα.

Τα αμινοξέα και τα αμινοσάκχαρα συνδέονται εναλλακτικά με γλυκοσιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας ένα γραμμικό πολυμερές. Τα γραμμικά αυτά μόρια ενώνονται μεταξύ τους με πλευρικές αλυσίδες 45 αμινοξέων, οι οποίες προσάπτονται σε κάθε NAM. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεσμεύονται και αναστέλλουν ένζυμα που χρειάζονται για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, κυρίως τη τρανσπεπτιδάση, αναστέλλοντας έτσι τις σταυροσυνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσέων του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιβιοτικών.

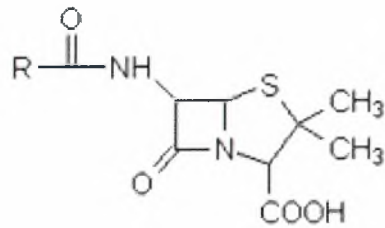
Οι β-λακτάμες είναι κυρίως βακτηριοκτόνες με χρονοεξαρτώμενη δράση. Έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια τις αλλεργικές αντιδράσεις.

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν τέσσερις υποκατηγορίες:

- τις πενικιλίνες
- τις κεφαλοσπορίνες
- τις καρβαπενέμες
- τις μονοβακτάμες

Πενικιλίνες. Η πενικιλίνη μελετήθηκε από τον Alexander Fleming. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο (Εικόνα 4). Η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας στην θέση 6

του β-λακταμικού δακτυλίου καταλήγει σε φάρμακα με διαφορετικές αντιμικροβιακές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες πενικιλινών (Εικόνα 5).

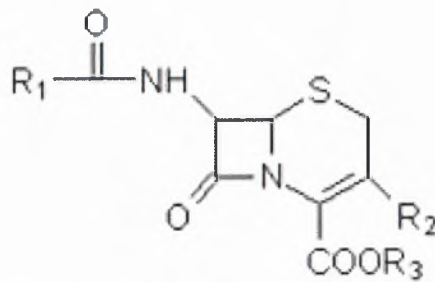


Εικόνα 4. Δομή πενικιλινών.

Κατηγορίες πενικιλινών	
Φυσικές πενικιλίνες	Πενικιλίνη G Πενικιλίνη V Υδατική προκαϊνούχος πενικιλίνη G Βενζαθινική πενικιλίνη G
Αντισταφυλοκοκκικές Πενικιλίνες	Μεθικιλίνη Ναφκιλίνη Ισοξαζολικές πενικιλίνες Οξακιλίνη Κλοξακιλίνη Δικλοξακιλίνη Φλουκλοξακιλίνη
Αμινοπενικιλίνες	Αμπικιλίνη Αμοξικιλίνη
Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες	Καρβοξυπενικιλίνες Καρβενικιλίνη Τικαρκιλίνη Ουρεϊδοπενικιλίνες Πιπερακιλίνη Αζλοκιλίνη Μεζλοκιλίνη

Εικόνα 5. Κατηγορίες πενικιλινών.

Κεφαλοσπορίνες. Η πρώτη κεφαλοσπορίνη απομονώθηκε από το μύκητα *Cephalosporium acremonium*, από τον Giuseppe Brotzu το 1945. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα εξαμελή διυδροθειαζινικό δακτύλιο (Εικόνα 6). Οι διάφορες κεφαλοσπορίνες προκύπτουν από υποκαταστάσεις πλευρικών αλυσίδων στην θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου και στην θέση 3 του διυδροθειαζινικού δακτυλίου.



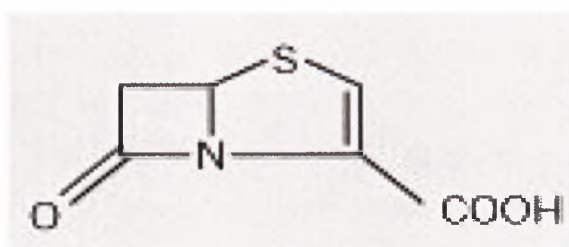
Εικόνα 6. Δομή κεφαλοσπορινών

Οι κεφαλοσπορίνες διαιρούνται σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς με βάση το φάσμα δράσης τους κατά των Gram αρνητικών αερόβιων, το οποίο αυξάνεται από την πρώτη στην τρίτη γενιά (Εικόνα 7).

Κατηγορίες κεφαλοσπορινών	
Πρώτης γενιάς	Κεφαδροξίλη, κεφαζολίνη, κεφαλεξίνη, κεφαλοθίνη, κεφαπυρίνη, κεφραδίνη
Δεύτερης γενιάς με δράση κατά του <i>H.influenzae</i>	Κεφακλόρη, κεφμανδόλη, κεφονισίδη, κεφορανίδη, κεφπροξίλη, κεφουροξίμη, κεφουροξίμη αξετίλ
Δεύτερης γενιάς με δράση κατά του <i>Bacteroides fragilis</i>	Κεφμεταζόλη, κεφοτετάνη, κεφοξιτίνη
Τρίτης γενιάς	Κεφοταξίμη, κεφτριαζόνη, κεφτριξοξίμη, κεφοπεραζόνη, μοξαλακτάμη
Τρίτης γενιάς με δράση κατά της <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Κεφταξιδίμη, κεφεπίμη

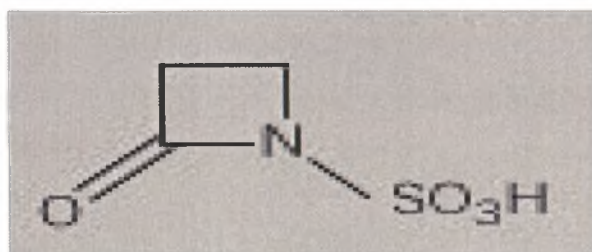
Εικόνα 7. Κατηγορίες κεφαλοσπορινών.

Καρβαπενέμες. Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα βλακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πεναμικό δακτύλιο (Εικόνα 8). Έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά. Οι καρβαπενέμες που κυρίως κυκλοφορούν σήμερα είναι ημιπενέμη και η μεροπενέμη. Είναι ανθεκτικές στην υδρόλυση από τις περισσότερες βλακταμάσες και χρησιμοποιούνται για την θεραπεία λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά.



Εικόνα 8. Δομή καρβαπενεμών

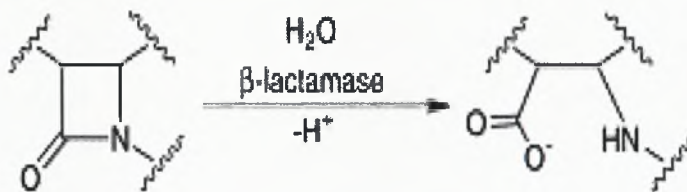
Μονοβακτάμες. Οι μονοβακτάμες αποτελούνται από ένα βλακταμικό δακτύλιο ενωμένο με μία σουλφονική ομάδα (Εικόνα 9). Η μόνη διαθέσιμη μονοβακτάμη είναι η αζτρεονάμη η οποία είναι δραστική μόνο κατά των Gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων περιλαμβανομένης και της *P.aeruginosa*.



Εικόνα 9. Δομή μονοβακτάμης.

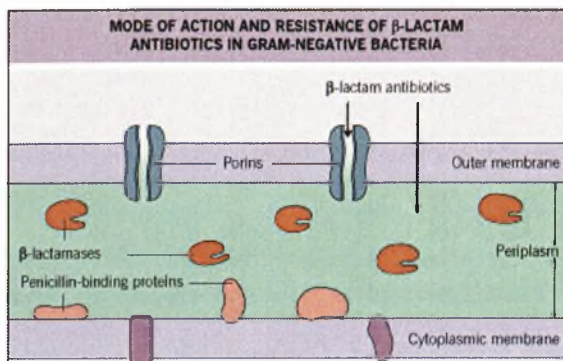
1.4. β-Λακταμάσες και η ταξινόμησή τους

Οι β-λακταμάσες είναι μία ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών με δομικές ομοιότητες οι οποίες αδρανοποιούν τα βλακταμικά αντιβιοτικά υδρολύοντας το δεσμό C-N (Εικόνα 10). Αποτελούνται από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα. Τελευταία, χρησιμοποιούνται δύο σχήματα για την ταξινόμηση των β-λακταμασών: η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler και το λειτουργικό σύστημα ταξινόμησης των Bush-Jacoby-Medeiros. Η ταξινόμηση του Ambler χωρίζει τις β-λακταμάσες σε τέσσερις διακριτές τάξεις με βάση τις ομοιότητες που έχουν στην αμινοξική αλληλουχία. Οι τάξεις A, C και D είναι β-λακταμάσες σερίνης ενώ τα ένζυμα της τάξης B είναι μεταλλοβ-λακταμάσες που χρειάζονται ιόντα Zn^{2+} για την καταλυτική δράση τους. Το σύστημα των Bush-Jacoby-Medeiros ταξινομεί τις β-λακταμάσες σύμφωνα με τις λειτουργικές ομοιότητές τους (υπόστρωμα και προφίλ αναστολέων).



Εικόνα 10. Υδρόλυση β-λακτάμης από β-λακταμάση.

Οι β-λακταμάσες μπορεί να κωδικοποιούνται από χρωμόσωμα, από πλασμίδια ή από τρανσποζόνια και να παράγονται συνεχώς ή με επαγωγή. Εκκρίνονται στον περιπλασμικό χώρο στα Gram αρνητικά βακτήρια (Εικόνα 11) ή στο γύρω περιβάλλον από τα Gram θετικά βακτήρια.

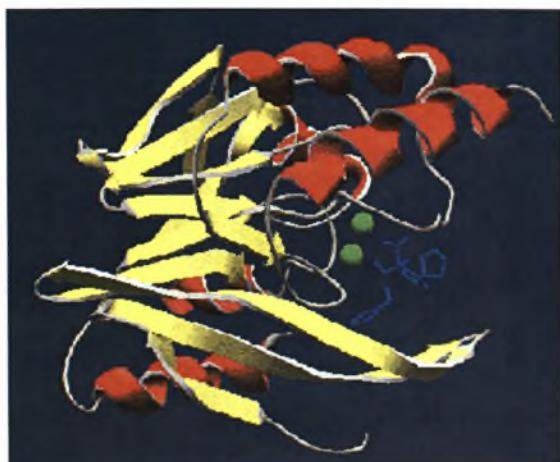


Εικόνα 11. Τόπος δράσης των β-λακταμασών στα Gram αρνητικά βακτήρια.

1.4.1. β-Λακταμάσες τάξης B (Μεταλλο-β-λακταμάσες)

Παρόλο που τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταλλοβ-λακταμάσες δείχνουν μία πολύ μικρή ομοιότητα στην πρωτογενή δομική αλληλουχία τους (17- 37%), οι τρισδιάστατες δομές των γνωστών μεταλλοβ-λακταμασών είναι παρόμοιες και παρουσιάζουν επίσης παρόμοιες κινητικές ιδιότητες υδρολύοντας αποτελεσματικά τις περισσότερες β-λακτάμες, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες. Είναι ανθεκτικά στην αδρανοποίηση από το κλαβουλανικό οξύ, την σουλβακτάμη και την ταζοβακτάμη. Η αζτρεονάμη δεν υδρολύεται και δεν δρα ως αναστολέας.

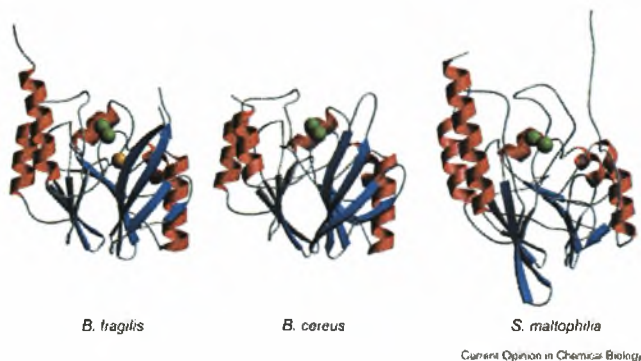
Τα ένζυμα αυτά έχουν μία δομή αβ/βα «σάντουιτς», με 2 βπτυχωτά φύλλα στο κέντρο και 5 α-έλικες στην εξωτερική επιφάνεια. Το βπτυχωτό φύλλο αποτελείται από 5 αντιπαράλληλες αλυσίδες (Εικόνα 12). Το μόριο της μεταλλοβ-λακταμάσης αποτελείται από δύο τμήματα που ενώνονται με μία αγκύλη που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 194-200. Το πρώτο τμήμα περιλαμβάνει το πολύ διατηρημένο μοτίβο His116-X-His118-X-Asp120 των προσδετών του ψευδάργυρου.



Εικόνα 12. Δομή β-λακταμάσης.

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες χρειάζονται ιόντα Zn^{2+} ή κάποιο άλλο βαρύ μέταλλο για την καταλυτική δράση τους και η δραστηρότητά τους αναστέλλεται από χηλικούς παράγοντες. Τα συντηρημένα κατάλοιπα που δεσμεύουν ψευδάργυρο δείχνουν ότι όλες οι μεταλλο-β-λακταμάσες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν δύο ιόντα Zn^{2+} . Όμως, στην πραγματικότητα κάποιες χρειάζονται δύο ιόντα Zn για την μέγιστη υδρολυτική τους δράση, με τα δύο ιόντα να δεσμεύονται είτε το ίδιο ισχυρά είτε το ένα πιο ισχυρά από το άλλο, (όπως π.χ. στο *B. Fragilis*, *B. Cereus*), ενώ άλλες μεταλλο-β-λακταμάσες χρειάζονται μόνο ένα ιόν Zn για την μέγιστη δραστηρότητά τους και η δέσμευση ενός δεύτερου ιόντος απενεργοποιεί το ένζυμο (όπως στο *Aeromonas hydrophila*).

