

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YENİ BİR ANTİMİKROBİYAL TEDAVİ YAKLAŞIMI OLARAK**  
**İNSAN SERUM PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN KULLANILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Aynur AYBEY**

**Balıkesir, Ocak-2010**

**“Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 108T263 nolu hızlı destek projesi ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YENİ BİR ANTİMİKROBİYAL TEDAVİ YAKLAŞIMI OLARAK  
İNSAN SERUM PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN KULLANILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aynur AYBEY

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma SİNAN

Sınav Tarihi: 05.01.2010

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Selma SİNAN (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN (BAÜ)

Balıkesir, Ocak -2010

## ÖZET

### YENİ BİR ANTİMİKROBİYAL TEDAVİ YAKLAŞIMI OLARAK İNSAN SERUM PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN KULLANILMASI

Aynur AYBEY

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalı

(Yüksek Lisans tezi/Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma SİNAN)

Balıkesir, 2010

Son yıllarda laktonaz olarak da bilinen paraoksonaz enziminin bir çok patojen bakteri tarafından kullanılan sinyal moleküllerinin yıkımında rol alabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu amaçla çalışmamızda insan serum paraoksonaz 1 (PON1) enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Sepharose 4B-L-tyrosine-1-Naftilamin) yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzim SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant vermiştir.

Saflaştırılmış PON1 enziminin ticari olarak satın alınan N-hexa-L-homoserin lakton (C10-HSL) ve N-3-oxooktonoyil-L-homoserin lakton (3OC8-HSL) bileşikleri üzerindeki hidroliz etkisi HPLC analizleri ile gösterilmiştir. Sinyal moleküllerinin PON1 tarafından hidrolizinin Km ve Vmax değerleri tespit edilmiştir. Enzimin bu bileşikleri substrat olarak katalizlediği düşünülmektedir. Sırasıyla 3OC8HSL ve C10HSL için Km değerleri 2.714 mM ve 0.8 mM, Vmax değerleri 1428.57 U/ml dakika ve 45.24 U/ml dakika olarak hesaplanmıştır.

PON1 enziminin artan konsantrasyonuna bağlı olarak *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* bakteri üremelerini azalttığı da tespit edilmiştir. Ortamda enzimin etki edeceği sinyal molekülü konsantrasyonunun bakteri konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu göz önüne alınırsa enzimin sinyal molekülünü hidrolizlemek suretiyle bakteri üremesini azalttığı düşünülmektedir.

Quorum quenching ajanı olan PON1 enziminin birçok bakterinin türe özgü davranışlarından olan *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi ile sinyal moleküllerini yıktığı düşünülerek bakteriler arası iletişim olan Quorum sensing inhibisyonuna neden olduğu yapmış olduğumuz çalışmalarda gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Quorum sensing, quorum quenching, paraoksonaz1, laktonaz, sinyal molekülü

## ABSTRACT

### NEWLY ANTIMICROBIAL THERAPY BY USING HUMAN SERUM PARAOXONASE 1

Aynur AYBEY

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Msc. Thesis/Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Selma SİNAN)

Balikesir-Turkey, 2010

In the recent years, studies carried on by scientists showed that paraxonases enzymes, known as lactonase can play a role in degradation of signal molecules used by a number of pathogen bacteria. In our study to achieve this aim, human serum paraoksonaz1 (PON1) was purified by using ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography (Sepharose 4B-L-tyrosine-1-Naftilamin). Purified enzyme was shown a single band with 43 kDa in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Hydolysis effect of purified PON1 enzyme was shown on the N-hexa-L-homoserine lactone (C10-HSL) and N-3-oxooctonoyl-L-homoserine lactone (3OC8-HSL) compounds that are commercial with HPLC analysis. The Km and Vmax values of hidrolisis effect of signal molecules by PON1 enzyme were determined. Enzyme was thought to catalyze these compounds as substrate. The Km values of 3OC8HSL and C10HSL were calculated as 2.714 mM ve 0.8 mM, V<sub>max</sub> values were calculated as 1428.57 U/ml min and 45.24 U/ml min, respectively.

We determined that the reduction of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* bacterial reproduction according as increasing of PON1 enzyme concentration. Considering that signal molecule concentration that enzyme effects is parallel with bacterial concentration, bacteria reproduction is reduced by the enzyme hydrolyzes the signal molecules. Effect of PON1 enzyme as Quorum quenching agent on *P. aeruginosa* biofilm formation which is various bacteria's actions belong to species was investigated.

In this study, it is shown that PON1 enzyme via lactonase activity is responsible for inhibition of quorum sensing by hydrolyzes of signal molecules.

**Key words:** Quorum sensing, quorum quenching, paraoxonase 1, lactonase, signal molecule.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>v</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>xv</b>
1. GİRİŞ	1
1.1. Quorum Sensing (salt çoğunluğu algılama)	2
1.1.1. QS Mekanizmasında Kullanılan Sinyal Molekülleri (Otoindükleyiciler)	3
1.1.2. QS Mekanizmasının Çeşitleri	6
1.1.2.1. Gram-Negatif Bakterilerde LuxI-LuxR Tip Çevreyi Algılama Sistemi	7
1.1.2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'da LasI/LasR-RhlI/RhlR Çevreyi Algılama Sistemi	12
1.1.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve Biyofilmler	16
1.1.2.4. <i>P. aeruginosa</i> 'da Çevreyi Algılama Sisteminin Önemi	19
1.2. Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası	20
1.2.1. Adlandırılması	20
1.2.2. Paraoksonaz Enziminin Genel Özellikleri Özellikleri ve Yapısı	20
1.2.3. Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonları	24
1.2.4. Enzimin Katalitik Mekanizması	27
1.2.5. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	28
1.2.6. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması	32
1.2.7. PON Enziminin Saflaştırılması	33
1.3. Quorum Quenching( Yeterlilik Bastırma )	34
1.3.1. Quorum Sensing İnhibitörleri	36
1.3.2. Quorum Quenching ( QQ) Enzimleri	38

1.3.2.1. Prokaryotlarda Yeterlilik Bastıran ( QQ) Enzimler	38
1.3.2.2. Ökaryotlarda AHL Parçalayıcı Enzimler	39
2. MATERYAL VE METOD	43
2.1. Materyaller	43
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
2.1.2. Bakteri Suşları ve Besiyerleri	43
2.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	44
2.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerlerinin Hazırlanması	45
2.2. Metod	51
2.2.1. Kan Serumunun Ayrılması	51
2.2.2. Enzim Aktivite Tayini	51
2.2.3. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	51
2.2.4. Enzimin Saflaştırılması	52
2.2.4.1.Amonyum sülfat Çöktürme Aralığı	52
2.2.4.2.Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	53
2.2.4.3.Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	54
2.2.5. HPLC Analizi	56
2.2.6. Optimum Şartlarda Sinyal Moleküllerine Ait $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	57
2.2.7. PON1'in <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ve <i>S. aureus</i> bakterilerinin üremesi üzerindeki etkinin gösterilmesi	57
2.2.8. PON1 enziminin <i>P. aeruginosa</i> biyofilm oluşumuna etkisi	59
2.2.8.1.PON1 enziminin <i>P. aeruginosa</i> olgun biyofilmlerine etkisi	60
2.2.8.2.PON1 enziminin gelişmekte olan <i>P. aeruginosa</i> biyofilmleri üzerine sürekli ilavesinin etkisi	60
2.2.8.3.PON1 enziminin <i>P. aeruginosa</i> biyofilmleri üzerine zamanın Etkisi	60



3.	BULGULAR	61
3.1.	PON1 Enziminin Saflaştırılması	61
3.1.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	61
3.1.2.	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	61
3.2.	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	64
3.3.	Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	65
3.4.	HPLC Analizleri ile Sinyal Molekülleri Yıkımı	66
3.5.	Optimum Şartlarda 3OC8HSL ve C10HSL Sinyal Moleküllerinin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	70
3.6.	PON1 Enziminin <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ve <i>S. aureus</i> Bakteri Üremelerine Etkisi	74
3.7.	PON1 Enziminin <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> ve <i>S. aureus</i> Üzerine Etkisinin Kantitatif Belirlenmesi	78
3.8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biyofilm Oluşum Evrelerinde PON1 Enziminin Etkileri	81
3.8.1.	Olgun Biyofilmlerde PON1 Enziminin Etkisi	81
3.8.2.	Biyofilm Gelişimi Boyunca PON1 Enziminin Sürekli İlavesinin Etkisi	82
3.8.3.	Gelişmekte Olan Biyofilmlerde PON1 Enziminin Zamana Bağlı Etkisi	84
4.	TARTIşMA VE SONUÇ	87
5.	KAYNAKLAR	95

## SEMBOL LiSTESi

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>
PON1	Paraoksonaz 1 enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N',N', -tetrametiletildiamin
QS	Quorum sensing
kDa	kilodalton
C10-HSL	N-hexa-L- homoserine lactone
3OC8-HSL	N-3-oxooctonoyl-L-homoserine lactone
HDL	Yüksek yoğunluktaki lipoprotein
AHL	Açıl-Homoserin Lakton
HSL	Homoserin lakton
OHHL	N-(3-okzohekzanoyil)-L-homoserin lakton
BHL	N-butanoyil-L-homoserin lakton
HBHL	N-(3-hidroksi butanoyil)-L-homoserin lakton
HHL	N-hekzanoyil-L-homoserin lakton
OOHL	N-(3-okzooktanoyil)-L-homoserin lakton
ODHL	N-(3-okzodekanoyil)-L-homoserin lakton
OdDHL	N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton
LDL	Düşük yoğunluktaki lipoprotein
QSI	Quorum sensing inhibitörü
QQ	Quorum quenching (yeterlilik bastırma)
FCS	Fetal Calf Serum
hPON	Human paraoksonaz
OD	Optik density

PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UV	Ultra viyole
U	Enzim ünitesi
AI	Otoindükleyici
PQS	<i>Pseudomonas</i> quinolone sinyal molekülü
EC	Enzim kodu
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)- 1piperazineethanesulfonic acid
TSB	Trypton soy broth
LB	Luria Bertani

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1.	3-oxo-C6-HSL	3
Şekil 1.2.	Homoserin lakton molekülleri	5
Şekil 1.3.	<i>Vibrio fischeri</i> 'de luxR-I tip çevreyi algılama sistemi ve ışık üretimi	8
Şekil 1.4.	<i>P. aeruginosa</i> 'da rhlI-R ve lasI-R çevreyi algılama Sistemleri	14
Şekil 1.5.	Bakteriyel biyofilmlerde sinyal molekülü ile iletişim	16
Şekil 1.6.	Paslanmaz çelikler yüzeylerde bakterilerin biyofilm oluşturma basamakları	17
Şekil 1.7.	İnsan Serum Paraoksonaz (PON 1) Enziminin Yapısı	21
Şekil 1.8.	Paraoksonaz Enzim Mekanizması	22
Şekil 1.9.	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü	23
Şekil 1.10.	PON1'in biyolojik etkilerinin düzenlenmesi	26
Şekil 1.11.	Paraoksonazın katalitik mekanizması	27
Şekil 1.12.	Lakton hidrolizi	29
Şekil 1.13.	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	31
Şekil 1.14.	Sinir gazlarının hidrolizi	31
Şekil 1.15.	Aromatik esterlerin hidrolizi	32