Το διπύρηνιο κέντρο δέσμευσης Zn κάθε ενζύμου βρίσκεται στη βάση μιας ευρείας επιφανειακής εσοχής ανάμεσα στα δύο βφύλλα (Εικόνα 13). Λόγω αυτής της εύκολα προσβάσιμης τοποθέτησης, το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτό μπορεί να δέχεται μόρια διάφορων β-λακταμικών ενώσεων, παρέχοντας έτσι τη δομική βάση για την ευρεία ειδικότητα υποστρωμάτων που παρουσιάζουν.



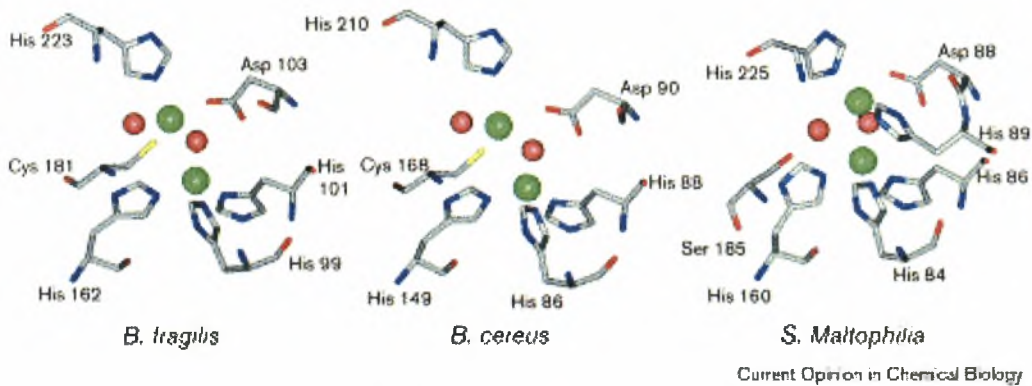
Εικόνα 13. Θέση δέσμευσης ιόντων Zn^{2+} στις μεταλλο-β-λακταμάσες.

Οι μικρές διαφοροποιήσεις στα κέντρα Zn και δέσμευσης υποστρώματος καθορίζουν την καταλυτική τους αποτελεσματικότητα για διάφρα υποστρώματα. Κάθε διπύρηνιο κέντρο Zn περιέχει ένα τετραεδρικά συντεταγμένο ιόν Zn (Zn 1) και ένα τριγωνικό διπυραμιδικά συντεταγμένο ιόν Zn (Zn 2) που γεφυρώνονται από ένα H_2O /ιόν υδροξυλίου. Το ιόν Zn 1 δεσμεύεται από τρεις συντηρημένες ιστιδίνες και τον προσδέτη νερό/υδροξύλιο. Το ιόν Zn 2 δεσμεύεται από τον προσδέτη νερό/υδροξύλιο και τα συντηρημένα κατάλοιπα His και Cys σε ισημερινές θέσεις, και ένα επιπλέον H_2O και την συντηρημένη Asp σε θέσεις προς την κορυφή (Εικόνα 14).

Η τάξη B των β-λακταμασών διαιρείται σε τρεις διαφορετικές υποτάξεις:

Υποτάξη B1: χαρακτηρίζεται από την θέση δέσμευσης ψευδαργύρου 1, που αποτελείται από τρία κατάλοιπα ιστιδίνης και μία θέση δέσμευσης ψευδαργύρου 2, που αποτελείται από μία His, μία Cys και μία Asp (Εικόνα 14). Περιλαμβάνει:

- την μεταλλο-β-λακταμάση II από το *Bacillus cereus*.
- την CcrA β-λακταμάση από *Bacteroides fragilis*
- την BlaB β-λακταμάση από *Chryseobacterium indologenes*
- την IMP β-λακταμάση που έχει βρεθεί σε κλινικά στελέχη των ***Pseudomonas aeruginosa***, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* και *Acinetobacter baumannii*.
- VIM β-λακταμάσες που έχουν βρεθεί σε ποικίλα στελέχη *P. Aeruginosa*, *K. Pneumoniae*, *P. Mirabilis*, *E. Cloacae* κλπ.



Εικόνα 14. Διπύρρηνα κέντρα δέσμευσης ιόντων Zn σε μεταλλο-β-λακταμάσες από τρία βακτηριακά είδη. Τα ιόντα Zn απεικονίζονται σαν πράσινες σφαίρες, ενώ τα άτομα οξυγόνου του μορίου νερό/υδροξύλιο και του κορυφαίου μορίου νερού απεικονίζονται σαν κόκκινες σφαίρες.

Η δομή των ενζύμων της υποτάξης B1 είναι οργανωμένη με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε τα δύο τμήματα του μορίου να συνδέονται μέσω των ιόντων Zn^{2+} , με το πρώτο τμήμα να συνεισφέρει με δύο ιστιδίνες για την θέση Zn1 και μία Asp για την θέση Zn2. Η τρίτη ιστιδίνη για την θέση Zn1 παρέχεται από το δεύτερο τμήμα του μορίου, το οποίο παρέχει μία κυστεΐνη και μία ιστιδίνη για την θέση Zn2.

Υποτάξη B2: χαρακτηρίζεται από την θέση δέσμευσης Zn1, με την μία από τις ιστιδίνες να αντικαθίσταται από ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης. Η θέση δέσμευσης ψευδαργύρου 2 είναι μη τροποποιημένη σε σύγκριση με την υποτάξη B1. Περιλαμβάνει:

- τις CphA, ImiS και CphA2 β-λακταμάσες που παράγονται από διάφορα είδη του *Aeromonas*.
- Την Sfh-I β-λακταμάση από την *Serratia fondicola*.

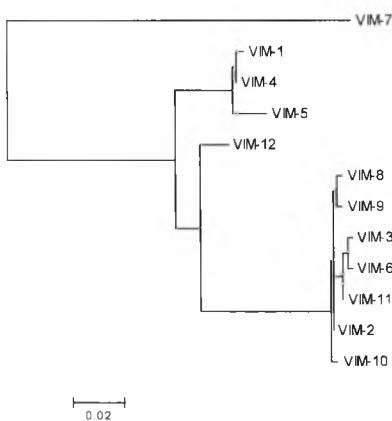
Υποτάξη B3: έχει τους ίδιους προσδέτες στην θέση δέσμευσης Zn1 με την υποτάξη B1, αλλά το κατάλοιπο κυστεΐνης που υπάρχει στη θέση δέσμευσης 2, στις υποτάξεις B1 και B2, έχει αντικατασταθεί με ιστιδίνη (Εικόνα 14). Περιλαμβάνει:

- την L1 β-λακταμάση από *Stenotrophomonas maltophilia*.
- την GOB β-λακταμάση από *C. Meningosepticum*.
- την FEZ-1 β-λακταμάση από *Legionella gormanii*.

- Την THIN-B β-λακταμάση από *Janthinobacterium lividum*.

1.4.2. Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM

Τα γονίδια τύπου VIM μεταφέρονται ως κασέτες γονιδίων από ιντεγρόνια κλάση 1. Οι παραλλαγές του γονιδίου αυτού μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις ομάδες που αντιπροσωπεύονται από το VIM-1, VIM-2 και VIM-7 (Εικόνα 15) . Η ομάδα VIM-1 περιλαμβάνει επίσης το VIM-4, το VIM-5 και το VIM-11A. Έξι παραλλαγές του VIM θεωρούνται παράγωγα του VIM 2 και είναι το VIM-3, -6, -8, -9, -10 και -11B. Το VIM-7 αποκλίνει φανερά από τους υπόλοιπους τύπους VIM, παρουσιάζοντας μία ομοιότητα 77% με το VIM-1, ενώ τα άλλα ένζυμα διαφέρουν μεταξύ λιγότερο από 11%.



Εικόνα 15. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ μεταλλοβ-λακταμασών τύπου VIM.

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες που κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε γενετικά μεταθετά στοιχεία, όπως αυτά τύπου VIM, αποτελούν μία μεγαλύτερη κλινική απειλή από τα ένζυμα που κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά, καθώς τα γονίδια αυτά έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων, ακόμη και διαφορετικού γένους. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM περιγράφηκαν πρώτα στη *Pseudomonas aeruginosa* και στη συνέχεια σε μία σειρά από Gram αρνητικά μη ζυμογόνα και σε κάποια εντεροβακτηριακά είδη όπως *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Enterobacter cloacae*. Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι οι μικροοργανισμοί που παράγουν

λακταμάσες τύπου VIM είναι ενδημικοί σε διάφορες Μεσογειακές χώρες, συμπεριλαμβάνοντας και την Ελλάδα. Η ανησυχία για την εμφάνιση των επίκτητων αυτών μεταλλο-β-λακταμασών σε κλινικά στελέχη σημαντικών Gram-αρνητικών παθογόνων, όπως μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas aeruginosa*, προκύπτει από το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να υδρολύουν, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες, όπως και την αντίστασή τους στους αναστολείς λακταμασών.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κλωνοποίηση, ο καθαρισμός, ο βιοχημικός χαρακτηρισμός και μελέτη κινητικών παραμέτρων μίας καινούργιας μεταλλοβ-λακταμάσης, της VIM-12.

Η VIM-12 λακταμάση βρέθηκε στο στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* 2873, το οποίο απομονώθηκε από καλλιέργεια αίματος ενός 67χρονου ασθενή χειρουργικής κλινικής στο «Ίποκράτειο» νοσοκομείο στη Θεσσαλονίκη το Μάρτιο του 2005. Το τεστ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε ότι η *Klebsiella pneumoniae* 2873 ήταν ανθεκτική στους συνδυασμούς πενικιλίνης με αναστολείς και τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος, και επίσης, παρουσίασε μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες και την αζτρεονάμη.

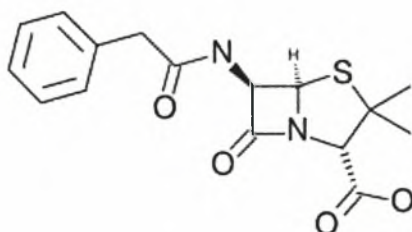
Το πολυπεπτίδιο της VIM-12 (266 αμινοξέα; μοριακό βάρος 28,120 kD) έχει μία αμινοξική ομολογία 97 % με τη VIM-1 και 93,6 % με την VIM-2 μεταλλο-β-λακταμάση. Η VIM-12 διαφέρει από τη VIM-1 σε 8 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο (στις θέσεις 246, 251, 257, 258, 284, 287, 294 και 299) και σε 18 κατάλοιπα από το VIM-2 στο αμινοτελικό άκρο, από τα οποία 8 βρίσκονται στο έν δυνάμι πεπτίδιο σήματος (Εικόνα 16). Οι θέσεις των αλλαγών που παρατηρούνται οδηγούν στην υπόθεση ότι η λακταμάση αυτή μπορεί να προέκυψε από ανασυνδυασμό ανάμεσα στα γονίδια bla_{VIM-1} και bla_{VIM-2} . Στο δενδρόγραμμα τοποθετείται ανάμεσα στην ομάδα VIM-1 και την ομάδα VIM -2 (Εικόνα 15). Οι αλλαγές που παρατηρούνται σε σχέση με τη VIM-1 αφορούν αμινοξέα που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου και βρίσκονται σε απόσταση από το ενεργό κέντρο. Παρολαυτά, διαφορές στο υδρολυτικό φάσμα της VIM-12 δεν μπορούν να αποκλεισθούν.

VIM-12	MLKVISSLLVYMTASVMAVASPLAHSGEPSGEYPTVNEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ60
VIM-1	
VIM-2	F L L K L I I F V D S S
VIM-12	SFDGAVYPSNGLIVRDGDELLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR-122
VIM-1	
VIM-2	
VIM-12	GGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEAEAGNEIPHTSLEGLSSSGDAWRFGPVVELFYPGAHS-197
VIM-1	
VIM-2	V
VIM-12	TDNLVVYVPSANVLYGGCAVHELSSTSAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIPGH263
VIM-1	V K EV
VIM-2	S IY R
VIM-12	GLPGGLDLLKHTTNVVKAHTRNSVVE300
VIM-1	Q A K A
VIM-2	

Εικόνα 16. Αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία ανάμεσα στη VIM-12, VIM-1 και VIM-2 λακταμάση.

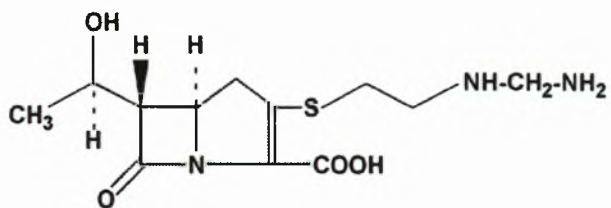
Στην παρούσα εργασία μετά την απομόνωση του ενζύμου ακολουθεί η μελέτη των κινητικών παραμέτρων της μεταλλοβ-λακταμάσης VIM-12 χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τα πέντε β-λακταμικά αντιβιοτικά που αναφέρονται παρακάτω:

- την πενικιλίνη G - κατηγορία πενικιλινών (Εικόνα 17).



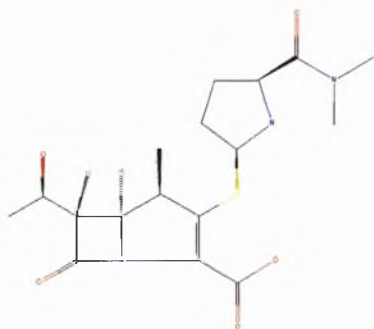
Εικόνα 17. Δομή πενικιλίνης G

- Την ιμιπενέμη- κατηγορία καρβαπενεμών (Εικόνα 18).



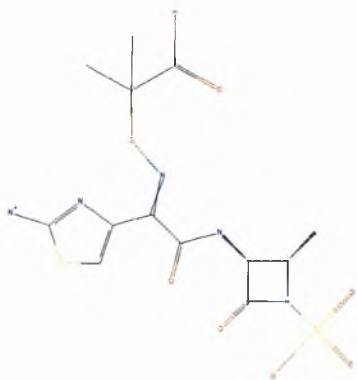
Εικόνα 18. Δομή ιμιπενέμης.

- Την μεροπενέμη- κατηγορία καρβαπενεμών (Εικόνα19).



Εικόνα 19. Δομή μεροπενέμης.

- και την αζτρεονάμη- κατηγορία μονοβακταμών (Εικόνα20).



Εικόνα 20. Δομή αζτρεονάμης.

Διαφορές στην υδρολυτική ικανότητα της VIM-12, που ίσως προκύψουν από την μελέτη αυτή, θα μπορούν να βοηθήσουν στον προσδιορισμό και άλλων σημαντικών αμινοξέων που παρόλο ότι δεν βρίσκονται στο ενεργό κέντρο μπορούν να επηρεάζουν την διαμόρφωση αυτού μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Αντιδραστήρια

- ◆ Qiagen DNA Mini Kit – [Qiagen]
- ◆ MgCl₂ 50mM – [Invitrogen]
- ◆ Νουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM – [Fermentas]
- ◆ Agarose – [SeaKem]
- ◆ Ethidium Bromide – [Merck]
- ◆ Hi Yield Gel PCR DNA fragments – [Real Genomics]
- ◆ LB broth – [Scharlau]
- ◆ LB agar – [Scharlau]
- ◆ NaCl – [Panreac]
- ◆ Ampicilline – [Sigma]
- ◆ Chloramphenicol – [Sigma]
- ◆ IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) – [Fermentas]
- ◆ X-Gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) – [Sigma]
- ◆ NucleoSpin Plasmid Quick Pure- [MACHEREY-NAGEL]
- ◆ DNA Molecular weight 1kb – [Hy Test Ltd]
- ◆ Hepes – [Research Organics]
- ◆ Triton – [Merck]
- ◆ Lysozyme – [Fluka]
- ◆ 2-mercaptethanol – [Riedel-de Haen]
- ◆ PMSF – [Sigma]
- ◆ ZnSO₄ – [Merck]
- ◆ Ni-NTA Agarose – [Qiagen]

- ◆ Imidazole – [Merck]
- ◆ Glycerol – [Panreac]
- ◆ PEG 400 (polyethyleneglycol)– [SERVA]
- ◆ Penicilline G– [BIANEΞ]
- ◆ Ceftazidime– [BIANEΞ]
- ◆ Imipenem – [BIANEΞ]
- ◆ Meropenem – [ASTRA ZENECA]
- ◆ Aztreonam – [BRISTOL MYERS SQUIBBCo.]
- ◆ Nitrocefin – [Oxoid]
- ◆ KCl – [Merck]
- ◆ MnCl₂– [Merck]
- ◆ MgCl₂ – [Merck]
- ◆ Bradford reagent - [Merck]
- ◆ APS (Ammonium Persulfate)– [Sigma]
- ◆ Acrylamide – [Sigma]
- ◆ BSA – [New England Biolabs]
- ◆ Coomassie Brilliant Blue– [Fluka]
- ◆ EDTA – [Panreac]
- ◆ Tris – [SERVA]
- ◆ CN₂O₃ – [Panreac]
- ◆ Ισοπροπανόλη – [Scharlau]
- ◆ TEMED (N,N,N',N'- τετραμεθυλεθυλενοδιαμίνη) – [Research Organics]
- ◆ Εκχύλισμα *S.Cerevisiae* – [Scharlau]
- ◆ Tryptone – [Merck]
- ◆ Xylene Cyanol – [Merck]
- ◆ Γλυκόζη – [Bio-Rad]
- ◆ Tween – [Panreac]
- ◆ SDS – [Sigma]
- ◆ Οξικό οξύ – [Merck]

- ❖ Tris base – [Merck]
- ❖ Κουμαρικό οξύ – [Sigma]
- ❖ Λουμινόλη – [Sigma]
- ❖ CL Xposure film
- ❖ Ποντικίσιο αντίσωμα έναντι του εξαπεπτιδίου ιστιδινών – [Bioscience Resource Project]
- ❖ Κατσικίσιο αντίσωμα έναντι ποντικίσιου αντισώματος – [Anogen]

3.1.2. Ένζυμα

Πολυμεράσες

- ❖ Platinum Taq Polymerase Proof Reading 5U/μl – [Invitrogen]
- ❖ Taq Polymerase – [Dialat]

Περιοριστικά ένζυμα

- ❖ Nde I - [New England Biolabs]
- ❖ BamH I – [New England Biolabs]

Λιγάσες

- ❖ T4 DNA Ligase – [New England Biolabs]

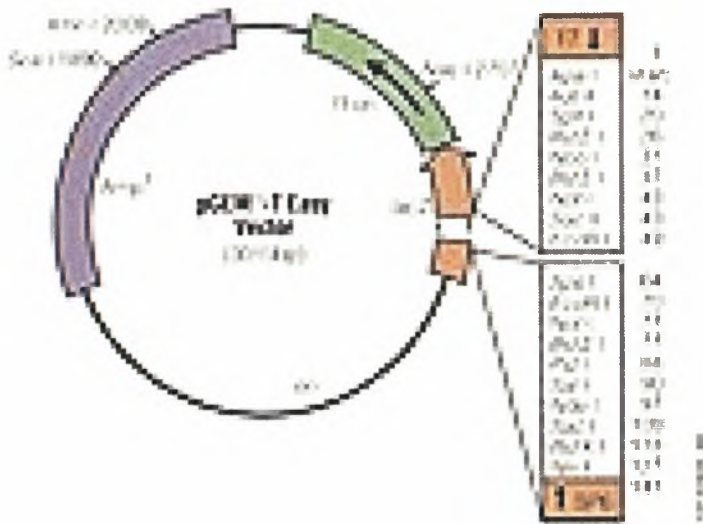
3.1.3. Βακτηριακά κύτταρα

- *Klebsiella pneumoniae* 2873 που απομονώθηκε από καλλιέργεια αίματος 67 χρονου ασθενή από χειρουργική κλινική.
- Επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α [Invitrogen]
- Επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21 [Novagen]

3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς

pGem – Teasy Vector [Promega]

Έχει μέγεθος 3kb και χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR (Εικόνα 21). Περιέχει 3' προεξοχές θυμιδίνης και στα δύο του άκρα οι οποίες παρεμποδίζουν την επανακυκλοποίηση του φορέα και προσφέρουν ένα 3' συμπληρωματικό άκρο για το προϊόν PCR αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της σύνδεσης. Το προϊόν PCR περιέχει 3' προεξοχές αδενοσίνης λόγω της ικανότητας της T4 πολυμεράσης να προσθέτει μία αδενοσίνη στα 3' άκρα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται TA cloning και πραγματοποιείται μέσω της T4 λιγάσης.



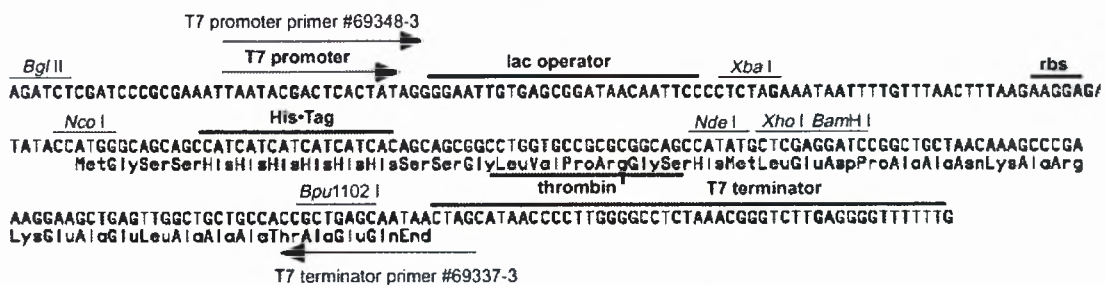
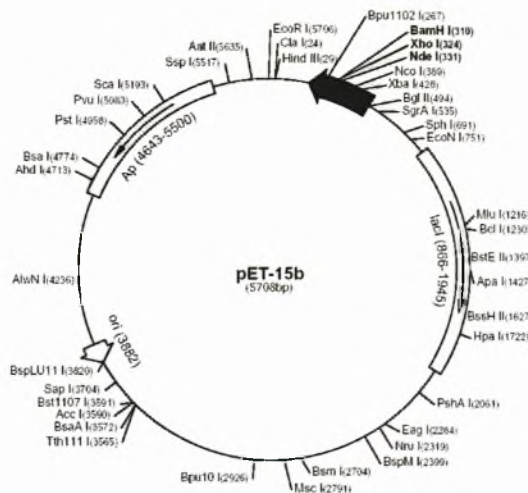
Εικόνα 21. Ο φορέας pGEM Teasy . Περιλαμβάνει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη τα γονίδια της β-γαλακτοσιδάσης και τον προαγωγέα της T7 RNA Πολυμεράσης.

Ο συγκεκριμένος φορέας περιέχει επίσης δύο υποκινητές, της T7 και SP6 RNA πολυμεράσης οι οποίοι βρίσκονται στα δύο άκρα ενός πολυσυνδέτη που είναι τοποθετημένος μέσα στην περοχή που κωδικοποιεί για το απεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση του οπερονίου της λακτόζης. Η βγαλακτοσιδάση διασπά τη λακτόζη σε D- γλυκόζη και D- γαλακτόζη. Το οπερόνιο της λακτόζης περιέχει επίσης μία περιοχή που κωδικοποιεί την περμεάση, η οποία κααλύει την μεταφορά της λακτόζης μέσα στο κύτταρο και την κωδικοποιούσα περιοχή για την τρανσακετυλάση ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Η μεταγραφή του οπερονίου αυτού επάγεται από την ύπαρξη της λακτόζης στο περιβάλλον. Η εισαγωγή του γονιδίου στον πολυσυνδέτη διακόπτει την συνέχεια της περιοχής που κωδικοποιεί για το απεπτίδιο με αποτέλεσμα η β-γαλακτοσιδάση να είναι ανενεργή, και οι μετασχηματισμένοι κλώνοι να μπορούν να επιλεγούν εύκολα, λόγω του λευκού χρώματος που έχουν, όταν αναπτύσσονται παρουσία X-gal, ένα ανάλογο της λακτόζης. Η έκφραση του οπερονίου επιτυγχάνεται με τη προσθήκη του IPTG (Isopropyl Thio Galactosyl), ένας επαγωγέας που δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα Lac IQ από τη θέση του χειριστή με αποτέλεσμα η RNA πολυμεράση να μπορέσει να προσδεθεί και να αρχίσει την μεταγραφή.

Επίσης, ο φορέας pGem περιέχει και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.

pET-15b Vector [Novagen]

Ο φορέας αυτός έχει μέγεθος 5708 bp και είναι κατάλληλος για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω της T7 RNA πολυμεράσης (Εικόνα 22). Μετά τον προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης βρίσκεται ο πολυσυνδέτης ο οποίος περιέχει θέσεις αναγνώρισης και κοπής για διάφορα ένζυμα περιορισμού Έτσι, με την χρήση κατάλληλων ενζύμων είναι δυνατή η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου. Πριν από την θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου Nde I υπάρχουν έξι τριάδες νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν έξι ιστιδίνες. Διαθέτει επίσης και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 22. Ο φορέας έκφρασης pET15b και η θέση του πολυσυνδέτη.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Μέθοδοι απομόνωσης, μεταφοράς και επεξεργασίας νουκλεϊκών οξέων.

3.2.1.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα *Klebsiella pneumoniae*.

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από 2ml O/N καλλιέργεια κυττάρων στους 37°C, χρησιμοποιώντας το Qiagen DNA Mini Kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA.

3.2.1.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction PCR*)

Η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Σύμφωνα με τη τεχνική αυτή, σε ένα πρώτο στάδιο, το DNA αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες (95°C). Έτσι, κάθε δίκλωνο μόριο μετατρέπεται σε δύο μονόκλωνα. Στην συνέχεια, σε ένα δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία κατεβαίνει ώστε να φτάσει την θερμοκρασία υβριδισμού, όπου οι εκκινητές προσδένονται πάνω στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18–24 νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά προς τα δύο άκρα της αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Για κάθε επιθυμητή αλληλουχία σχεδιάζεται ένα ζεύγος εκκινητών. Ο ένας εκκινητής έχει την αλληλουχία του 5' άκρου της κωδικοποιούσας αλληλουχίας (νοσηματικός εκκινητής) και ο άλλος είναι συμπληρωματικός προς το 3' άκρο της κωδικοποιούσας αλληλουχίας (αντινοσηματικός εκκινητής). Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και την σύσταση των εκκινητών. Τελευταίο, είναι το στάδιο του πολυμερισμού που λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 72°C. Στο στάδιο αυτό η πολυμεράση προσθέτει τα δεοξυνουκλεοτίδια στο αυξανόμενο κλώνο. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, κατάλληλο για τη δράση της πολυμεράσης, και ιόντων Mg^{2+} . Τα τρία στάδια που αναφέρθηκαν αποτελούν έναν

κύκλο αντιγραφής. Για να παραχθεί επαρκής ποσότητα DNA πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί 30 – 35 φορές. Πριν τους επαναλαμβανόμενους κύκλους πραγματοποιείται μία αρχική αποδιάταξη του DNA για 5 min και στο τέλος τους ακολουθεί μία επώαση στους 72^o C για 10min, για την τελική επιμήκυνση των μορίων DNA.