Şekil 1.16.	AHL deşredasyon yolları ve deşredasyon ürünleri	36
Şekil 1.17.	Doğal kaynaklardan quorum sensing inhibitörleri	37
Şekil 1.18.	Sentetik quorum sensing inhibitörleri	38
Şekil 2.1.	Hidrofobik jel sepharose 4B L tirozin 1 naftilamin	53
Şekil 2.2.	3-oxo-C8HSL ve C10HSL	57
Şekil 2.3. Düzenegi	Farklı konsantrasyonlarda PON1 enzimi içeren plaka	58
Şekil 2.4.	Biyofilm oluşumu için hazırlanan farklı konsantrasyonlarda PON1 ( $\mu\text{g/ml}$ ) enzimi içeren plaka düzenegi	59
Şekil 3.1.	Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm)	62
Şekil 3.2.	Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	64
Şekil 3.3.	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi	65
Şekil 3.4.	3OC8HSL sinyal molekülünün standardı için HPLC Kromatogramı	66
Şekil 3.5.	3OC8HSL sinyal molekülü için ürün piklerini gösteren HPLC kromatogramı	67
Şekil 3.6.	C10HSL sinyal molekülünün standardı için HPLC Kromatogramı	68
Şekil 3.7.	C10HSL sinyal molekülü için ürün piklerini gösteren HPLC kromatogramı	69
Şekil 3.8.	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enziminin 3OC8HSL sinyal molekülü substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	70

Şekil 3.9. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enziminin C10HSL sinyal molekülü substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	72
Şekil 3.10. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>S. aureus</i> bakterileri için hazırlanan plaka düzeneği	75
Şekil 3.11. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>S. aureus</i> bakterileri üzerine PON1'in konsantrasyona bağlı etkisi	75
Şekil 3.12. <i>P. aeruginosa</i> ve <i>E. coli</i> bakterileri için hazırlanan plaka düzeneği	76
Şekil 3.13. <i>P. aeruginosa</i> ve <i>E. coli</i> bakterileri üzerine PON1'in konsantrasyona bağlı etkisi	76
Şekil 3.14. PON1 enziminin bakteri üremesi üzerine etkisinin petri görüntüleri	77
Şekil 3.15. <i>P. aeruginosa</i> ve <i>E. coli</i> bakteri üremesine PON1'in kantitatif etkisi	78
Şekil 3.16. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>S. aureus</i> bakteri üremesine PON1'in kantitatif etkisi	79
Şekil 3.17. Olgun biyofilmlerde PON1 konsantrasyonuna bağlı etki	81
Şekil 3.18. Gelişmekte olan biyofilmlerde PON1 enziminin etkisi	83
Şekil 3.19. Gelişmekte olan biyofilmlerde PON1 enziminin zamana bağlı etkisi	84

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1.	Çevreyi algılama sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri	11
Çizelge 1.2.	Prokaryotlarda ve ökaryotlarda AHL parçalayıcı enzimler	41
Çizelge 2.1.	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının Miktarları	48
Çizelge 3.1.	Saflaştırma tablosu	63
Çizelge 3.2.	İnsan serum paraoksonaz enziminin 3OC8HSL substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$	71
Çizelge 3.3.	İnsan serum paraoksonaz enziminin C10HSL substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$	73
Çizelge 3.4.	<i>P.aeruginosa</i> (PA) ve <i>E.coli</i> (EC)'nin PON1 varlığında 600 nm'deki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	79
Çizelge 3.5.	<i>K. pneumoniae</i> (KP) ve <i>S. aureus</i> (SA)'nın PON1 varlığında 600 nm'deki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	80
Çizelge 3.6.	<i>P. aeruginosa</i> 'nın PON1 içeren olgun biyofilmlerinde OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	82
Çizelge 3.7.	<i>P. aeruginosa</i> biyofilm gelişimi boyunca PON1 ilavesinin OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	83

Çizelge 3.8. PON1 varlığında <i>P. aeruginosa</i> biyofilmlerinin 12 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	85
Çizelge 3.9. PON1 varlığında <i>P. aeruginosa</i> biyofilmlerinin 24 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	85
Çizelge 3.10. PON1 varlığında <i>P. aeruginosa</i> biyofilmlerinin 36 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	86
Çizelge 3.11. PON1 varlığında <i>P. aeruginosa</i> biyofilmlerinin 48 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları	86



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarımın her safhasında her türlü desteğini gördüğüm, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Selma SİNAN'a öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı arz ederim.

*Pseudomonas aeruginosa* PAO303 Quorum sensing inhibisyonu çalışmalarımın bir bölümünü yapmış olduğum Aalborg University Department of Chemistry, Biotechnology and Environmental Engineering, DENMARK'dan Assoc. Dr. Jeppe Lund NIELSEN'a,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarımında her türlü desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Oktay Arslan ve Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN'a,

Çalışmalarım boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Araştırma görevlisi Sümeyye AYDOĞAN ve arkadaşlarım Derya GÜLMEZ, Didem KARAARSLAN, Gülsüm GÖREN, Mehmet Emin DİKEN, Esra SOLMAZ ve Murat Kemal AVCI'ya,

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi destekleriyle yalnız bırakmayan AİLEME,

En içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, Ocak 2010

Aynur AYBEY

## 1.GİRİŞ

Yakın zamana kadar çok hücreli organizmalarda hücreler arasında sinyallerin gelip gitmesi, karmaşık sinyal yollarının olması onları tek hücrelilerden ayıran bir özellikti. Şimdi ise bakterilerin kendi aralarında haberleşebildiğini biliyoruz. Bakterilerin yaşamsal fonksiyonları ile yakından ilişkili olan haberleşmelerini kendi ürettikleri sinyal molekülleri ile sağladıkları tespit edilmiştir. Söz konusu sinyal molekülleri sayesinde ortamdaki aynı veya farklı türden bakterilerin sayılarını algılayabilmektedirler. Bu algılamaya **Quorum sensing** denir [1].

Bakteriler hem değişen çevresel şartlara uyum sağlamada hem de hayatlarına devam ettirmek için biyoluminisens, hücre bölünmesi, biyofilm oluşumu, antibiyotik üretimi gibi türe özgü davranışları sergilerler. Quorum-sensing mekanizması da, türe özgü davranışı hep birlikte sergilemeyi, bu davranışı ortaya koymada zamanlamamın ayarlanmasını sağlar [1].

Her ne kadar bazı özellikleri ile insanoğlu için faydalı olsa da karşılaştığımız birçok çevresel sorunların, çeşitli hastalık ve ölümcül durumların kaynağı yine bakterilerdir. Bakterilerin bu zararlı etkilerine karşı önlem alabilmenin en önemli yollarından biri de onların yaşamını yani bakteriler arasında kullanılan Quorum sensing olarak adlandırılan bu lisanın şifrelerini çözebilmektir. Quorum sensing inhibisyonunun çeşitli şekillerde gerçekleştirilmesi ile bakterilerin çevreye ve diğer canlılara verdikleri zarar minimuma indirilebilir, hatta tamamen önlenbilir.

Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, paraoksonaz (PON) ailesi enzimlerinin Quorum Quenching olarak adlandırılan Quorum Sensing inhibisyonunda kullanılabileceği tespit edilmiştir. PON enzimleri söz konusu inhibisyonu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile gerçekleştirmektedir [2]. Paraoksonaz1 (PON1) karaciğerde sentezlenip oradan seruma salgılanan yüksek yoğunluktaki lipoproteine (HDL) bağlı, kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Paraoksonazın laktonaz aktivitesinin yanında organofosfatların detoksifikasyonu, ve sarin, soman gibi sinir ajanlarını da hidrolizinde de önemli rolleri vardır [3].

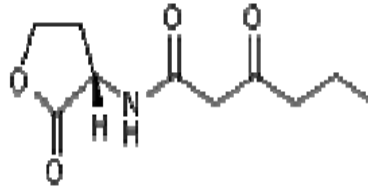
Quorum sensing mekanizmasının PON ailesi enzimleri ile inhibisyonu veterinerlik, tıp, gıda, farmakoloji, ziraat ve biyoteknoloji gibi alanlarda önemli roller oynayacağı açıktır.

### 1.1. QUORUM SENSING ( SALT YOĞUNLUĞU ALGILAMA )

Sinyal moleküllerinin algılanması, bakterinin bulunduğu ortamda düşük veya yüksek miktardaki populasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini mümkün kılmakta ve bu sayede ortamda hücre sayısındaki değişikliğe cevap olarak gen ekspresyonunun populasyon düzeyinde kontrolü sağlanmaktadır. Bu olay “**Quorum Sensing**” olarak ifade edilmektedir. Başka bir deyimle Quorum Sensing, bir bakteri populasyonunda gen ekspresyonunun, bütün bir populasyonun gen ekspresyonu dikkate alınarak koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizmasıdır [4].

Populasyon içerisindeki bakteriler, “**otoindükleyici (AI)**” denilen ve sinyal molekülleri olarak da adlandırılan kimyasal molekülleri salgılayarak ve bu moleküllere yanıt vererek diğer bakterilere varlıklarını bildirirler. Quorum Sensing denilen bu iletişim mekanizması ilk kez 1960’larda deniz bakterisi *Vibrio fischeri*’de biyoluminesans olayında gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda deniz biyoluminesans bakterisi *V. fischeri* sıvı kültürlerde yetiştirilmekteydi ve bu kültürlerde ışık oluşumunun yalnızca ortamdaki bakteri sayısının çok fazla olduğu yoğunluklarda meydana geldiği gözlenmiştir [5]. Bu olayla ilgili ilk açıklamalar, kültür ortamının bir biyoluminesans inhibitörü içerdiği ve bu inhibitörün bakteriler tarafından çok fazla sayıya ulaşarak ortamdan uzaklaştırıldığı şeklinde olmuştur [6]. Ancak ortamdaki bakteriler, üreme sürecinin başlangıcında ilgili maddelere maruz bırakılarak yetiştirildiğinde, biyoluminesans olayının düşük hücre yoğunluğunda da indüklendiği görülmüştür. Buna bağlı olarak, daha sonra biyoluminesans olayının bir inhibitör maddenin ortamdan uzaklaştırılması yoluyla değil de, bir aktivatör molekülün (AI) birikerek artması sonucu meydana geldiği anlaşılmıştır [7]. Bu molekül, bakteriler tarafından üretilmektedir ve yeterli konsantrasyon düzeyine

ulaştığında biyoluminesansı aktive etmektedir. İlgili bakteriler otoindükleyici moleküllerin konsantrasyonunu izleyerek hücre yoğunluğunu algılayabilmektedir. *V. fischeri* tarafından üretilen molekül ilk kez 1981’de Eberhard ve arkadaşları tarafından izole edilmiş, özellikleri belirlenmiş ve N-(3-oxohexanoyil)-homoserin lakton (3-oxo-C6-HSL) olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.1) [8].