Το γόνιδιο VIM 12 ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας 50 ng γενωμικού DNA ως υπόστρωμα σε τελικό όγκο 50μL. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, οι τελικές τους συγκεντρώσεις και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 και 2.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε ο νοηματικός εκκινητής να έχει στο 5' άκρο του την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο Nde I, και ο αντινοηματικός εκκινητής να έχει στο 5' άκρο του την αλληλουχία αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamHI.

Νοηματικός (Forward) εκκινητής 32nt, Tm = 53°C

NdeI

GCATATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGG

Αντινοηματικός (Reverse) εκκινητής 22nt, Tm = 52°C

BamHI

GGATCCCTACTCAACGACTGAG

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε η Platinum Taq polymerase Proof reading η οποία προστέθηκε στην αντίδραση μετά την αρχική αποδιάταξη. Για τα 10 τελευταία λεπτά της επιμήκυνσης χρησιμοποιήθηκε η απλή Taq πολυμεράση ώστε να δημιουργηθούν οι 3' A προεξοχές.

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μL)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	36,1	
Buffer 10X	5	1X
MgCl ₂ 50mM	2	2 mM
DNTPs 10mM	1,25	0,25mM
Εκκινητής 1 100pmol/μL	0,25	0,5 pmol/μL
Εκκινητής 2 100pmol/μL	0,25	0,5 pmol/μL
Taq Polymerase 5U/μL	0,25	0,025 U/μL

Πίνακας 2. Συνθήκες στις οποίες έλαβε μέρος η PCR.

	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια (min)	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	98	1	1
Αποδιάταξη	95	0,45	32
Υβριδοποίηση εκκινητή	50	1	
Επιμήκυνση	72	1,5	
Τελική επιμήκυνση	72	10	1

3.2.1.3. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αгарόζης

40μL από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,2% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Επίσης, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχο αιθιδίου (7μL EtBr 1% σε 100ml αгарόζης). Το EtBr προστίθεται έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων DNA στην πηκτή αгарόζης και αυτό οφείλεται

στην ιδιότητά του να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φωσφορίζει κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120 V. Η συγκέντρωση της αγαρόζης για την προετοιμασία της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X έτσι ώστε να καλύπτεται από αυτό. Στην συνέχεια, μεταφέρονται 10 μ l από το προϊόν της PCR, που έχουν προηγουμένως αναμιχθεί με 2 μ l χρωστική βλ, σε μία από τις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Η χρωστική που χρησιμοποιείται βοηθάει το DNA να καθίσει στην βάση της υποδοχής και επίσης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε την ηλεκτροφόρηση. Παράλληλα με το δείγμα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους ώστε να διευκολύνεται ο υπολογισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA.

- Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων:

Tris base	242 gr
Οξικό οξύ	57,1 ml
EDTA 0,5M pH 8	100 ml
Απιονισμένο νερό	έως 1L

- Το ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής βλ για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων:

Bromophenol Blue	0,09%
Xylene Cyanol	0,09%
Γλυκερόλη	60%
EDTA	60 mM

3.2.1.4. Εκχύλιση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση η μπάνα του DNA που αντιστοιχεί στο μέγεθος του προϊόντος που περιμένουμε κόβεται με προσοχή από το υπόλοιπο κομμάτι της πηκτής και εκχυλίζεται χρησιμοποιώντας το Hi Yield Gel PCR DNA fragments (Real Genomics). Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit.

3.2.1.5. Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία προϊόντος PCR, που εκχυλίθηκε με τον παραπάνω τρόπο, και του πλασμιδιακού φορέα pGem-Teasy Vector, σε αναλογία 3:1 σύμφωνα με τον Πίνακα 3. Την ποσότητα του προϊόντος PCR (insert) που χρησιμοποιείται την υπολογίζουμε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$(\text{ng vector} \times \text{kb of insert} / \text{kb of vector}) \times \text{insert: vector molar ration}$

$(25\text{ng} \times 0,8 \text{ kb} / 3 \text{ kb}) \times 3/1 = 20 \text{ ng}$ προϊόντος PCR.

Πίνακας 3. Αντίδραση Λιγάσης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 μL
pGem –Teasy Vector (50ng/ μL)	0,5 μL
Προϊόν PCR 10,5 ng/Ml	2 μL
T4 DNA Ligase 3 Weiss units/ μL	1 μL
H ₂ O	1,5 μL

Το μείγμα επωάζεται ON στους 4⁰C.

3.2.1.6. Μετασχηματισμός χημικά επιδεκτικών κυττάρων DH5α

Αποστειρώνονται 200 ml LB agar και προστίθεται αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$. Στη συνέχεια, το άγαρ μοιράζεται σε τρυβλία και αφήνεται να πήξει. Ξεπαγώνονται σε πάγο τα επιδεκτικά κύτταρα DH5α και προστίθενται 10 μL από την αντίδραση λιγάσης (4 μg) σε 100 μL επιδεκτικά κύτταρα. Ακολουθεί επώαση 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, το μείγμα τοποθετείται στους 42⁰C για 1,5 λεπτό έτσι ώστε να προκληθεί “heat shock” στα κύτταρα και αμέσως μετά 2 λεπτά στον πάγο.

Ακολουθεί η προσθήκη 900μL θρεπτικού μέσου SOC και επώαση για 2 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση 160 rpm.

Τα τρυβλία με LB άγαρ επιστρώνονται με 16μL X-gal και 100μL IPTG 100mM και αφήνονται να στεγνώσουν. Στην συνέχεια,επιστρώνονται 300 μL κύτταρα και επωάζονται O/N στους 37°C.

- Θρεπτικό μέσο SOC pH 7:

Tryptone	2 gr
Εκχύλισμα <i>S. cerevisiae</i>	0,5 gr
NaCl 1M	1 ml
KCl 1M	0,25 ml
Διάλυμα Mg ²⁺ 2M	1 ml
Γλυκόζη 2M	1ml
Απιονισμένο H ₂ O	έως τα 100 ml

- Στερεό θρεπτικό μέσο LB pH 7,2:

Σκόνη LB agar	3 gr
NaCl	1 gr
Απιονισμένο H ₂ O	100 ml

3.2.1.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Οι μεγαλύτερες λευκές αποικίες, που αναπτύχθηκαν, ενοφθαλμίστηκαν σε 5ml LB broth, που περιείχε αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και επώαστηκαν O/N στους 37°C, υπό ανάδευση, στα 210 rpm. Τρία ml της O/N καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA. 5 μL πλασμιδιακού DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1%.

3.2.1.8. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε επωάστηκε με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA, στην συγκεκριμένη περίπτωση του γονιδίου VIM-12, στον πλασμιδιακό φορέα pGem-T Easy Vector.

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και διασπών το φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των βάσεων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μ L, χρησιμοποιώντας 5U BamHI, 10U NdeI και 200ng πλασμιδιακού DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X του ενζύμου BamHI. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει επίσης BSA το οποίο δεσμεύεται στα τοιχώματα του σωλήνα, εμποδίζοντας τα ένζυμα να δεσμεύονται σ' αυτά και να μειώνεται η δραστηριότητά τους. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται για 2.5 ώρες στους 37°C. Στο τέλος της επώασης τα 20 μ L ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1,5% και η μπάνα που αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου VIM-12 εκχυλίζεται από την πηκτή.

3.2.1.9. Σύνδεση του γονιδίου VIM 12 με τον πλασμιδιακό φορέα pET-15b

Επωάζεται το τμήμα DNA, το οποίο έχει στα δύο άκρα τις προεξοχές που έχουν δημιουργηθεί από τα ένζυμα περιορισμού, με το γραμμικό φορέα pET-15b, το οποίο έχει κοπεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού, σε αναλογία 3:1. Η σύνδεση πραγματοποιείται από την T4 DNA λιγάση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε τελικό όγκο 10 μ L σε ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης και παρουσία ATP 5mM.

3.2.1.10. Μετασχηματισμός κυττάρων BL21

Τα κύτταρα BL21 χρησιμοποιούνται για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο όπως και για το μετασχηματισμό των κυττάρων DH5 α . Στο LB agar προστίθενται αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη σε τελική

συγκέντρωση 100 μ g/ml. Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 56g DNA για 100 μ L κύτταρα BL21.

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ενοφθαλμίστηκαν σε 5ml LB broth που περιείχαν αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι καλλιέργειες αυτές ελέγχθηκαν μεPCR για την παρουσία του γονιδίουVIM-12.

- Υγρό θρεπτικό μέσοLB:

Σκόνη LB broth	1,5 gr
NaCl	1 gr
Απιονιμένο H ₂ O	έως τα 100 ml

3.2.2. Υπερέκφραση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης

Ετοιμάζονται 2 L LB broth στα οποία προστίθενται αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 100 μ g/ml. 5ml O/N καλλιέργειας κυττάρων BL21, που έχουν το γονίδιο της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης, ενοφθαλμίζονται σε 100 ml LB broth και αφήνονται να αναπτύσσονται στους 37^oC, υπό ανάδευση (210 rpm) έως ότου η OD₆₀₀ (η απορρόφηση στα 600nm) να φτάσει 0,4, τιμή που αντιστοιχεί στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Στην συνέχεια τα 100ml καλλιέργειας ενοφθαλμίζονται στα 2 L LB broth και επωάζονται πάλι στους 37^oC υπό ανάδευση μέχρι που η OD₆₀₀ να φτάσει 0,4. Στο σημείο αυτό προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5mM έτσι ώστε να επάγεται η έκφραση της μεταλλο-β-λακταμάσης και η καλλιέργεια επωάζεται για 5 ώρες επιπλέον, στους 30^oC υπό ανάδευση (210 rpm). Στη συνέχεια, οι καλλιέργεια φυγοκεντρώνται στα 4000x g για 20 λεπτά στους 4^oC . Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους-80^oC.

3.2.3. Καθαρισμός της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης

Η κλωνοποίηση του γονιδίου VIM-12 στο φορέα pET-15b, με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πρωτεΐνης η οποία έχει στο αμινοτελικό της άκρο ένα εξαπεπτίδιο από ιστιδίνες. Εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα αυτή, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας ρητίνη Ni-NTA.

3.2.3.1. Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το ίζημα κυττάρων από τα 2L καλλιέργειας αναδιαλύεται καλά σε 10ml διάλυμα ομογενοποίησης το οποίο αποτελείται από:

- ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM
- NaCl 500mM
- Triton 0,1%
- B-mercaptoethanol 5mM
- ZnSO₄ 1mM
- Lysozyme 10μg/ml
- PMSF 1mM
- Glycerol 5%

Ακολουθεί η διαδικασία θραύσης των κυττάρων με υπέρηχους, η οποία πραγματοποιείται μέσα σε πάγο. Στη συνέχεια το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 14000x g για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα καθαρό σωληνάριο και φυγοκεντρείται σε υπερφυγόκεντρο στα 100000 x g για 1 ώρα. Μετά την υπερφυγοκέντρωση το υπερκείμενο μεταφέρεται ξανά σε ένα καθαρό σωληνάριο και είναι έτοιμο για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Πραγματοποιείται επίσης μία μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford.

3.2.3.2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας κάτω από φυσικές συνθήκες

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ρητίνη αραρόζηNi – NTA η οποία συσκευάζεται σε στήλη, σε μία σύριγγα των 10ml στη βάση της οποίας έχει τοποθετηθεί υαλοβάμβακας. Χρησιμοποιείται περίπου 1ml διάλυμα ρητίνης 50% για 5mg ολικής πρωτεΐνης. Το μήκος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 5 ml. Αφού συσκευαστεί η στήλη, σταθεροποιείται περνώντας τουλάχιστον 5 όγκους στήλης ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης (binding buffer) η σύσταση του οποίου είναι:

- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 50mM
- NaCl 500mM
- B-mercaptoethanol 5mM
- ZnSO₄ 1mM
- PMSF 1mM
- Glycerol 5%

Στην συνέχεια, προστίθεται το υπερκείμενο. Η πρωτεΐνη μας δεσμεύεται πάνω στη στήλη λόγω της μεγάλης συγγένειας που έχουν οι έξι ιστοιδίνες για τα ιόντα νικελίου, ενώ οι άλλες πρωτεΐνες διαπερνάνε τη στήλη. Η συγγένεια των ιστοιδινών για τα ιόντα νικελίου οφείλεται στο δακτύλιο του ημιδαζολίου που διαθέτουν. Παρολαυτά, μία μικρή ποσότητα μη ειδικών συνδεδεμένων πρωτεϊνών παραμένει πάνω στη στήλη. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών αυτών περνάμε από τη στήλη το διάλυμα έκπλυσης (washing buffer), το οποίο περιέχει:

- ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 50mM
- NaCl 500mM
- B-mercaptoethanol 5mM
- ZnSO₄ 1mM
- PMSF 1mM

- Glycerol 5%
- Imidazol 20mM

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου που περιέχει το διάλυμα έκπλυσης βοηθάνε στον πιο αποτελεσματικό καθαρισμό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ημιδαζολίου οι έξι ιστιδίνες εξασφαλίζουν μία επαρκή δέσμευση της πρωτεΐνης πάνω στη στήλη, ενώ οι μη ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται. Η στήλη διαπερνάται με τουλάχιστον 5 όγκους στήλης διάλυμα έκπλυσης, στη συγκεκριμένη περίπτωση 25ml. Στη συνέχεια, ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης με 25ml διάλυμα έκλυσης που αποτελείται από:

- ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 50mM
- NaCl 500mM
- Imidazol 500mM

Το διάλυμα αυτό περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου το οποίο ανταγωνίζεται τις ιστιδίνες για τη δέσμευση στα ιόντα νικελίου με αποτέλεσμα η επιθυμητή πρωτεΐνη να αποδεσμεύεται από τη στήλη και να εκλύεται. Η συλλογή του εκλούσματος γίνεται σε κλάσματα των 1,5ml. Ακολούθησε έλεγχος των κλασμάτων για την παρουσία της πρωτεΐνης, σε πρώτη φάση, μετρώντας την απορρόφηση στα 260nm όπου απορροφάνε οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα κλάσματα που απορροφούσαν ελέγχθηκαν για δραστηριότητα βλακταμάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την νιτροσεφίνη, ένα βλακταμικό αντιβιοτικό το οποίο αλλάζει χρώμα και γίνεται κόκκινο όταν υδρολύεται. Τέλος, τα κλάσματα που έδειξαν να έχουν δραστηριότητα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης.

3.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel) 12%, και την πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) 5%. Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη

πυκνότητα από τη πηκτή διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που φορτώνονται έτσι ώστε όταν φτάσουν στην πηκτή διαχωρισμού να βρίσκονται σε μία ευθεία γραμμή.

Αρχικά, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η πηκτή διαχωρισμού της οποίας η σύσταση είναι:

30% μείγμα ακρυλαμιδίου	4ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
10% APS	0,1 ml
Απιονισμένο H ₂ O	3,3 ml

Ευθυγραμμίζεται η επιφάνειά της με την προσθήκη μικρής ποσότητας ισοπροπανόλης, η οποία απομακρύνεται όταν πήξει η πηκτή. Στη συνέχεια, πάνω από αυτή, τοποθετείται η πηκτή συγκέντρωσης 12% που αποτελείται από:

30% μείγμα ακρυλαμιδίου	0,83ml
1 M Tris HCl pH 6,8	0,63 ml
SDS 10%	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
APS	0,05 ml
Απιονισμένο H ₂ O	3,4 ml

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε μία αναλογία 15μl δείγματος : 5μl ρυθμιστικού διαλύματος και στην συνέχεια την μετουσίωση των πρωτεϊνών με θέρμανση στους 70°C 2 min.

Το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού αποτελείται από:

- 0,8 ml 0,625M Tris pH 6,8
- 0,8 ml Glycerol
- 0,4 ml β-mercaptoethanol
- 1,6 ml SDS
- 0,4 ml bromophenol blue 1%

- 4 ml H₂O

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι το φορτίο τους, καθώς αυτό είναι ενιαίο λόγω του SDS. Τα δείγματα φορτώνονται στις υποδοχές της πηκτής παράλληλα με κάποιο μάρτυρα μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris, γλυκίνη, SDS 1X.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris, γλυκίνη, SDS 10X:

- 72gr γλυκίνη
- 15 γρ Tris-HCl
- 5 gr SDS

Διαλύονται σε 500ml dH₂O.

Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται η πηκτή συγκέντρωσης και βάφεται η πηκτή διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution) για 45 λεπτά.

Διάλυμα χρωματισμού:

- 0,1 gr Coomassie Brilliant Blue
- 80 ml μεθανόλη
- 20 ml οξικό οξύ
- 100 ml dH₂O

Ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) σε τρεις πλύσεις.

Διάλυμα αποχρωματισμού:

- 150 ml μεθανόλη
- 50 ml οξικό οξύ
- 300 ml dH₂O

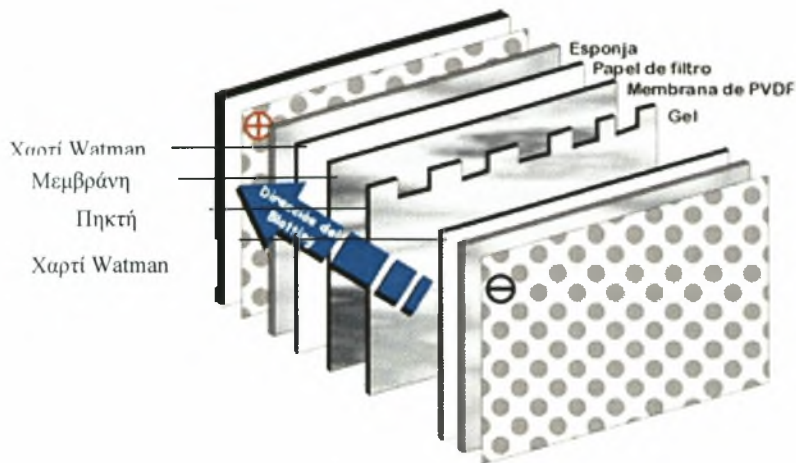
Στο τέλος της διαδικασίας οι ζώνες των πρωτεϊνών είναι ευδιάκριτες λόγω της μπλε χρωστικής Coomassie Brilliant Blue.

3.2.5. Ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με την τεχνική ανοσοαποτύπωσης (Western blotting)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται επειδή υπάρχουν τα κατάλληλα αντισώματα στα οποία μπορούν να δεσμεύονται οι πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τη τεχνική αυτή, οι πρωτεΐνες, μετά την ηλεκτροφόρηση, μεταφέρονται σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έτσι ώστε να είναι εύκολα προσβάσιμες από τα αντισώματα. Τοποθετείται χαρτί Whatman, εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς IX (transfer buffer), ως κάτω στρώση στη συσκευή. Πάνω από αυτό τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, εμποτισμένη και αυτή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετείται η πηκτή και στο τέλος άλλο ένα χαρτί Whatman εμποτισμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Εικόνα 23). Η τοποθέτηση γίνεται με προσοχή για να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες οι οποίες δεν επιτρέπουν τη διέλευση του ρεύματος. Οι πρωτεΐνες στην πηκτή έχουν αρνητικό φορτίο λόγω του SDS. Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό δυναμικό μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης οι πρωτεΐνες αρχίζουν να κινούνται από την πηκτή προς τη μεμβράνη και εγκλωβίζονται στο πλέγμα της. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η μεταφορά έγινε στα 50mA για 45 λεπτά.

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 10X:

- 4,5 gr Tris
- 2,5 gr βορικό οξύ
- 6 ml SDS 10% pH 8,5
- Απιονισμένο H₂O έως τα 300 ml



Εικόνα 23. Μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

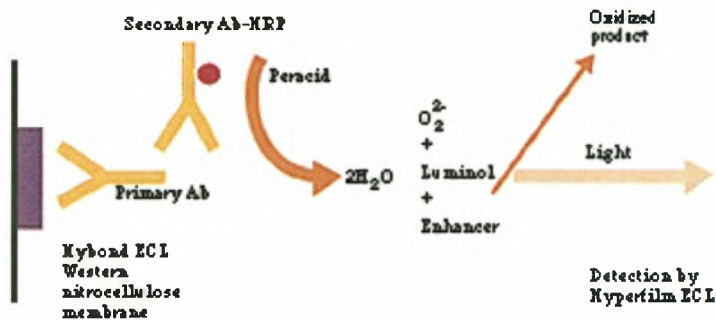
Στη συνέχεια ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Η μεμβράνη τοποθετείται σε 15ml διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS για 45 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά το στάδιο αυτό καλύπτεται η μεμβράνη με τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να αποκλεισθεί η μη ειδική δέσμευση του αντισώματος στην επιφάνεια της μεμβράνης.
- 2) Το γάλα απορρίπτεται και προστίθενται άλλα 15ml τα οποία περιέχουν ποντικίσιο αντίσωμα έναντι του εξαπεπτιδίου των ιστιδινών, αραιωμένο 1:3000. Η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα για 15 λεπτά και ύστερα αφήνεται O/N στους 4°C. Εναλλακτικά αναδεύεται για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Ακολουθούν δύο ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα PBS-Tween: 100 ml PBS + 500μl Tween.
- 4) Προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα, κατσικίσιο έναντι ποντικίσιων αντισωμάτων, αραιωμένο 1:3000 με διάλυμα γάλακτος 2% σε PBS-Tween και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το δεύτερο αντίσωμα έχει ενσωματωμένο πάνω την υπεροξειδάση του H₂O₂.
- 5) Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με PBS-Tween ανά 10 λεπτά.

6) Απομακρύνεται το διάλυμα PBS-Tween και επωάζεται η μεμβράνη για 1h με το παρακάτω μίγμα:

- 10 ml λουμινόλη
- 100 μl κουμαρικό οξύ
- 30 μl 3% H₂O₂

Η υπεροξείδωση του H₂O₂, που υπάρχει στο δεύτερο αντίσωμα, καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης. Η οξειδωμένη λουμινόλη εκπέμπει φως το οποίο αποτυπώνεται σε CL Xposure φιλμ (Εικόνα 24). Γίνονται εμφανίσεις σε διαφορετικούς χρόνους έτσι ώστε ανάλογα με την ένταση του σήματος να έχουμε το καλύτερο αποτέλεσμα.



Εικόνα 24. Ανίχνευση σήματος στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την αντίδραση της λουμινόλης.

3.2.6. Βιοχημικός χαρακτηρισμός της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

3.2.6.1 Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου: pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση δισθενών μεταλλικών ιόντων και άλατος

Το κλάσμα με το καθαρό ένζυμο συλλέχθηκε και ακολούθησε διαπύδηση ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM για 24 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Στην συνέχεια, το ένζυμο φυλάγεται στους -20 °C σε 20% γλυκερόλη.

Για τον προσδιορισμό βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου έγιναν πειράματα υδρόλυσης σε τιμές pH: 6, 6,7, 7, 7,2, 7,6 και 8,2, στις θερμοκρασίες: 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C και 50°, σε συγκέντρωσης ιόντων Zn²⁺: 0, 50, 100, 150, 200, 300 και 500μM, ιόντων Mg²⁺ και Mn²⁺: 50 και 100μM και συγκεντρώσεις KCl: 0, 1, 10, 25, 50 και 100mM. Ως ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας χρησιμοποιήθηκε Hepes 50mM και ως υπόστρωμα το αντιβιοτικό νιτροσεφίνη 47,5 μM για την επίδραση του pH και της θερμοκρασίας και πενικιλίνη 500μM για την επίδραση μεταλλικών ιόντων και άλατος. Όλα τα πειράματα έγιναν σε τελικό όγκο 1ml και σε χρονικό διάστημα 1 λεπτό. Στη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε νιτροσεφίνη μετρήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 486nm, που αντιπροσωπεύει το σχηματισμό προϊόντος, ενώ για την πενικιλίνη μετρήθηκε η μείωση της απορρόφησης στα 235nm, το οποίο αντιπροσωπεύει την κατανάλωση του υποστρώματος. Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε στο βέλτιστο pH και αυτή των μεταλλικών ιόντων και άλατος στο βέλτιστο pH και βέλτιστη θερμοκρασία.

3.2.7. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της VIM-12

Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα τα αντιβιοτικά: πενικιλίνη G, αζτρεονάμη, ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενζύμου με την μέθοδο Bradford. Για κάθε αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις με έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις, αναλόγως,

και μελετήθηκε η κατανάλωση του υποστρώματος (ως μείωση της απορρόφησης) σε σχέση με το χρόνο, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ενζύμου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 50 mM, pH 6,7 και θερμοκρασία 40°C σε τελικό όγκο 1 ml. Για κάθε αντιβιοτικό κατασκευάστηκε πρώτητη καμπύλη συγκέντρωσης – απορρόφησης για να μπορεί να γίνει η αντιστοίχιση των τιμών απορροφήσεων σε συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Οι συγκεντρώσεις κάθε αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκαν και τα ανάλογα μήκη κύματος που έγινε ο προσδιορισμός καταγράφονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και μήκη κύματος στα οποία μελετήθηκε η υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου.

Αντιβιοτικό	Συγκεντρώσεις (μM)						nm
Penicilline G	250	500	750	1000			235
Aztreonam	100	200	300	400			292
Imipeneme	10	30	50	100			299
Meropeneme	10	20	30	50	75	100	299

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και ένα πείραμα ελέγχου στο οποίο παρατηρήθηκε η υδρόλυση της πενικιλίνης 500 μM χρησιμοποιώντας στη μία περίπτωση εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων BL21 αφού έγινε η επαγωγή με IPTG και στην άλλη χωρίς να έχει γίνει επαγωγή. Και στις δύο περιπτώσεις η ποσότητα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ίδια. Η αντίδραση έγινε στις βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας τελικό όγκο 1 ml.

Στη συνέχεια, για κάθε αντιβιοτικό κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου της αντίδρασης τοποθετώντας στον άξονα ψ τις διαφορές απορρόφησης, που αντιπροσωπεύουν την κατανάλωση του υποστρώματος, και στον άξονα χ το χρόνο. Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος υπολογίστηκε η αρχική ταχύτητα V_0 από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης και κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten (V_0 σε συνάρτηση $[S]$). Ακολούθησε ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων K_M και V_{max} με

βάση την εξίσωση Michaelis Menten με την βοήθεια του στατιστικού πακέτου επεξεργασίας GraphPadPrism

3.2.8. Επίδραση αναστολέων στην δράση της VIM-12

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναστολής του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα πενικιλίνη 500 μM και ως αναστολείς τα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, επώαστηκε το ένζυμο για 10 λεπτά με συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200 και 500 μM μεροπενέμης, 100, 200 και 500 μM ιμιπενέμης, 100, 200, 500 και 1000 μM αζτρεονάμης. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε η υδρόλυση της πενικιλίνης για 10 λεπτά ως μείωση της απορρόφησης στα 235 nm. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ήταν η ίδια και σταθερή. Από τις μετρήσεις που έγιναν κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου υδρόλυσης της πενικιλίνης απουσία αναστολέα και παρουσία κάθε αναστολέα για κάθε συγκέντρωσή του.