**Şekil 1.1.** 3-oxo-C6-HSL

*V. fischeri*’ye ait QS mekanizması için gerekli olan genlerin analizi ilk kez 1983’de Engebrech ve Greenberg tarafından yapılmıştır. Bu çalışma, bugün diğer QS sistemlerine örnek teşkil eden, *V. fischeri*’deki QS mekanizmasının esas modelini ortaya çıkartmıştır [9]. Açıl homoserin laktonlara (AHL) bağlı çalışan QS mekanizmalarının sadece *V. fischeri* ve *V. harvei* gibi deniz bakterileriyle sınırlı olduğu zannedilmiştir. Ancak Nottingham ve Warwick’te yürütülen antibiyotik senteziyle ilgili araştırmalar, QS mekanizmasının düşünüldüğünden çok daha fazla geniş alana yayıldığını ortaya çıkartmıştır [10].

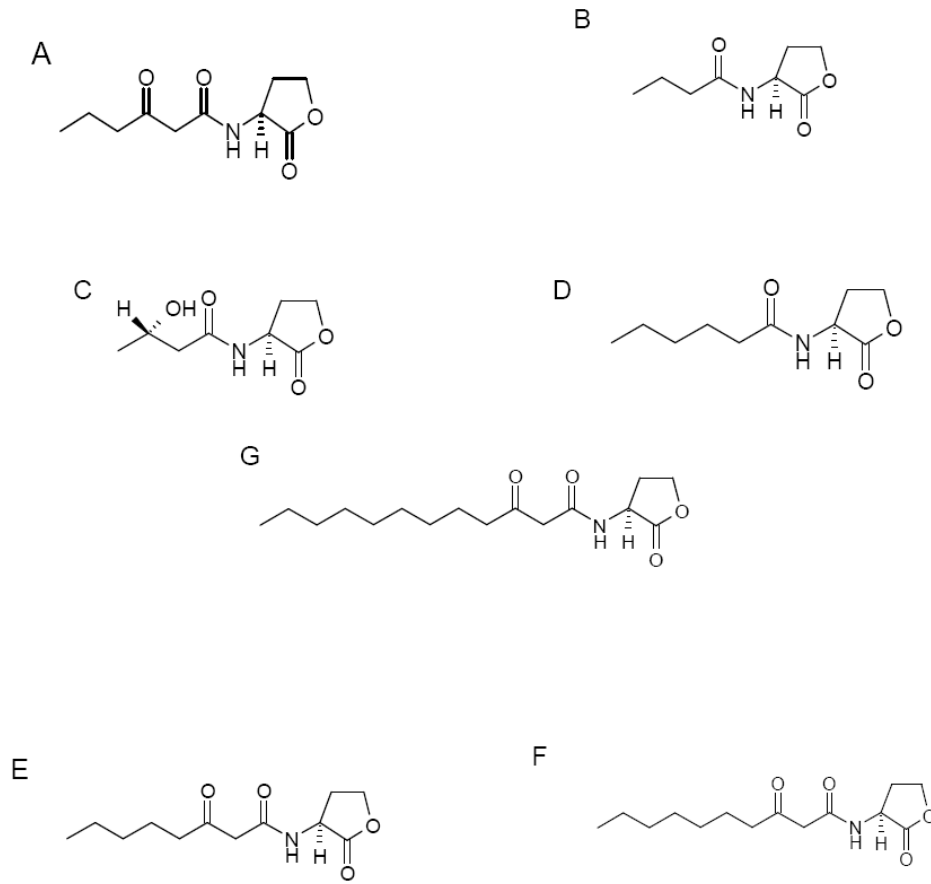
### **1.1.1. QS Mekanizmasında Kullanılan Sinyal Molekülleri (Otoindükleyiciler)**

QS mekanizmasında kullanılan sinyal molekülleri türden türe değişmekle birlikte bakterilerin Gram (+) ve Gram (-) olma özelliği dikkate alınarak üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

1. Açıl-Homoserin Lakton (AHL veya HSL) türevleri,
2. Oligopeptitler,
3. Furanosil borat diester türevleri.

AHL sinyal molekülleri Gram (-) türler tarafından kullanılırken oligopeptit grubu sinyal molekülleri Gram (+) bakteriler tarafından kullanılır. Furanon türevleri ise bazı Gram (-) veya Gram (+) türlerde ikinci sinyal molekülü olarak görev alır [11].

Pek çok bakteride Açıl-HSL moleküllerinin varlığı tespit edilmiştir. Genellikle bu sinyal molekülleri yağ açıl zincirine amid bağıyla bağlanmış homoserin lakton molekülünden oluşur. Farklı bakteriler arasında Açıl-HSL molekülleri açısından çeşitlilikler mevcut iken aynı bakteri türünce sentezlenen farklı Açıl-HSL molekülleri de mevcuttur (Şekil 1.2). Açıl zincirinin uzunluğu 4-16 C arasında değişebilir. C-16 HSL molekülü *Rhodobacter capsulatus* tarafından üretilir. Açıl zincirinin 3.C'u tamamiyle okside olabileceği gibi, taşıdığı hidroksil grubuyla tamamen redükte bir durumda da bulunabilir [12].



**Şekil 1.2.** Homoserin lakton molekülleri

A)N-(3-okzohekzanoyil)-L-homoserin lakton (OHHL), B) N-butanoyil-L-homoserin lakton (BHL), C)N-(3-hidroksi butanoyil)-L-homoserin lakton (HBHL), D)Nhekzanoyil-L-homoserin lakton (HHL), E)N-(3-okzooktanoyil) -L-homoserin lakton (OOHL), F) N-(3-okzodekanoyil)-L-homoserin lakton (ODHL), G) N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton (ODDHL).

Bakteri popülasyonlarında, hücrel metabolitler ile QS moleküllerinin ayırt edilmesi güçtür. Bu nedenle gerçek bir QS molekülünün bir metabolitten farklı olarak taşınması gereken özellikler şöyle özetlenmektedir:

1. QS molekülünün üretimi üremenin değişik basamaklarında, özel fizyolojik koşullar altında veya çevresel değişikliklere cevap olarak ortaya çıkar.
2. QS molekülü ekstrasellüler olarak birikir ve özgün reseptörler tarafından algılanır.
3. QS molekülünün birikmesi kritik bir eşik değerine ulaştığında planlanmış bir cevabı doğurur.
4. QS molekülünün doğurduğu hücrese cevap, QS molekülünün metabolize veya detoksifiye edilmesinden çok daha geniştir. Bu dört özellikten ilk üçünü birçok metabolit de gösterirken, dördüncü özellik bir QS molekülünün mutlaka taşınması gereken bir özelliktir [13].

Farklı mikroorganizma türleri, farklı QS molekülleri üretir. Bu nedenle farklı QS moleküllerini üreten mikroorganizmalar da birbirleri ile anlaşamamaktadır. Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır. Farklı QS moleküllerinin doğurduğu yanıtlar da farklı olmaktadır [14,15].

### **1.1.2. QS Mekanizmasının Çeşitleri**

QS mekanizmasında kullanılan sinyal moleküllerinin çeşidi ve bu moleküllerin algılanma mekanizmaları dikkate alındığında üç çeşit QS mekanizması vardır [16];

1. LuxI/LuxR Sistemi [Gram (-) Bakterilerde]
2. Oligopeptit Sistemi [Gram (+) Bakterilerde]
3. Hibrit Sistem [Gram (-) ve Gram (+) Bakterilerde]

### 1.1.2.1. Gram Negatif Bakterilerde LuxI-LuxR Tip Çevreyi Algılama Sistemi

Gram-negatif bakteriler arasında en iyi çalışılmış çevreyi algılama sistemi LuxR-LuxI homolog sistemidir (Şekil 1.3) ve temel sinyal molekülü açıl homoserin laktonlardır. Bu çevreyi algılama sistemi, gram-negatif bakteriler arasında yaygındır ve konakla ilgili virulens faktörlerinin ve sekonder metabolitlerin üretiminin kontrol edilmesinde rol oynar [17].

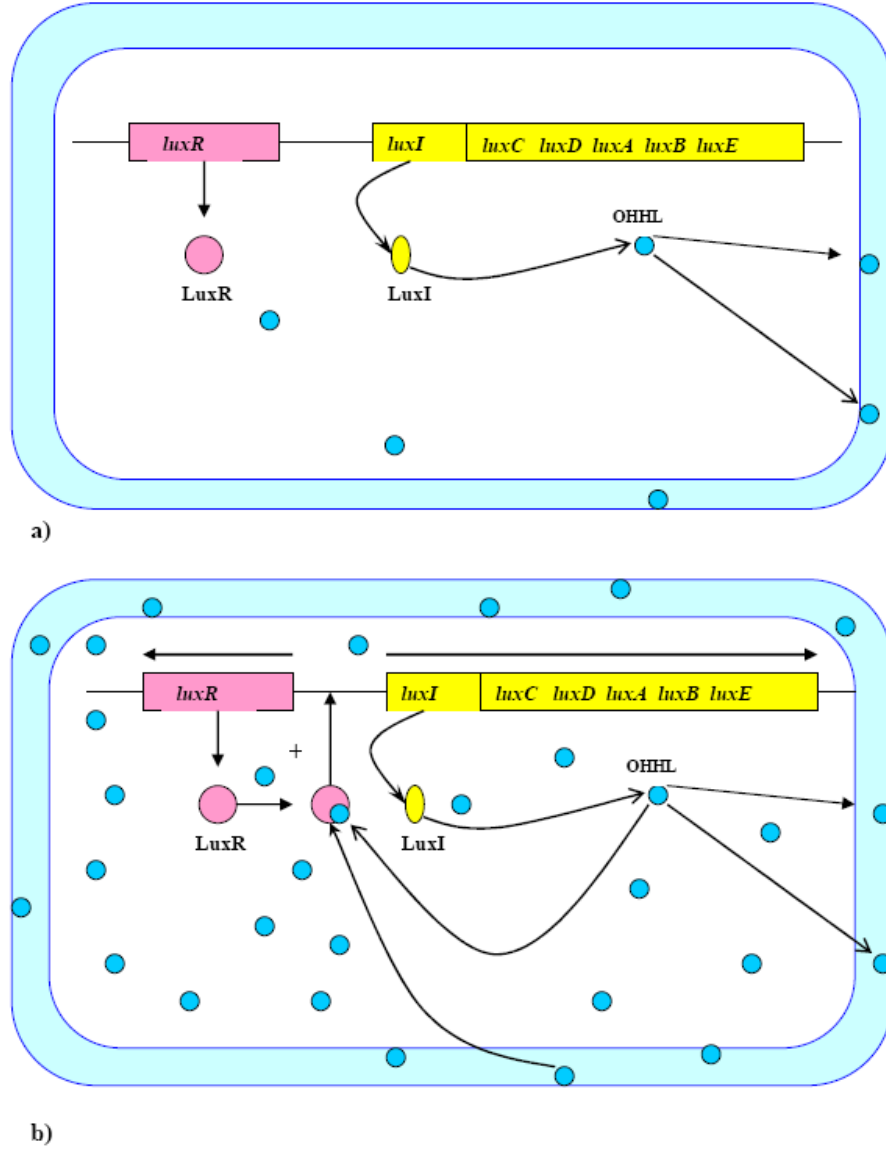
Geçen 10 yıl içerisinde 25'den fazla gram-negatif bakteri türünde çevreyi algılama döngüsünün olduğu tespit edilmiştir. *Vibrio harveyi* ve *Myxococcus xanthus*'un çevreyi algılama sistemleri hariç gram negatif bakterilerdeki tüm çevreyi algılama sistemi, simbiyotik bakteri olan *V. fischeri*'deki döngüye benzer. Bu bakteriyel çevreyi algılama döngüleri en azından *V. fischeri*'nin regülatör proteinini olarak bilinen LuxI ve LuxR proteinlerinin homologlarını içerirler.

*Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas salmonicida* gibi bazı gram-negatif türler de açıl homoserin lakton molekülleri üretirler veya LuxRI'nin homologlarını içerirler. Bu yaygın balık patojenleri LuxRI'nin homologları olan AhyRI ve AsaRI'ı exprese ederek, BHL ve HHL sinyal moleküllerinin sentezini düzenlerler. Yine bir başka balık patojeni olan *Vibris anguillarum*'da LuxRI homologu olan VanI N-(3-oxo-dekanoyl)-L-HSL (ODHL) molekülünün sentezini katalizler. Serbest yaşayan bir mikroorganizma olan *Chromobacterium violaceum*'da HHL, kısmi olarak antibiyotik üretimini, virulens faktörlerini, kitinolitik aktiviteyi ve mor pigment üretimini bu sinyal moleküllerine dayanan çevreyi algılama mekanizmasını kullanarak düzenler. Yine bu bakterinin sinyal molekülü üretemeyen mutanı, diğer bakterilerin açıl homoserin lakton molekülü üretimlerini test için kullanılmaktadır [18].

LuxI benzeri proteinler, sinyal molekülü olarak bilinen homoserin lakton sinyal moleküllerinin biyosentezinden sorumludur. Ortamdaki sinyal molekülü konsantrasyonu, çoğalan hücre popülasyon yoğunluğuyla artar. LuxR benzeri proteinler aynı kökenli homoserin lakton sinyal moleküllerine, bu moleküllerin



yoğunlukları kritik sınır değerine ulaştığında bağlanır ve bu molekül kompleksi hedef genin transkripsiyonunu da aktive ederek, genler tarafından kodlanan özelliklerin gerçekleştirilmesini sağlar [19].



**Şekil 1.3.** *Vibrio fischeri*' de luxR-I tip çevreyi algılama sistemi ve ışık üretimi a) düşük bakteri konsantrasyonunda luxR-I düşük seviyede ekspresse edilir ve ortamdaki OHHL miktarı genlerin ekspresyonu için yetersizdir, b) yüksek bakteri konsantrasyonunda OHHL miktarı eşik değere ulaşır ve OHHL-LuxR kompleksi biyoışımının gerçekleştirilmesini sağlar.

AHL moleküllerinin spesifik reseptörleri, transkripsiyonel regülatörlerin LuxR ailesinin üyelerindedir. LuxR ailesinin üyeleri DNA'ya bağlanan C-terminal ve AHL'lara bağlanan N-terminal domainleri olmak üzere 2 domainden oluşur. Genellikle R ve I genleri birbirleriyle bağlantılı olarak işlev gösterirler [20].

Gram-negatif bakteriler, çevreyi algılama mekanizmasını kullanarak, hücre popülasyon yoğunluğundaki değişikliklerle, gen ekspresyonunu iyi şekilde düzenlerler. 25 tür bakteri arasında çevreyi algılama sistemi LuxI/LuxR tip döngüye dayalı olanlardan *V. fischeri*, *P. aeruginosa*, *A. tumefaciens* ve *E. carotovora* en iyi çalışılmış sistemlerdir [19].

*V. fischeri*, pek çok ökaryotik konakla simbiyotik ilişki içinde yaşar. Bu örneklerde konak canlı, özelleşmiş bir ışık organına sahiptir. Ayrıca bu simbiyotik yaşamda ökaryotik konak *V. fischeri*'ye yaşaması için besince zengin bir ortam sağlar ve her ökaryotik konak bakterinin sağladığı ışığı özel amaçlar için kullanırlar. Örneğin, mürekkep balığı *Euprymna scolopes* –*V. fischeri* birlikteliğinde mürekkep balığı bu olayı savunma aracı olarak kullanır. Yine bir balık olan *Monocentris japonicus*, *V. fischeri*'nin ürettiği ışığı karşı cinsi cezbetmek için kullanır. Bu durum da bu balığın üzerinde karşı cinsi cezbetmek için ışık saçan iki bölge bulunmaktadır. *V. fischeri*'nin ürettiği ışık, avcılardan kaçmak ve yemini kendine doğru çekmek için de kullanılmaktadır. Işık emisyonu, ışık organındaki bakteri kültürünün hücre yoğunluğuyla sıkı şekilde ilişkilidir ve bu olay çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilir. Işık organında *V. fischeri*'nin yoğunluğu ml'de  $10^{11}$  hücre gibi oldukça yüksek değerlere ulaşır. *V. fischeri* kültürünün yoğunluğu arttıkça ürettiği sinyal molekülü hormonu hücre dışına salar. Bu hormon bakterinin ışık organının içinde tutulur. Uygun pozisyonundaki ışık organında kümeleşen her önemli yoğunlukta, sinyal olarak görev görür. *V. fischeri*'nin çevreyi algılama sistemi, bu bakterinin ışık üretiminin sadece ışık için olumlu durumlar olduğunda üretilmesini sağlar. *V. fischeri*'nin hücre sayısı arttıkça, sinyal molekülü kümeleşerek yeterli sınır değere ulaşır (~ 1-10 tg/ml). LuxR, LuxI CDABE promotoruna bağlanır ve onun transkripsiyonunu aktive eder. Bu olay hem sinyal molekülü üretiminde hem de ışık

emisyonunda hızlı artışa neden olur. LuxR homoserin lakton kompleksi aynı zamanda LuxR'ın ekspresyonunda negatif düzenleyici olarak da rol oynar [19].

*A. tumefaciens*, hassas konaklarda taç tümörlerini uyaran bitki patojenidir. *A.tumefaciens*'te çevreyi algılama sistemi bakteriler arasında Ti plazmitinin konjugal transferini kontrol eder. Tümör oluşum süreci için, onkogenik Ti plazmitinin bakteriden konağa transferi gereklidir. Ti plazmit genleri bitkide opinelerin biyosentezini ve salgılanmasını yönetir. Ti plazmiti aynı zamanda tümörlerle sonuçlanan konak hücrelerinin çoğalmasını uyaran bitki hormonlarının üretimini sağlayan genleri kodlar [21].

*Erwinia* türleri hasat öncesi ve sonrası dönemlerde çeşitli bitki türlerinde hastalıklara neden olan fırsatçı bir fitopatojendir. Bitkiler üzerinde saprofit olarak yaşarlar. Bitkilerde sulu çürüğe neden olurlar ve özellikle patates ve havuçlarda ürün kaybına yol açarlar. Bu sulu çürüğe konağın hücre duvarını parçalayan enzimler neden olur. Bu enzimler arasında pektatliyaz (pel), poligalaktoüronaz (peh), selülaz (cel), proteaz (prt) sayılabilir. Bu enzimler iki farklı mekanizmasıyla salgılanırlar. *E. carotovora*'nın bazı türleri bir beta laktam antibiyotik olan 1-carbapen-2-em-3-karboksilik asit üretirler. Bu antibiyotik üretimi, bakterinin rizosferde, antibiyotiğe hassas diğer yarışçı bakterilerin sayısını azaltarak, *Erwinia*'nın hayatını devam ettirmesini sağlar. Bu bakteride de tüm bu ekzoenzimlerin [22] ve antibiyotiğin üretimi [23] çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilir.

**Çizelge 1.1.** Çevreyi algılama sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri

<b>Organizma</b>	<b>Sinyal Molekülü</b>	<b>Regülatör Proteinler</b>	<b>Fenotip</b>
<i>Vibrio fischeri</i>	(3-Okzo -C6-HSL) N-(3okzoheksanoyil)-HSL	LuxI/LuxR	Biyoişırma
<i>Vibrio harveyi</i>	3-Hidroksi-BHL	LuxLM/LuxN	Biyoişırma
<i>P. aeruginosa</i>	a)N-(3Okzododekanoyil)-HSL(3-Okzo -C12-HSL) b)N-butyryl-HSL(BHL)	a)LasI/LasR b)RhII/RhIR	a)Hücre dışı enzimler ve biyofilm üretimi  (b) lasB, rhlAB (ramnolipid üretimi), rpoS
<i>Vibrio anguillarum</i>	3-Okzo-C10-HSL	VanI/VanR	
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	N-heksanoyil-HSL (C6-HSL)	PhzI/PhzR	Fenazin antibiyotiğinin üretimi
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N-(3-okzooktanoyil)-HSL 3-Okzo-C8-HSL	TraI/TraR	Ti plasmit konjugasyonu
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	N-(3-Okzoheksanoyil)-HSL (3-Oxo-C6-HSL)	ExpI/ExpR CarI/CarR	Ekzoenzimler ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	N-(3-Okzoheksanoyil)-HSL (3-Okzo-C6-HSL)	ExpI/ExpR	Pektat liyaz
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	C6-HSL	RhI/RhIR	RhIABC rhizosphereexpressed genes, nodulation
<i>Chromobacterium violaceum</i>	N-heksanoyil-HSL (C6-HSL)	CviI/CviR	Ekzoenzimler, antibiyotik ve viyolesin üretimi

<i>Burkholderia cepacia</i>	N-oktanoyil-HSL (C8-HSL)	CepI/R	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BHL N-butanoyil-HSL	AhyI/AhyR	Ekzoproteaz üretimi
<i>Aeromonas salmonicida</i>	BHL N- butanoyil-HSL	AsaI/AsaR	Hücre dışı proteaz üretimi
<i>Ralstonia solanacearum</i>	N-oktanoyil -HSL (C8-HSL)	SolI/SolR	?
<i>Serratia liquifaciens</i>	N- butanoyil -HSL (BHL)	SwrI/SwrR	Hücre dışı proteaz Üretimi ve kayma hareketinin kontrolü
<i>Yersinia enterocolitica</i>	N- hekzanoyil-HSL, (C6-HSL)	YenI/YenR	?
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	(a) N-(3-okzo hekzanoyil)-HSL (b) N- oktanoyil -HSL	a) YpsI/YpsR (b) YtbI/YtbR	Bakteriyal kümeleşme ve hareketliliğinin kontrolü

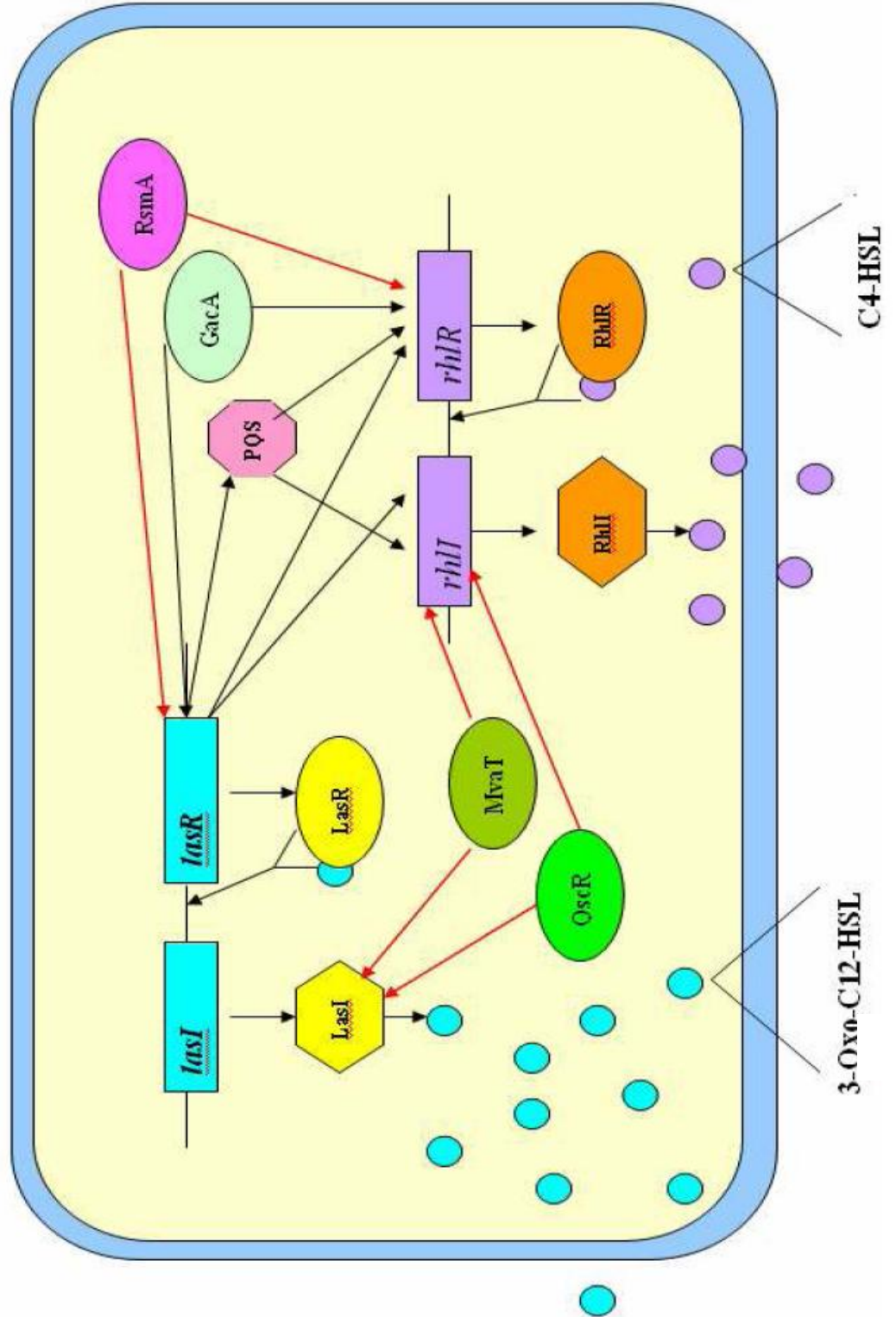
### 1.1.2.2. *P. aeruginosa*'da LasI/LasR-RhII/RhIR Çevreyi Algılama Sistemi

*Vibrio*, *Agrobacterium*, *Erwinia* ve *Yersinia* gibi birçok bakteri türü gibi *Pseudomonas*lar da, Quorum Sensing (çevreyi algılama) adı verilen mekanizmayla ortamda kendi yoğunluklarını algılayabilirler. Bu sistemde bakterilerin ürettiği düşük molekül ağırlıklı moleküller, hücre dışı ortamda birikirler. Bu moleküllerin miktarı eşik değere ulaştığı zaman popülasyonun cevabı uyarılır.

*P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi çevresel faktörler ile stres koşulları bakteriyel cevap arasındaki önemli ilişkiden dolayı, *V. fischeri*'dekinden daha karmaşıktır. *P. aeruginosa* virulensinin ortaya çıkmasında rolü olan, çok çeşitli hücre dışı ürün sentezler. Bu virulens faktörlerinin üretilmesi, hücre yoğunluğuna bağlı olarak düzenlenir ve pek çoğunun üretilmesi sürekli değildir. Bu gen

mekanizması, *P. aeruginosa*'nın konağın savunma mekanizması ile baş etmesini sağlar. Ayrıca konakta enfeksiyon oluşturabilecek gerekli hücre yoğunluğuna

ulaşınca kadar immün sistem tarafından mikroorganizmanın fark edilmemesini sağlar. Diğer birçok gram negatif bakteri gibi *P. aeruginosa* da, difüze olabilen AHL sinyal moleküllerine dayanan, kendi populasyon yoğunluklarını algılamalarını sağlayan ve çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılan mekanizmayı kullanırlar [24-26].



Şekil 1.4. *P. aeruginosa*'da rhII-R ve lasI-R çevreyi algılama sistemleri.

- ➔ Negatif etki
- ➔ Pozitif etki

Bu iletişim sisteminin temeli iki protein molekülüne bağlıdır. Bunlardan birisi LuxI ailesine mensup AHL sentaz ve diğeri de LuxR ailesine ait AHL reseptör proteindir. Düşük hücre yoğunluğunda az miktarda AHL üretilir. Hücre yoğunluğunun artmasıyla AHL sinyal molekülleri büyüme ortamında sayıca artar ve sınır değere ulaştığı zaman AHL LuxR tip reseptör proteine bağlanarak hedef genlerin uyarılmasını veya baskılanmasını sağlar. *P. aeruginosa*'da transkripsiyonal aktivatörü LasR ve AHL moleküllerinin sentezini sağlayan LasI, ayrıca N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton (OdDHL) molekülünün sentezini kontrol eden las sistemi ve RhlR ve RhlI'den oluşan ve N-butanoyil-L-homoserin lakton (BHL) molekülünün sentezini kontrol eden rhl olmak üzere iki adet çevreyi algılama sistemi mevcuttur. İki sistem birbirinden bağımsız değildir ve las sistemi rhlR ve rhlI nin ekspresyonunu pozitif olarak düzenler. *P. aeruginosa*'da las sistemi, bu iki sinyal sisteminin en üzerinde yer alır ve iki döngü hiyerarşik bir şekilde işlemektedir. Bu karmaşık sistemde rol oynayan Vfr, GacA, RsaL ve RpoS gibi ilave regülatörler mevcuttur. Las sistemi, elastaz A, elastaz B ve alkalın proteaz gibi virulens faktörlerinin ekspresyonunu kontrol eder [27,28]. Rhl sistemi, ramnolipid ve piyosiyanın biyosentez enzimlerinin ekspresyonunu ayrıca hidrojen siyanid sentezini kontrol eder [29-31]. Las ve rhl sistemleri birlikte iki yüzden fazla genin ekspresyonunda etkilidirler ve biyofilm oluşumunu da kontrol ederler [32].

Son zamanlarda *P. aeruginosa*'nın çevreyi algılama sisteminin bir parçası olan ve temelde *Pseudomonas* quinolone sinyal molekülüne (PQS, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) dayanan üçüncü sinyal sisteminin, varlığı ortaya konmuştur [33]. Bu molekülün üretimi lasR sistemi tarafından kontrol edilir ve ekzojen PQS elastaz B'nin ve rhlI'nin ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyarır [34].

Çevreyi algılama sistemi kullanılarak gen işleyişinin engellenmesiyle, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının kontrol edilmesi yeni stratejiler arasındadır [35]. Bu karmaşık regülatör sistemde bir çok potansiyel hedef bölgenin varlığı mevcuttur. Örneğin regülatör proteinlerin otoindükleyici molekül bağlanma bölgesi için afinite gösterecek düşük molekül ağırlıklı engelleyiciler kullanılabilir.



### 1.1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* ve Biyofilmler

*P. aeruginosa* çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında, sıvı ve katı yüzeylerde biyofilm adı verilen bir yapı oluşturur (Şekil 1.5). Bakterilerin bu yapıyı oluşturması, bakteriyal antibiyotik direncini arttırması ve biyofilm üzerindeki bakterilerin konağın immun cevabından daha az etkilenmesi nedeniyle tıbbi açıdan önem taşımaktadır [36]. Aerobik ortamlarda biyofilm oluşumunda las sistemi merkezi rol oynar [26].

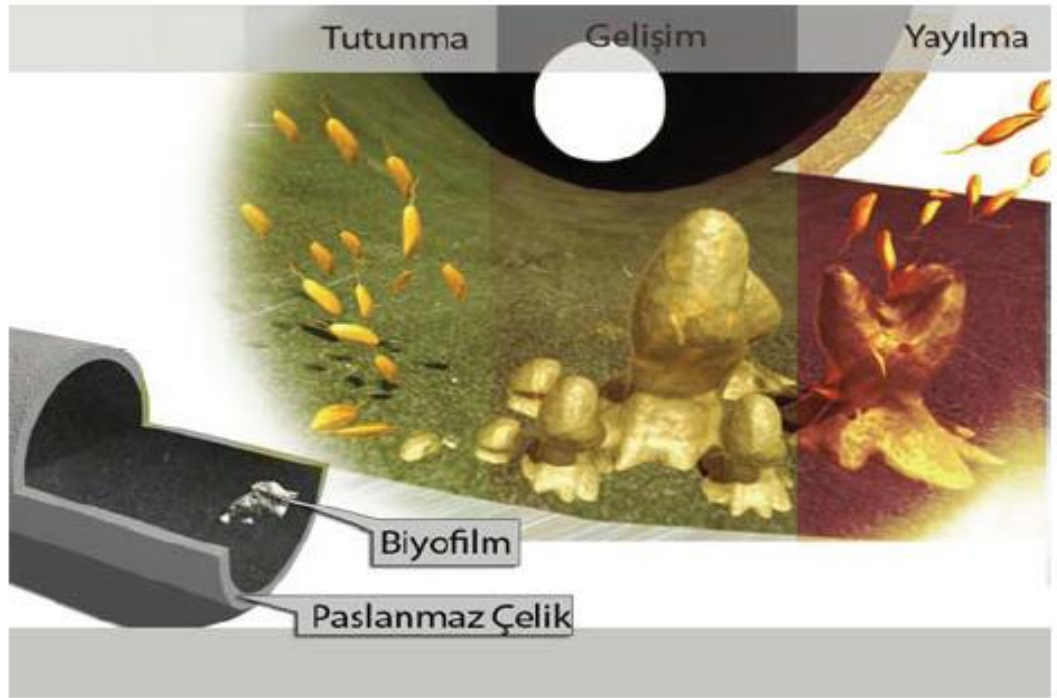


Şekil 1.5. Bakteriyel biyofilmlerde sinyal molekülü ile iletişim (Can Yastioğlu)

*P. aeruginosa* çoğu doğal yaşam alanında katı ve sıvı yüzeylerde biyofilm adı verilen yapılar içerisinde canlılıklarını sürdürürler. Bakteriyel biyofilmler doğal olarak çoğu ıslak yüzeyde yaygındır ve bunlar çevresel sorunlara yol açabilir. *P. aeruginosa* sadece doğal yaşam alanlarında değil, kronik olarak bu bakteri ile infekte olmuş kistik fibrozis hastalarının akciğerlerinde de biyofilm oluşturarak canlılıklarını devam ettirirler [36].