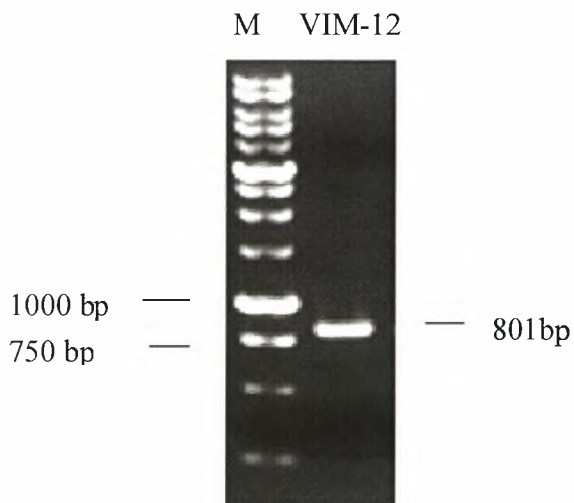
3.2.9. Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής για κάθε αναστολέα

Για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις πενικιλίνης 100, 250, 500, 750 και 1000 μM . Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων ήταν 10 μM για την μεροπενέμη, 100 μM για την ιμιπενέμη και 100 μM για την αζτρεονάμη. Για κάθε αναστολέα κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου της αντίδρασης για τις πέντε συγκεντρώσεις πενικιλίνης και από αυτές υπολογίστηκε η V_0 από την κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης. Κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten απουσία και παρουσία κάθε αναστολέα (V_0 σε συνάρτηση [S]) και υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες κινητικές παράμετροι (K_M , V_{\max} και K_{Mi} και $V_{\max i}$) με βάση την εξίσωση Michaelis Menten χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο επεξεργασίας GraphPadPrism. Κατασκευάστηκε επίσης, το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της υδρόλυσης της πενικιλίνης απουσία και παρουσία των αναστολέων. Για την μεροπενέμη και την αζτρεονάμη υπολογίστηκαν οι σταθερές αναστολής.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

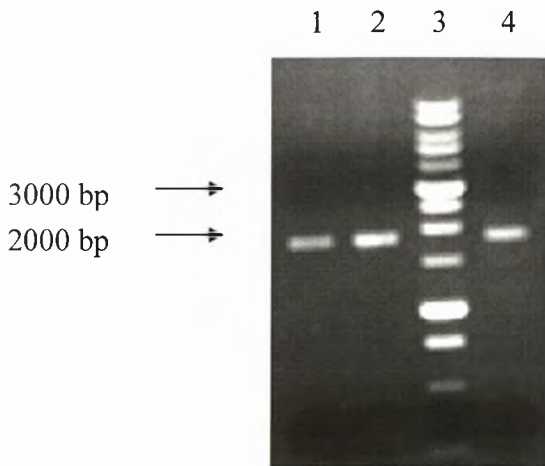
4.1. Ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου VIM-12

Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτική αγαρόζης έδειξε την παρουσία μίας καθαρής ζώνης DNA στο αναμενόμενο μέγεθος, 801bp (Εικόνα 25). Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στο μέγεθος του γονιδίου VIM-12. Το συγκεκριμένο DNA εκχυλήθηκε από το gel αγαρόζης και 2 μl από αυτό χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση σύνδεσης με τον φορέα pGem – T Easy Vector. 10μl από την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν για το μετασηματισμό επιδεικτικών κυττάρων DH5α.



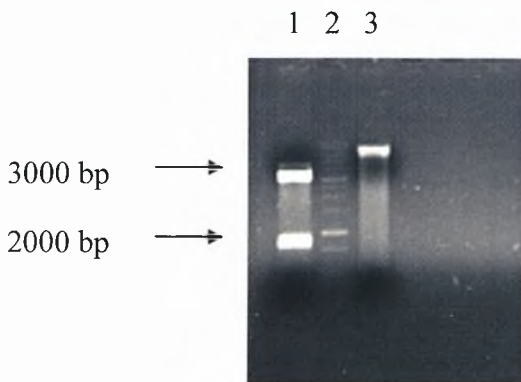
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR. Στην πρώτη σειρά είναι ο μάρτυρας μεγεθών και στη δεύτερη σειρά το προϊόν μας.

Μετά από 24ωρη επώαση των κυττάρων στους 37°C επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες από τις οποίες έγινε πλασμιδιακή απομόνωση (Εικόνα 26). Το πλασμιδιακό DNA ελέγχθηκε για την ύπαρξη του γονιδίου VIM-12, με ανάλυση με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI.



Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση μετά από πλασμιδιακή απομόνωση. Στις σειρές 1, 2, 4 είναι διαφορετικές αποικίες κυττάρων *E.coli*.

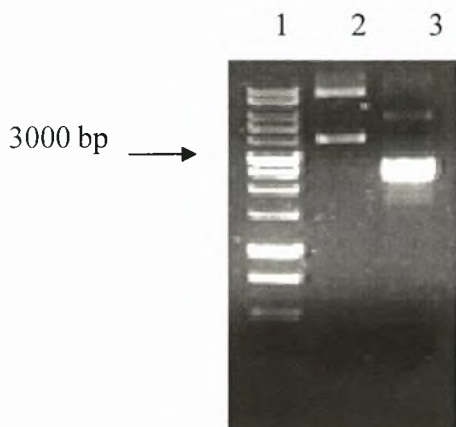
Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν κόβων στα δύο άκρα του γονιδίου κι έτσι η ηλεκτροφόρηση έδειξε την ύπαρξη δύο ζωνών. Η μία ζώνη αντιστοιχεί στο ανοιχτό φορέα pGem-T Easy (3000 bp) και η άλλη ζώνη αντιστοιχεί στο γονίδιο VIM-12 που έχει μέγεθος 801bp (Εικόνα27).



Εικόνα 27. Πέψη πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα DH5α. Σειρά 1: φορέας μετά από πέψη, σειρά 3: φορέας πριν την πέψη.

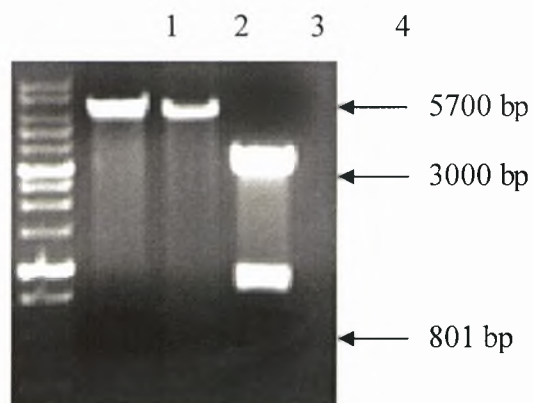
Οι αποικίες στις οποίες διαπιστώθηκε η ύπαρξη του γονιδίου VIM-12 φυλάχτηκαν σε γλυκερόλη στους -80°C . Η μία αποικία καλλιεργήθηκε O/N, όπως και κύτταρα που

περιείχαν το φορέα pET 15b, και χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Εικόνα 28).



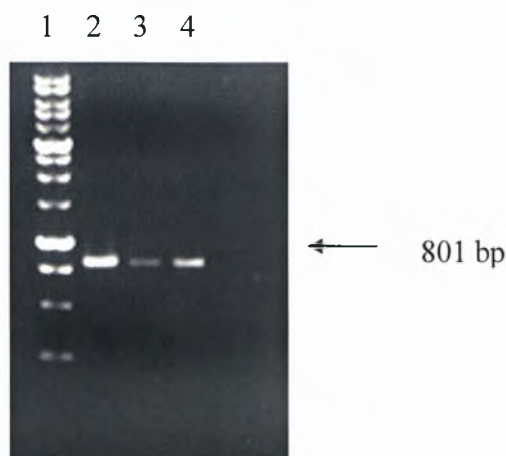
Εικόνα 28. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα DH5α που έχουν το φορέα pGEM μαζί με το γονίδιο VIM-12 (2), και από κύτταρα που περιέχουν το φορέα pET 15b. Στη σειρά 1 είναι ο μάρτυρας μορακών μεγεθών.

Έγινε ανάλυση με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI στο πλασμιδιακό DNA που περιείχε το γονίδιο VIM-12 και στο φορέα pET 15b. Μετά από ηλεκτροφόρηση, η ζώνες DNA που αντιστοιχούσαν στο ανοιχτό φορέα pET 15b (5708bp) και στο γονίδιο VIM12 (801bp) εκχυλήθηκαν (Εικόνα 29). Το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση σύνδεσης γονιδίου VIM12 και του φορέα pET 15b.



Εικόνα 29. Πέψη με ένζυμα περιορισμού του φορέα pET 15b (σειρά 2, 3) και πλασμιδιακού DNA που περιέχει το φορέα pGEM με το γονίδιο VIM-12 (σειρά 4).

8μl από την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό πειραματικών κυττάρων BL21. Τα κύτταρα επώστηκαν στους 37°C O/N και από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA. Ο έλεγχος για την ύπαρξη του γονιδίου VIM-12 έγινε με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που είχαμε σχεδιάσει για το γονίδιο VIM-12. Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR έδειξε την ύπαρξη μιας μπάνας με μέγεθος 801bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο VIM-12 (Εικόνα 30).

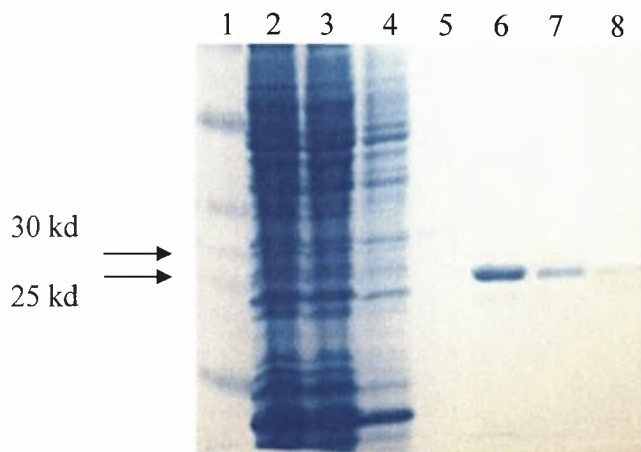


Εικόνα 30. Η ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR που πραγματοποιήθηκε σε πλασμιδιακό DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα BL 21.

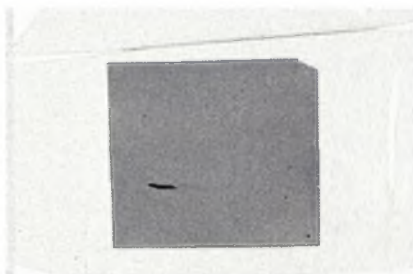
4.2. Υπερέκφραση, καθαρισμός και ανίχνευση της VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάσης

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης έγινε στους 30°C για 4 ώρες με την προσθήκη IPTG. Μετά την θραύση των κυττάρων και το καθαρισμό της πρωτεΐνης σε στήλη NT-A-In η ανίχνευσή της έγινε δυνατή τόσο με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 31), όσο και με τη τεχνική Western Blotting (Εικόνα 32). Στη πηκτή πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφορήθηκαν το υπερκείμενο μετά από την φυγοκέντρηση στα 10000g, οι απομονωμένες πρωτεΐνες μετά την έκπλυση και μετά

την έκλουση. Στη στήλη που αντιστοιχεί στην έκλουση παρατηρείται η ύπαρξη μίας έντονης μπάντας που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη μας. Η τεχνική Western Blotting επιβεβαίωσε την ύπαρξη της VIM-12.



Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Μάρτυρας μοριακών μεγεθών: σειρά 1, υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση: σειρά 2, υπερκείμενο μετά από το πέρασμά του στη στήλη: σειρά 3, δείγματα που προκύπτουν από την έκπλυση: σειρά 4,5 καδείγματα που προκύπτουν από την έκλουση σειρά 6,7,8.

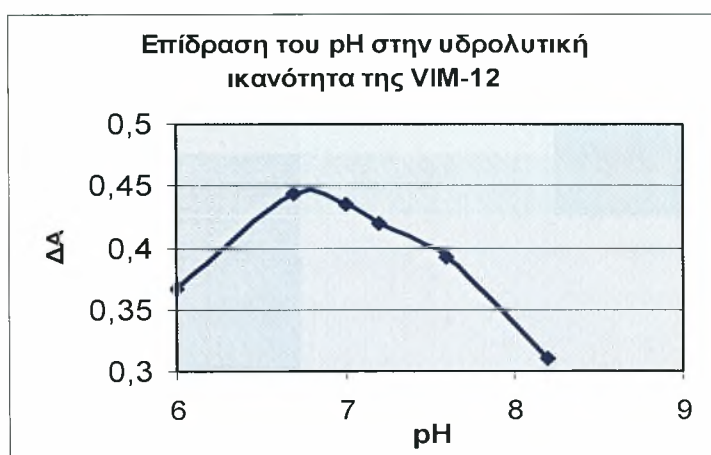


Εικόνα 32. Ανίχνευση της απομονωμένης VIM-12 λακταμάσης με τη τεχνική ανοσοαποτύπωσης..

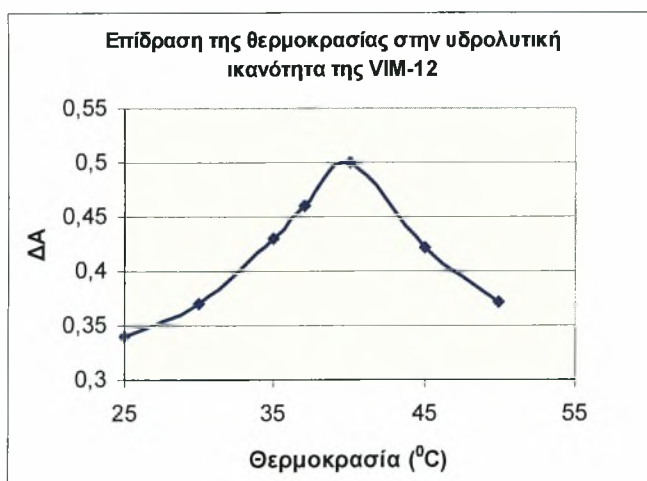
4.3 Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών δράσης της VIM-12

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της VIM-12 έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες δράσης για το ένζυμο αυτό είναι το pH 6,7 (Εικόνα 33) και η θερμοκρασία 40°C (Εικόνα 34).