Biyofilmler, bakterilerin uygun olmayan şartlarda büyümelerini ve hayatta kalmalarını sağlar. Biyofilm öncelikle iç yüzeylerde veya ölü dokularda, yaygın olarak tıbbi aletlerin üzerinde ve ölü doku fragmentlerinde gelişir ve bunların yanı sıra canlı dokuların üzerinde de oluşurlar. Biyofilmler bir veya daha fazla bölgede yavaş bir şekilde gelişirler. Sesil bakteri hücreleri antijenleri nedeniyle antikor yapımını uyarırlar. Ancak antikorlar biyofilm içerisindeki bakterileri öldüremez. Her bir birey oldukça mükemmel hücresel ve humoral bağışıklık sistemine sahip olmasına rağmen, konağın savunma sistemi tarafından biyofilm enfeksiyonlarının üstesinden gelinmesi oldukça nadir meydana gelir [36].

Biyofilm oluşumu, sinyallerle düzenlenen yüzeye tutunma, mikrokoloni oluşması, hücre dışı polisakkarit bileşenlerin üretilmesi, olgunlaşma ve diğer bölgelere yayılma şeklinde 4 ana süreçten oluşur (Şekil 1.6 ).



**Şekil 1.6.** Paslanmaz çelikler yüzeylerde bakterilerin biyofilm oluşturma basamakları (Can Yastioğlu)

Biyofilmin derinliği ve biyofilm oluşunun tüm aşamaları oldukça iyi korunmuş sinyallerle kontrol edilir. Bu dzenleyici sinyaller, biyofilm içerisindeki bakteri hcrelerinin besin gereksinimlerini optimize ederler [37].

Biyofilm ktlesinin %97 gibi btyk bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 ekzopolisakkarit (EPS), %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nkleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların ęeřidine, fizyolojik ozelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel ozelliklere gbre değişebilmektedir [38].

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraseluler matriks biyofilm hcrelerinin tutunmasını sağlar. Yzyeye sıkıca tutunan bakteri burada ęođalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde btyyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS retimi, organizmanın yzyeye dnymsz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilmin ktlesinin %75–90'ını EPS oluşurmaktadır [39]. EPS Jel ya da viskoelastik davranış sergileyebilmekte, biyofilm yapısı protein, Ca<sup>+2</sup> iyonları ve polisakkaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır [40]. Bununla birlikte, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel ozelliklerine etki edebilir. Biyofilm yapısındaki bu enzimlerin biręođu düşük molekül ağırlıklı paręalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilme tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir [38].

Biyofilm oluşumu, tıbbi alanlarda ve ekonomik olarak ciddi sorunlara sebep olduğu için ilgi gösterilen ęalıřma konularından birisi olmuştur. Biyofilm oluşunun incelenmesi için *P. aeruginosa* model organizma olarak kullanılmaktadır.

#### 1.1.2.4. *P. aeruginosa*'da Çevreyi Algılama Sisteminin Önemi

Çevreyi algılama sisteminin işleyişini engelleyebilecek doğal veya sentetik AHL analogları, gram-negatif bakterilerle yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmışlardır [41, 42, 33].

*P. aeruginosa*'nın patojenitesinde çevreyi algılama sisteminin önemi, çeşitli hayvan deneyleriyle ortaya konmuştur. Bunlar arasında *Caenorhabditis elegans* nematot modeli [43], neonatal pnomonili fare modeli [44] ve yanık fare modeli [45] sayılabilir. Bu hayvan deneylerinin tümünde, çevreyi algılama sisteminde mutasyon olan suşların orjinallerine göre daha az virulent olduğu ortaya konmuştur. *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi alanındaki son çalışmalar, bu sistemin biyofilmin doğru oluşumu için hayati olduğunu göstermiştir. *P. aeruginosa* kistik fibrozisli hastaların akciğerinde kritik kolonizasyonla biyofilm oluşturur [46]. Biyofilm gelişmesi sırasında hücre dışında polimerik moleküllerden oluşan kalın matriks içindeki bakteri hücreleri, konağın immun cevabından etkilenmeksizin normal sıvı kültür içerisinde yaşayan bakterilere göre antibiyotiklere ve biyositlere dramatik bir şekilde artan direnç geliştirirler [47,48]. Bu yüzden antimikrobiyal tedaviler kistik fibrozisin tedavisinde kullanılmak üzere, çevreyi algılama sistemi ile ilgilenmektedir.

*P. aeruginosa*, yapısal olarak ilgisi olmayan antibiyotiklere de iç direnç gösteren, en problemlili insan patojenidir. Dahası kistik fibrozisli hastaların bu mikroorganizma ile kolonizasyonunun önlenmesi imkansız olduğu için çabaların çoğu *P. aeruginosa*'ya karşı yeni tedavi edici seçenekler bulunması doğrultusundadır. Başvurulan yaklaşım ekstraselüler virulens faktörlerinin üretimini azaltmak yönündedir. Bunun için çevreyi algılama sistemi oldukça caziptir [49].

Antibiyotik tedavisi, biyofilm içerisindeki planktonik hücrelerin sebep olduğu semptomları değiştirirken, biyofilmi yok etmede başarısızdır. Bu sebepten dolayı biyofilm enfeksiyonları, bu sesil popülasyon, cerrahi olarak vücuttan uzaklaştırılmaya kadar antibiyotik tedavisinin ardından tipik olarak tekrarlanan

semptomlar gösterirler. Biyofilmler farklı mekanizmalarla antimikrobiyal mücadeleye karşı koyarlar. Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direnç çeşitlerinden birisi, bu ajanların biyofilm kalınlığından dolayı biyofilmin içine penetre olamaması şeklindedir [36].

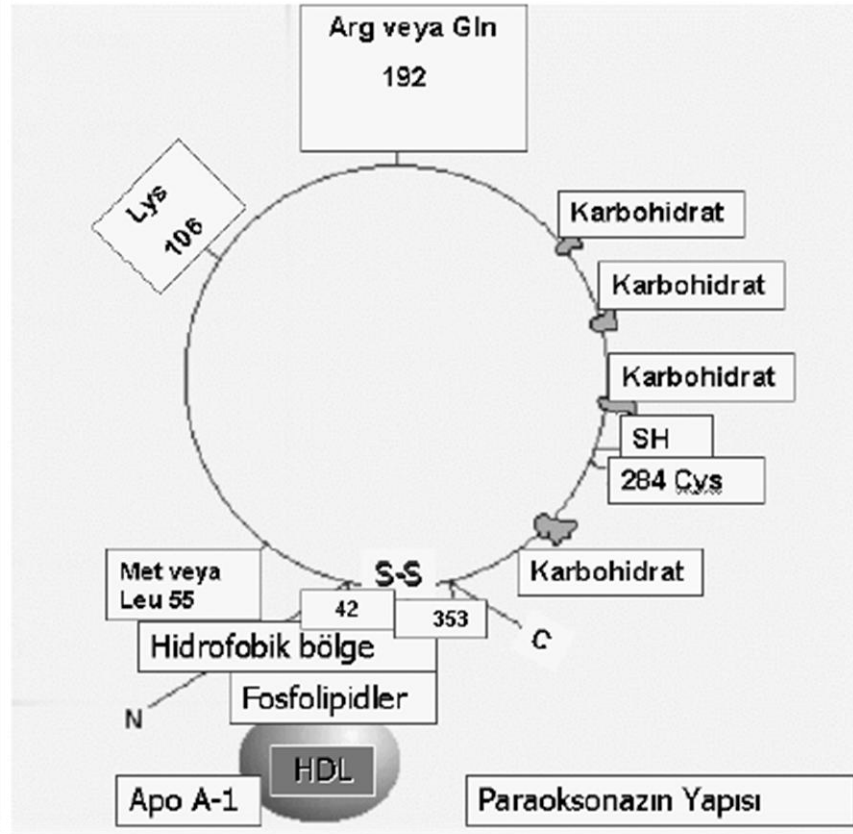
## **1.2. Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası**

### **1.2.1. Adlandırılması**

Yapılan ilk araştırmalara göre paraoksonaz enzimi, paraoksonaz aktivitesi gibi arilesteraz aktivitesi gösteren ve paraokson gibi çok sayıda aromatik karboksilik asit esterlerini hidrolizleyebilme özelliğine sahip A-esterazları grubunda yer alan ve EC 3.1.1.2 enzim kodu ile isimlendirilmiştir [50]. Ancak isimlendirme komitesi (International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nomenclature Committee) bu sınıflandırmayı tekrar düzenleyerek, söz konusu enzimi, enzim kodu girişi EC 3.1.8 olan fosfo triester hidrolazlar veya organofosfat hidrolazlar grubunun 1 numaralı enzimi olarak belirlenmiştir [51]. Paraoksonaz enzimi de arildialkilfosataz ismi ve EC 3.1.8.1. kodu ile bu grupta yer almaktadır [52]. Bu grupta yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için bu ismi almıştır [53,54].

### **1.2.2. Paraoksonaz Enziminin Genel Özellikleri ve Yapısı**

İnsan serum paraoksonaz enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan  $Ca^{+2}$  bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43 - 45 kDa molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır [55-57]. Kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir ve katalitik mekanizmada da rol oynamaktadır. Aktif bölgeden dietilfosfatın uzaklaştırılması bu bölgenin uygun konformasyonel yapı kazanmasını sağlar [55, 58, 59]. Paraoksonaz enziminin yapısı Şekil 1.7'de özetlenmiştir [60].