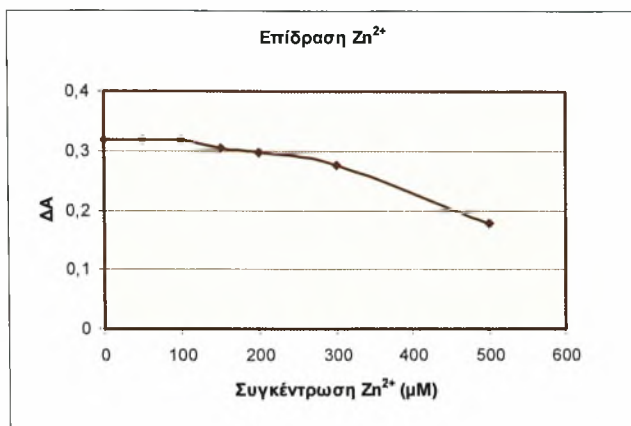
Όσον αφορά την επίδραση όντων Zn, σε συγκεντρώσεις 50 και 100μM δεν επηρεάστηκε η υδρολυτική ικανότητα της VIM-12, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες επιδρούν αρνητικά μειώνοντας την δράση της (Εικόνα 35).



Εικόνα 33. Προσδιορισμός βέλτιστου pH δράσης της VIM-12.

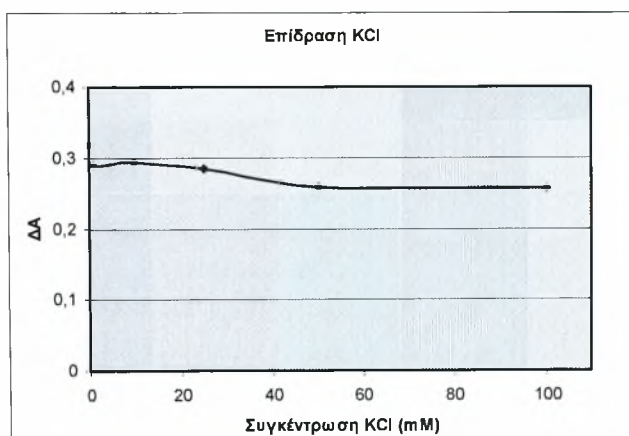


Εικόνα 34. Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας στη δράση της VIM-12.



Εικόνα 35. Ο ρόλος των ιόντων ψευδαργύρου στη δράση της VIM-12.

Η προσθήκη του KCl μείωσε την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου όπως φαίνεται και στην εικόνα 36.

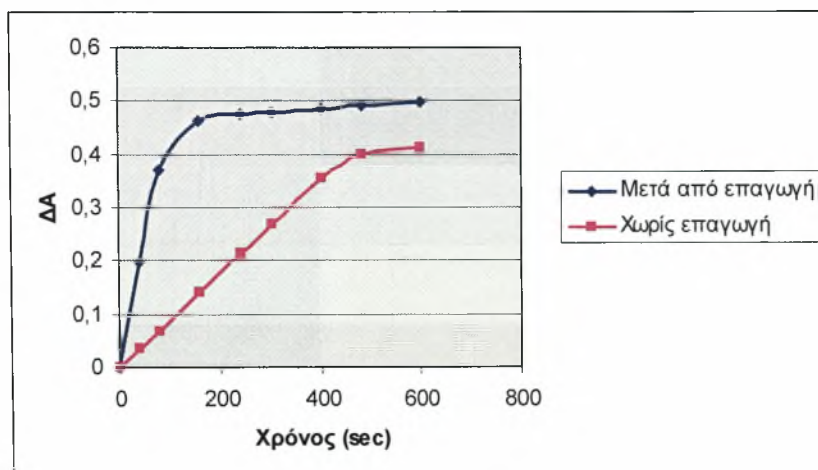


Εικόνα 36. Επίδραση του KCl στην υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου.

Η αντικατάσταση των ιόντων Zn με ιόντα Mn και Mg σε συγκεντρώσεις 50 και 100 μM είχε την ίδια επίδραση στην υδρολυτική ικανότητα της VIM-12 όπως και τα ιόντα Zn.

4.4. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-12

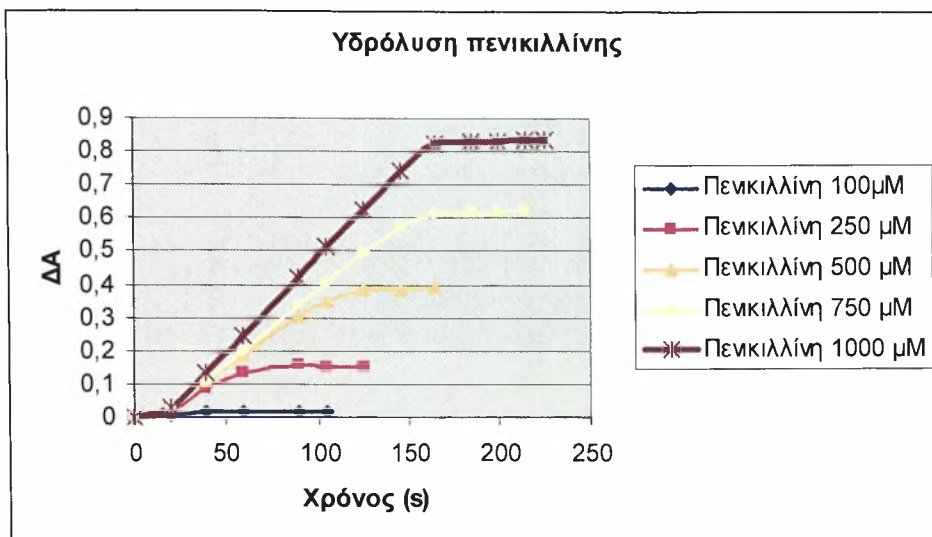
Το πείραμα ελέγχου που πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα την πενικιλίνη έδειξε ότι στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από μετασχηματισμένα κύτταρα BL21 χωρίς να έχει γίνει επαγωγή με IPTG, ο ρυθμός υδρόλυσης του αντιβιοτικού ήταν πολύ πιο χαμηλός σε σύγκριση με την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα μετά από επαγωγή (Εικόνα 37).



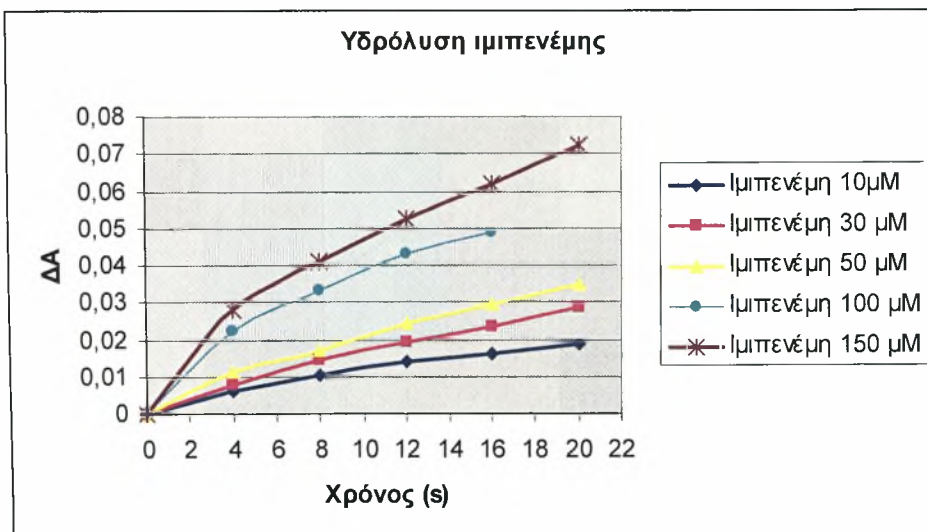
Εικόνα 37. Υδρόλυση πενικιλίνης χωρίς και μετά από επαγωγή.

Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη μας υπερεκφράζεται και ότι η υδρόλυση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων οφείλεται σ' αυτή.

Η μελέτη υδρόλυσης των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν έδειξε ότι το ένζυμο υδρόλυσε αρκετά καλά την πενικιλίνη και λιγότερο την ιμιπενέμη. Για την μεροπενέμη και την αζιτρεονάμη δεν παρατηρήθηκε υδρόλυση. Έτσι, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προόδου της αντίδρασης για την πενικιλίνη και την ιμιπενέμη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Εικόνες 38,39), όπως αναφέρθηκαν στην ενότητα 3.2.7., και από αυτές υπολογίστηκε η V_0 για κάθε συγκέντρωση και για τα δύο αντιβιοτικά.

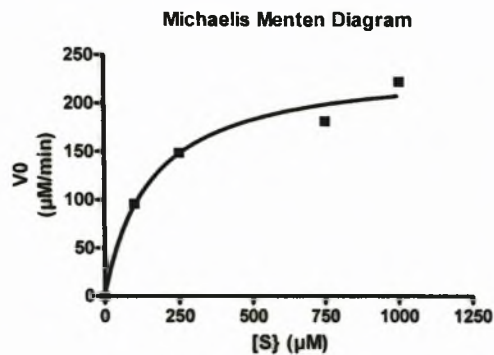


Εικόνα 38. Καμπύλες προόδου υδρόλυσης της πενικιλίνης σε συγκεντρώσεις 250, 500, 750 και 1000μΜ.

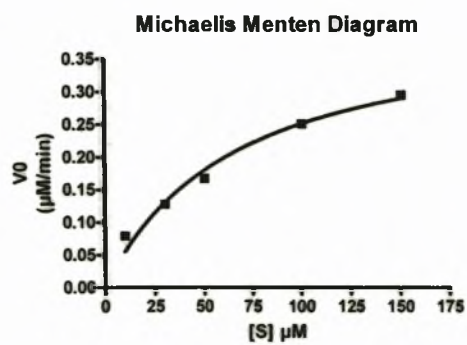


Εικόνα 39. Καμπύλες προόδου υδρόλυσης της πενικιλίνης σε συγκεντρώσεις 10, 30, 50 και 1000μΜ.

Με τις τιμές V_0 που βρέθηκαν κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten για την πενικιλίνη και την ιμιπενέμη (Εικόνες 40, 41).



Εικόνα 40. Διάγραμμα Michaelis Menten για την πενικιλίνη.



Εικόνα 41. Διάγραμμα Michaelis Menten για την ιμιπενέμη.

Οι κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση Michaelis Menten ήταν για την πενικιλίνη:

$$K_M = 156,4 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 240,5 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_{\text{cat}} = 44,80 \text{ s}^{-1}$$

$$K_{\text{cat}} / K_M = 28,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Και για την ιμιπενέμη:

$$K_M = 66 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 0,22 \mu\text{M}/\text{min}$$

$$K_{\text{cat}} = 0,0012 \text{ s}^{-1}$$

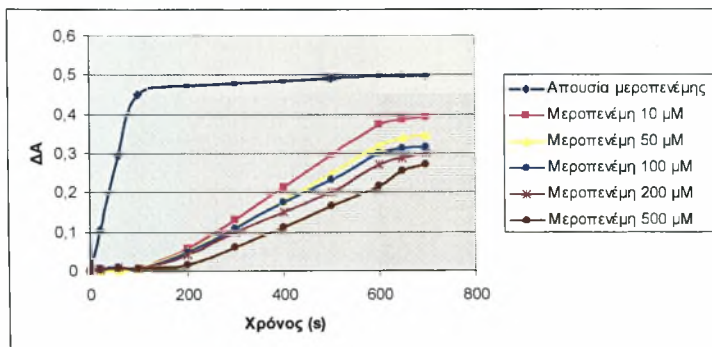
$$K_{\text{cat}} / K_M = 18,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

4.5 Επίδραση αναστολέων στην δράση της VIM-12 και ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής

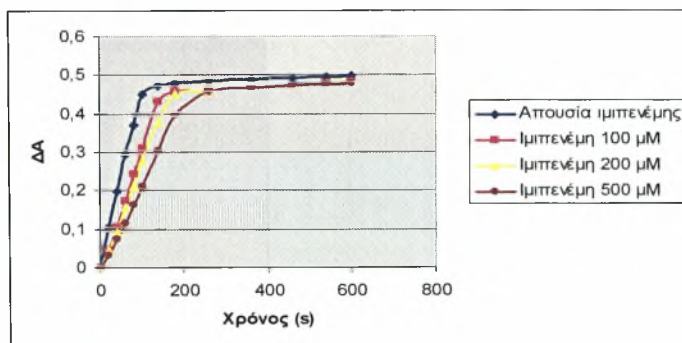
Τα πειράματα αναστολής που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έδειξαν και τα τρία αντιβιοτικά δρουν ως αναστολείς (Εικόνες 42, 43, 44). Για τον προσδιορισμό του είδους αναστολής που παρατηρήθηκε όπως και των σταθερών αναστολής, από τις καμπύλες υδρόλυσης διαφορετικών συγκεντρώσεων πενικιλίνης απουσία και παρουσία αναστολέων, υπολογίστηκαν οι αρχικές ταχύτητες V_0 με τις οποίες κατασκευάστηκε το διάγραμμα Michaelis Menten (Εικόνα 45). Οι κινητικές παράμετροι που βρέθηκαν, σε κάθε περίπτωση, με βάση την εξίσωση Michaelis Menten παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Κινητικές παράμετροι που υπολογίστηκαν για την πενικιλίνη απουσία και παρουσία αναστολέων.