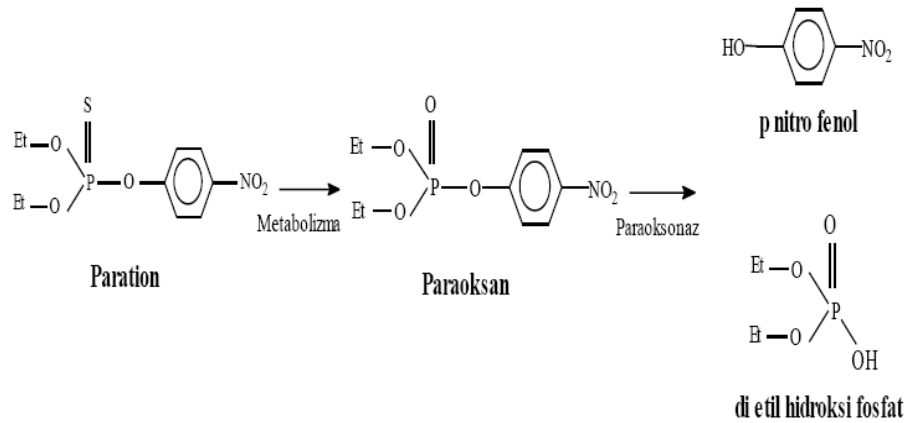


**Şekil 1.7.** İnsan Serum Paraoksonaz (PON 1) Enziminin Yapısı [60]

Paraoksonazın yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir. Paraoksonaz enzimi N-terminal hidrofobik sinyal peptidi aracılığı ile fosfolipidlere ve lipoproteinlere bağlanır [61,62]. Aslında paraoksonaz denildiğinde terminolojide paraoksonaz1 enzimi anlaşılmalı beraber ayrıca PON1 dışında iki farklı üyeyi de kapsar. Paraoksonaz ailesi insan paraoksonaz 1 (PON1), PON2 ve PON3 ‘ten oluşmaktadır [63]. Bu üç insan paraoksonazı 7. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuşlardır. PON1 355 aminoasitten meydana gelmiştir. Söz konusu paraoksonaz izoenzimlerinin aminoasit seviyeleri bakımından %65, nükleotid seviyeleri bakımından %70 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İnsan PON1 ve PON3 birincil olarak karaciğerde sentezlenirken insan PON2 daha geniş bir dağılım göstermektedir. Kalp, böbrek karaciğer, akciğer, plesenta, ince bağırsak, dalak, mide ve testiste bulunmaktadır [55, 63, 67].

Paraoksonaz aktivitesi, yeni doğarlarda ve prematüre bebeklerde yetişkindeki yaklaşık yarısı kadardır. Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra erişkindeki düzeyine ulaşır ve hayat boyu değişmeden devam eder [55]. Paraoksonaz, 3 tane sistein molekülü içerir, bunlardan iki tanesi molekül içi disülfid bağının oluşumuna katılırken, 284. pozisyondaki sistein molekülü ise serbest halde bulunur. Sistein 284'ün, enzimin aktif merkezine yakın bölgede bulunduğu ve bu bölgenin substrata bağlanma için gerekli olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, sigara kullanımının enzimin serbest tiyol gruplarını modifiye ederek; PON1 enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [56, 64, 65]. Üç sistein rezidüsünün varlığı PON1'in serin esterazların katalitik merkezlerinde serin amino asitleri yerine nükleofilik sistein amino asitlerini kullanan bir sistein esteraz olduğu hipotezini destekler [66].

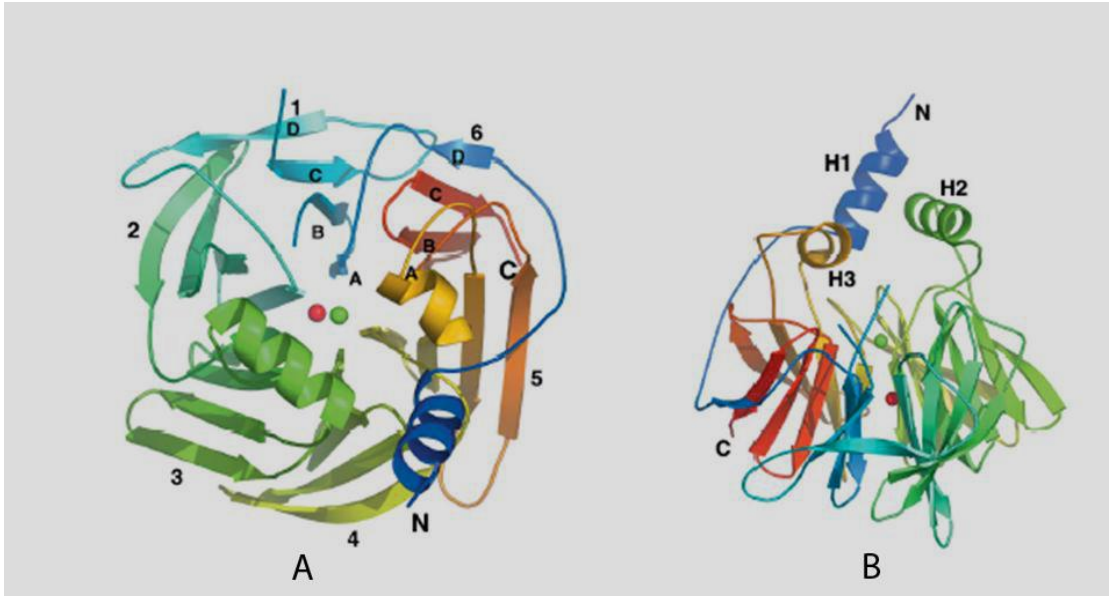
Paraoksonaz enzimi, bir insektisit olan parathionun oksidatif desülfürilasyonu ile oluşan paraoksonu hidroliz ederek p-nitrofenol ve dietilfosfat oluşumuna yol açar. Paraokson oluşumu karaciğer ve diğer dokularda mikrozomal sitokrom p-450 enzim sistemi ile kataliz edilmektedir [55,58]. Paraoksonaz enzim aktivitesi -20°C'de 1 yıl stabildir.



**Şekil 1.8.** Paraoksonaz Enzim Mekanizması [68].

Enzimin izoelektrik noktası 5.1'dir. 355 aminoasit içeren paraoksonaz enzimi yüksek oranda lösin içermektedir. Yapısındaki 3 sistein aminoasitin 284. sıradaki serbest iken 42 ve 353. sıradaki sistein rezidüleri tek disülfid bağı yapmıştır. Her molekül toplam ağırlığının %15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içermektedir [69, 70].

Paraoksonazın genel yapısına bakıldığında 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan oluşmuş 4 adet zincirden meydana geldiği görülür. 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanıp üç boyutlu yapısı oluşur. Enzimin yapısında görülen N terminal ve C terminal uçlarının kovalent bağlanması  $\beta$ -kırmalı yapıya sahip enzimlerde son derece ender görülen bir durumdur [68].



**Şekil 1.9.** Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü. (A)  $\beta$ -kırmalı tabakalar ve (B) H1, H2, H3 ile gösterilen hidrofobik bölgelerin  $\beta$ -kırmalı tabakalara göre durumu.

Şekil 1.9'da da görüldüğü gibi;  $\beta$ -kırmalı yapıların ortasında 7,4 Å aralıklarla iki tane  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Bu kalsiyum iyonlarından bir tanesi yapısal olup,



uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona sebep olmaktadır. Diğer kalsiyum iyonu ise katalitik etkinlikle görevlidir. Ayrıca bu kalsiyum iyonu 2,1-2,5 Å mesafesinde Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu 53' den oluşan 5 adet aminoasit ile etkileşim halindedir. Bunun yanında aynı kalsiyum iyonu, fosfat iyonunun oksijeni ile bir su molekülü ile etkileşmektedir [71].

PON1 enzimi protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen PON1 i saflaştırmak halen zor olmaktadır. Bunun nedeni PON1 in HDL (apoA1) ile sıkı ilişkisidir [72].

PON1 enziminin protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen daha endojen substratları bilinmemektedir [61]. Daha yakın zamanlarda, rekombinant mühendislik PON1'in moleküler yapısını aydınlatmıştır [73].

### **1.2.3. Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonları**

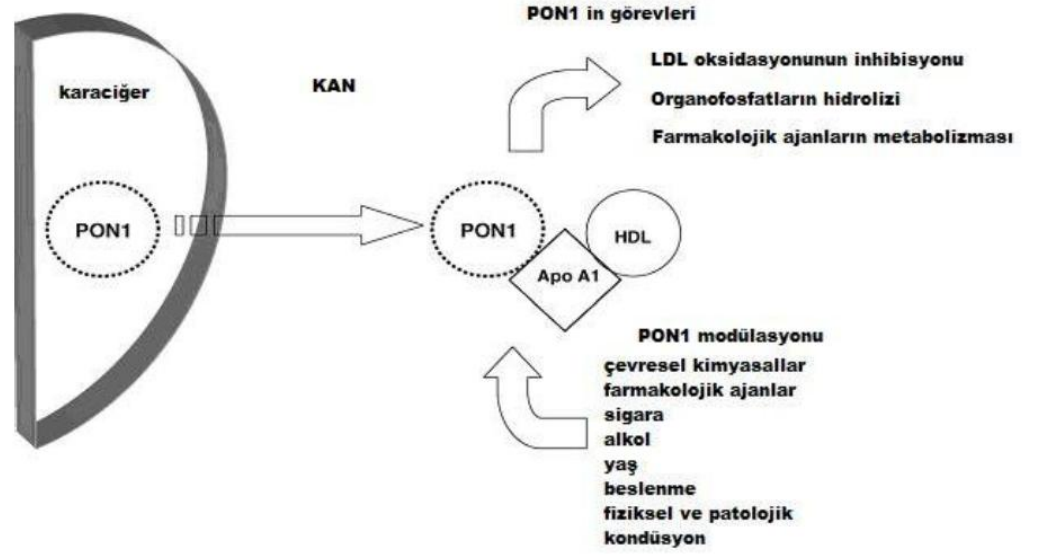
İlk kez Mackness tarafından; paraoksonaz enziminin serumda özellikle HDL'ye bağlı olarak bulunması ile bu enzimin lipit metabolizmasında önemli fizyolojik rolü olduğu tespit edilmiştir [74, 75]. PON1'in bu rolü özellikle lipit peroksitlerini metabolize etmesi ve LDL lipitlerinin okside olmasını önlemesi olarak gösterilmektedir [69, 76, 77]. Özellikle PON1'in fizyolojik fonksiyonunun belirlenmesinde, söz konusu enzime sahip olmayan fareler ile yapılan çalışmalar önemli ipuçları vermiştir. Örneğin, bu enzime sahip olmayan farelere lipit açısından zengin diyetle beslendiklerinde damar sertliği (arterosklerosis) oluşmuştur ve bu farelerin HDL yapıları LDL'nin yükseltgenmesini önlemede başarısız olmuştur [78]. Saflaştırılmış paraoksonaz enziminin de ateroskleroz sürecinin başlangıç evresi olan LDL fosfolipidlerinin yükseltgenmeye karşı korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir [79, 80]. Ateroskleroza karşı koruyucu etkisinde başlangıçta ters kolesterol transportundaki rolüne odaklanılmış, 1990'larda atardamar duvarında LDL'yi oksidatif modifikasyondan korunması ve yükseltgenmiş LDL'nin zararlı etkilerine karşı koruma gibi farklı antiaterojenik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır [81-84]. PON1'in LDL'nin yanı sıra lipit peroksitlerin taşıyıcısı HDL'i de

koruduğu, böylece makrofajlardan kolesterol çıkışındaki etkinliğini arttırdığı tanımlanmıştır [80].