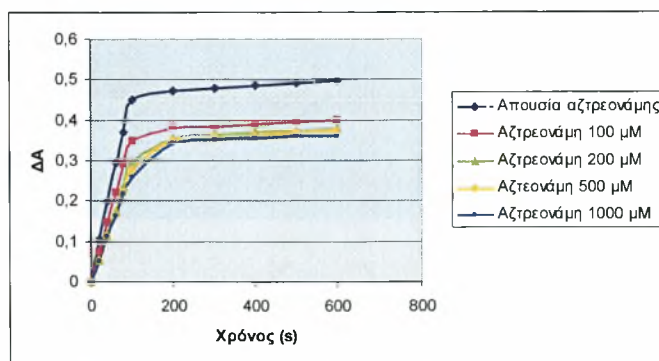
	Απουσία αναστολέα	Παρουσία μεροπενέμης	Παρουσία ιμιπενέμης	Παρουσία αζτρεονάμης
K_M (μM)	156,4	165	194,2	208,9
V_{\max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	240,5	58,86	180,3	144,2



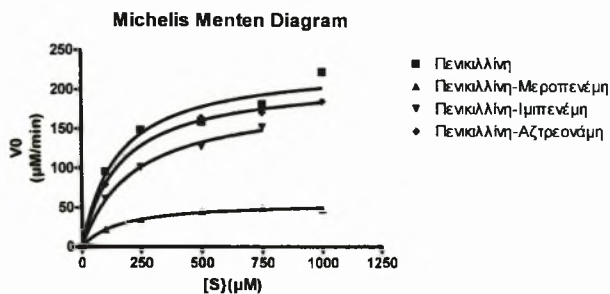
Εικόνα 42. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μεροπενέμης, ως αναστολέας στην υδρόλυση της πενικιλίνης.



Εικόνα 43. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιπενέμης, ως αναστολέας στην υδρόλυση της πενικιλίνης.

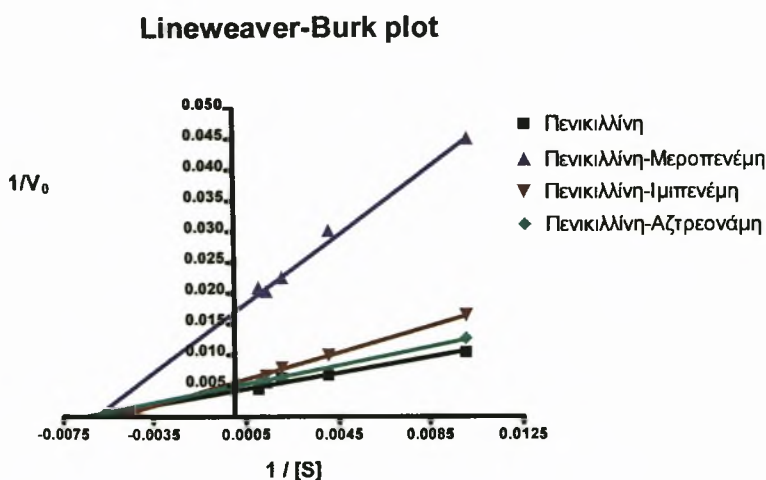


Εικόνα 44. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αζτρεονάμης, ως αναστολέας στην υδρόλυση της πενικιλίνης.



Εικόνα 45. Διάγραμμα Michaelis-Menten που παρουσιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση υποστρώματος για την πενικιλίνη απουσία αναστολέα και παρουσία μεροπενέμης, ιμιπενέμης και αζτρεονάμης.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεράναμε ότι ημεροπενέμη και η αζτρεονάμη δρουν σαν μη συναγωνιστικοί αναστολείς μειώνοντας την V_{max} της αντίδρασης, ενώ η ιμιπενέμη δρα ως ένας μικτός αναστολέας περισσότερο μειώνοντας την V_{max} και μειώνοντας την V_{max} αυξάνοντας την K_M του ενζύμου για την πενικιλίνη, όπως απεικονίζονται και στο διάγραμμα Lineweaver-Burk (Εικόνα 46).



Εικόνα 46. Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου απουσία και παρουσία αναστολέων.

Για την μεροπενέμη και την αζτρεονάμη που δρουν ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς υπολογίστηκαν και οι σταθερές αναστολής σύμφωνα με τον τύπο:

$$V_{\max i}/V_{\max} = K_i/(K_i + [I])$$

Όπου $V_{\max i}$ είναι η V_{\max} παρουσία του αναστολέα, K_i είναι η σταθερά αναστολής και $[I]$ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα. Οι τιμές που βρέθηκαν είναι για την μεροπενέμη:

$$K_i = 3,24 \mu\text{M}$$

Και για την αζτρεονάμη:

$$K_i = 661,1 \mu\text{M}$$

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι βακτηριακές λοιμώξεις αποτελούν ένα καθημερινό πρόβλημα με σημαντικές επιπτώσεις ειδικά σε νοσοκομειακούς ασθενείς. Η εμφάνιση και εξάπλωση των β-λακταμασών έχει εντείνει το πρόβλημα αυτό και προκαλεί ανησυχία, από κλινικής άποψης, καθώς προκύπτουν στελέχη πολυανθεκτά που καθιστούν άχρηστα πολλά β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες αποτελούν μία κατηγορία λακταμασών με ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να υδρολύουν, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες, οι οποίες έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά. Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε μεταθετά γενετικά στοιχεία διευκολύνοντας έτσι την εξάπλωσή τους ανάμεσα στα διάφορα βακτήρια.

Στην παρούσα εργασία κλωνοποιήθηκε και απομονώθηκε μία καινούργια μεταλλο-β-λακταμάση, η VIM-12, και στην συνέχεια ακολούθησε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου αυτού. Η VIM-12 είναι ένα υβρίδιο των VIM-1 και VIM-2 μεταλλο-β-λακταμασών και παρουσιάζει ενδιαφέρον ο προσδιορισμός κινητικών της παραμέτρων και η σύγκρισή τους.

Η μελέτη της υδρολυτικής ικανότητας της VIM-12 σε διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας, συγκέντρωσης ιόντων Zn^{2+} και άλατος οδήγησε στον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης του ενζύμου. Η VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάση παρουσιάζει την μεγαλύτερη υδρολυτική ικανότητα σε pH 6,7 και θερμοκρασία 40°C. Τα ιόντα ψευδαργύρου δεν φάνηκε να επηρεάσουν την δράση του ενζύμου σε συγκεντρώσεις 50 και 100 μM, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις την επηρεάζουν αρνητικά. Αυτό ίσως να οφείλεται σε κάποια αλλαγή που μπορεί να συμβεί στον προσανατολισμό κάποιων αμινοξέων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση, λόγω αυξημένης συγκέντρωσης

ιόντων Zn^{2+} . Επίσης, οι αυξημένες συγκεντρώσεις άλατος επηρέασαν αρνητικά την υδρολυτική ικανότητα της VIM-12. Προφανώς στις αυξημένες συγκεντρώσεις KCl το ένζυμο αρχίζει και μετουσιώνεται χάνοντας έτσι, την δραστικότητά της. Η αντικατάσταση των ιόντων Zn από ιόντα Mg και Mn δεν έφερε κάποια αλλαγή στην δραστικότητα του ενζύμου. Τα πειράματα υδρόλυσης έδειξαν ότι, από τα τέσσερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, η πενικιλίνη ήταν ένα σχετικά καλό υπόστρωμα για το ένζυμο, ενώ τα υπόλοιπα συμπεριφέρθηκαν ως δύσκολα υποστρώματα με την ιμιπενέμη να υδρολύεται ελάχιστα. Από τη σύγκριση των κινητικών παραμέτρων της VIM-12 με τις VIM-1 και VIM-2 μεταλλο-β-λακταμάσες για την πενικιλίνη και την ιμιπενέμη προκύπτουν διαφορές Πίνακες 6 και 7.

Η VIM-12 παρουσιάζει μία ενδιάμεση K_M και k_{cat} για την πενικιλίνη σε σύγκριση με τα άλλα δύο ένζυμα. Για την ιμιπενέμη η K_M της είναι αρκετά αυξημένη από αυτή των άλλων δύο ενζύμων και ο αριθμός μετατροπής κατά πολύ μικρότερος. Η μεροπενέμη, ενώ είναι καλό υπόστρωμα για το τη VIM-1 και VIM-2 (Πίνακας 8), δεν υδρολύεται από την VIM-12.. Στην προσπάθεια να ερευνηθούν περαιτέρω οι κινητικές ιδιότητες της VIM-12 έγιναν τα πειράματα αναστολής τα οποία έδειξαν ότι η μεροπενέμη και η αζτρεονάμη δεν δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά σε κάποια άλλη θέση ασκώντας μη συναγωνιστική δράση, ενώ η ιμιπενέμη δεσμεύεται και στο ενεργό κέντρο και σε άλλη θέση παρουσιάζοντας μικτή δράση.

Πίνακας 6. Σύγκριση κινητικών παραμέτρων των VIM1, VIM-2 και VIM-12 μεταλλο-β-λακταμασών για την πενικιλίνη.

Ένζυμο	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M / k_{cat} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
VIM-1	841 ± 40	29 ± 2	$3,4 \times 10^4$
VIM-2	49	55,8	114×10^4
VIM-12	156	44,8	$28,6 \times 10^4$

Πίνακας 7. Σύγκριση κινητικών παραμέτρων των VIM1, VIM-2 και VIM-12 μεταλλο-β-λακταμασών για την ιμιπενέμη.

Ένζυμο	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M / k_{cat} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
VIM-1	1,5	2	$1,3 \times 10^6$
VIM-2	10	9,9	99×10^4
VIM-12	66	0,0012	18,1

Πίνακας 8. Κινητικές παράμετροι της VIM-1 και VIM-2 για την μεροπενέμη

Ένζυμο	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M / k_{cat} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
VIM-1	48	13	$2,7 \times 10^5$
VIM-2	5	1,4	28×10^5

Η αζτρεονάμη παραμένει ένα δύσκολο υπόστρωμα και για τις τρεις μεταλλοβ-λακταμάσες.

Οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται στις κινητικές παραμέτρους της VIM-12 μπορούν να εξηγηθούν με αλλαγές που πιθανόν έχουν συμβεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα η μεροπενέμη σαν μεγαλύτερο μόριο από την πενικικλίνη να μη μπορεί να δεσμεύεται σ' αυτό, όπως και η ιμιπενέμη να δεσμεύεται με χαμλότερη συγγένεια. Επίσης, οι αλλαγές που πιθανόν να έχουν συμβεί στην τρισδιάστατη δομή του ενζύμου μπορεί να έχουν δημιουργήσει μία άλλη θέση δέσμευσης για τα υποστρώματα αυτά με αποτέλεσμα να δρουν με μη συναγωνιστικό τρόπο.

Σίγουρα θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες για την διευκρίνηση των κινητικών ιδιοτήτων του ενζύμου, όπως και μελέτες δομής, που θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των διαφορών που παρατηρούνται στη υδρολυτική ικανότητα της VIM-12. Επίσης, επιπλέον μελέτες χρησιμοποιώντας και άλλα αντιβιοτικά θα βοηθήσουν στη δημιουργία μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας σχετικά με το φάσμα υποστρωμάτων του ενζύμου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Baron Samuel. Bacterial resistance. *Medical Microbiology*, 4th Edition.
2. Cohen Jonathan, Powderly William G. **Infectious Diseases**. Second Edition.
3. Franceschini Nicola, Caravelli Berardo, Docquier Jean-Denis, Galleni Moreno, Frère Jean-Marie, Amicosante Gianfranco and Rossolini Gian Maria. (2000) Purification and Biochemical Characterization of the VIM-1 Metallo-β-Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (3003-3007)
4. Gomes Cláudio M., Frazão Carlos, Xavier António V., Legall Jean and Teixeira Miguel. (2002) Functional control of the binuclear metal site in the metallo-β-lactamase-like fold by subtle amino acid replacements. *Protein Sci*. 11 (707-711)
5. Heinz U., Adolph H.W. (2004) Metallo-β-lactamases: two binding sites for one catalytic metal ion? *Cell. Mol. Life Sci*. 61 (2827-2839).
6. Krauss M., Gilson H. S. R., Gresh N. (2001) Structure of the First Shell Active Site in Metallo-lactamase: Effect of Water Ligands *J. Phys. Chem*. 105 (8040-4049).
7. Laraki Nezha, Franceschini Nicola, Rossolini Gian Maria, Santucci Pasqualino, Meunier Cécile, de Pauw Edwin, Amicosante Gianfranco, Frère Jean Marie and Galleni Moreno. (1999) Biochemical Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/147 Metallo-beta-Lactamase Produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43 (902-906).
8. Lauretti Laura, Riccio Maria Letizia, Mazzariol Annarita, Cornaglia Giuseppe, Amicosante Gianfranco, Fontana Roberta and Rossolini Gian Maria. (1999) Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo-β-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p1584-1590.

9. Murphy Tanya A., Simm Alan M., Toleman Mark A., Jones Ronald N., and Walsh Timothy R. (2003) Biochemical Characterization of the Acquired Metallo- β -Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***. Vol.47, p. 582-587.
10. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. **Φαρμακολογία**. (2000).
11. Poirel Laurent, Naas Thierry, Nicolas Delphine, Collet Louis, Bellais Samuel, Cavallo Jean-Didier and Nordmann Patrice. (2000) Characterization of VIM₂, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa*. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***. p. 891-897.
12. Pournaras Spyros, Ikonomidis Alexandros, Tzouvelekis Leonidas S., Tokatlidou Despoina, Spanakis Nicholas, Maniatis Antonios N., Legkis Nicholas J. and Tsakris Athanassios. (2005) VIM-12, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae* That Resembles a VIM-1/VIM-2 Hybrid. ***Antimicrobial Agents and Chemotherap.*** Vol.49 (5153-5156).
13. Wang Zhigang, Fast Walter, Valøntine Ann M. and Benkovic Stephen J. (1999) Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*. p 614-622.