Serum paraoksonaz enziminin, aromatik karboksilik asid esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, soman gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile göstermiştir [55, 64, 65, 85,86]. Son yıllarda PON1'in ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir [59]

Yapılan bir başka çalışmada ise, karaciğerde PON1 mRNA seviyelerinin okside fosfolipidlerle inhibisyon sırasında azaldığı gösterilmiştir [56]. Yine son yıllarda flavonoidlerin; LDL'nin endojen antioksidanlarının yıkımını engellediği, LDL'nin hücre aracılı oksidasyonunu inhibe ettiği ve HDL ilişkili enzim olan PON1'in aktivitesini koruduğu gösterilmiştir [56, 87].

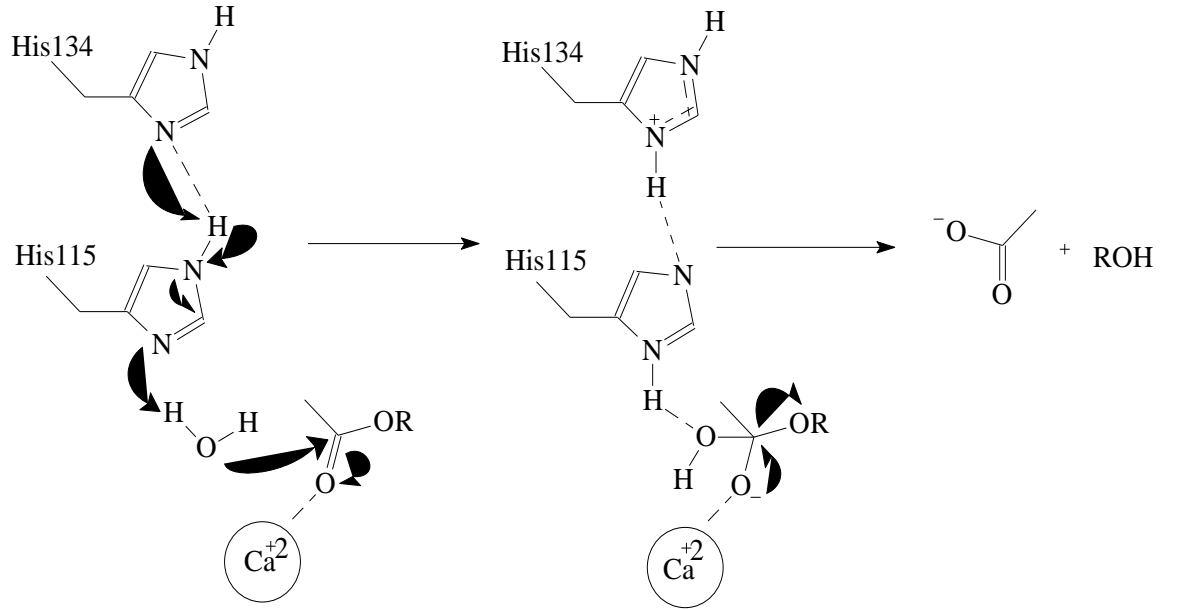
Statin laktonlar (simvastatin ve lovastatin) ve diüretik spironolakton, önceleri PON1 tarafından hidrolize edildiği rapor edilmesine rağmen, PON3 tarafından metabolize olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak PON1 antibakteriyel ilaç olan prulifloxacini özellikle PON1 R192 aleli bulunanlarda çok yüksek oranda hidrolize ve aktive eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PON1 ve PON2'nin bir başka görevi ortaya çıkmıştır. *Pseudomonas* bakterisinin patogenezi ve biyofilm oluşturmasını kontrol eden tanıma moleküllerini (N-açilhomoserin lakton) hidrolize ettiği gösterilmiştir. PON'ların laktonaz aktiviteleri ile yağ asitlerinin oksidasyonu ve genel yağ metabolizmasında rol oynadığı gözlenmiştir [73].



Şekil 1.10. PON1'in biyolojik etkilerinin düzenlenmesi [3]

#### 1.2.4. Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Paraoksonazın katalitik mekanizması [88]

Katalitik etkinlik gösteren Ca<sup>2+</sup> iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca<sup>2+</sup> iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki Ca<sup>2+</sup> iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar.

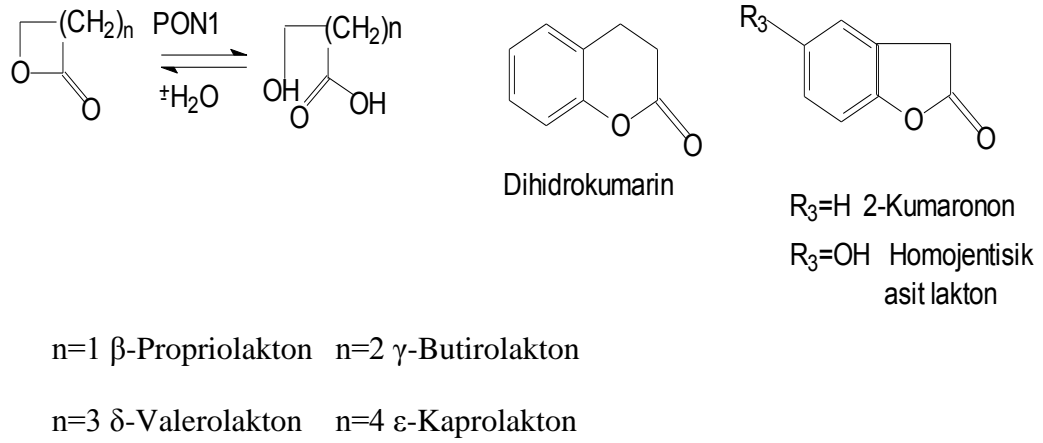
PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu

substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [88].

### 1.2.5. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgülüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu aktivitelerin tümünün tek bir aktif merkezde mi yoksa birden fazla aktif merkezde mi gerçekleştiği, substrat seçiciliğinin nasıl belirlendiği de henüz tespit edilmemiştir.

PON1'in arterosklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [89-91]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksitlerini metabolize ederek arterosklerozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [2, 92, 93]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan  $\delta$ -valerolakton (6 halkalı lakton),  $\gamma$ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve  $\epsilon$ -kaprolaktondan (7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlar afinitesi alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkasında  $\alpha$  ve  $\beta$  çift bağı olmasına rağmen PON1 tarafından hidrolizlenememektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir [94-97] (Şekil 1.12).



**Şekil 1.12.** Lakton hidrolizi [89]

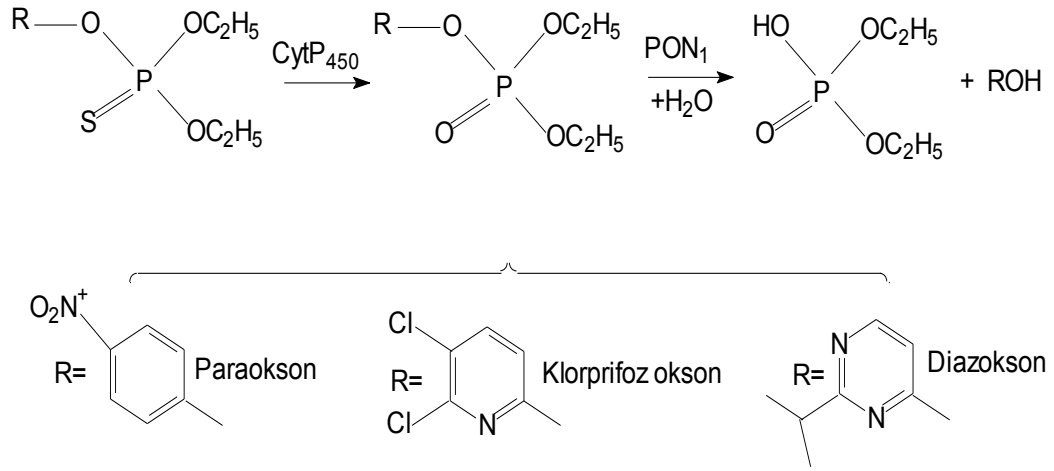
Önceleri PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda ilk olarak, Augustinson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağlı aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur. Bu reaksiyonda PON1'in substrat olarak kullanacağı esterlerin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [98]. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada, vinil asetat ve  $\Delta^2$ -siklopentil asetatın PON1 tarafından hidrolizlenmesi fakat etil asetat ve siklopentan asetatın PON1 tarafından hidrolizlenememesi bu öneriyi desteklemektedir [92]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Bu etkileşim benzer şekildeki içte bulunan ester formları için mümkün değildir. Örneğin etil asetat PON1 ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren  $\gamma$ -bütirolakton iyi hidrolizlenmektedir [89, 92].

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye karşı koruduğu düşünülmektedir [80, 99]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını

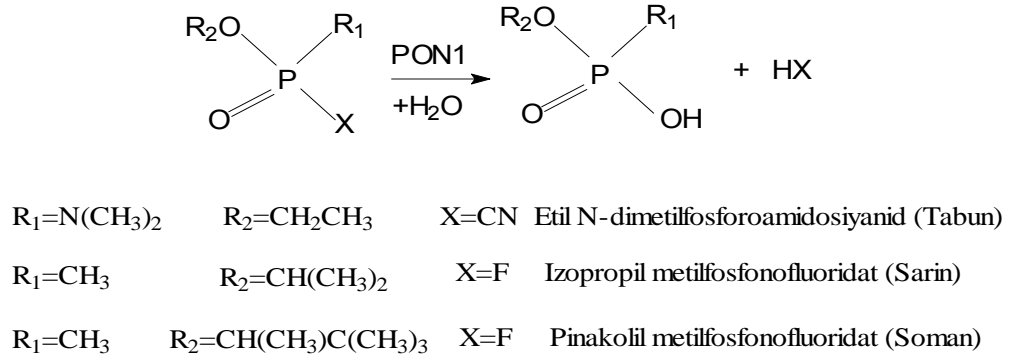
göstermişlerdir [70]. Ancak aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir [100].

PON1 bazı lakton ve karbonat esterlerini içeren ilaçları ve ilaç ön maddelerini de hidrolizleyebilmektedir. Örneğin, diüretik bir ilaç olan spironolakton ve 3-hidroksimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin bu enzim tarafından hidrolizlenir. Önceleri yapılan çalışmalarda bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır [101, 102]. Ayrıca PON1 glukokortikoid  $\delta$ -laktonların [93] sistemik metabolize edilmesinde ve ön ilaç maddesi olan karbonat ester yapısındaki prulifloksasinin aktivasyonunda [103] rol oynamaktadır. Bunun gibi PON1'in laktonaz aktivitesinden başlıca yönetici ajanların metabolize edilmesinde ve bunların istenmeyen yan etkilerinin azaltılmasında yararlanılmaktadır [93]. Laktonların isosterik formları olan laktamlar oksijen halkası yerine azot halkası ihtiva ederler. Laktamlar PON1'in substratını oluşturmazlarken enzimi inhibe ederler. *In vitro* çalışmalarda  $\delta$ -valerolaktam,  $\epsilon$ -kaprolaktam ve 2-hidroksikinolin gibi laktamlar PON1 enziminin güçlü inhibitörleridir [92].

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.13) [104, 105] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [106-109]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [88]. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.



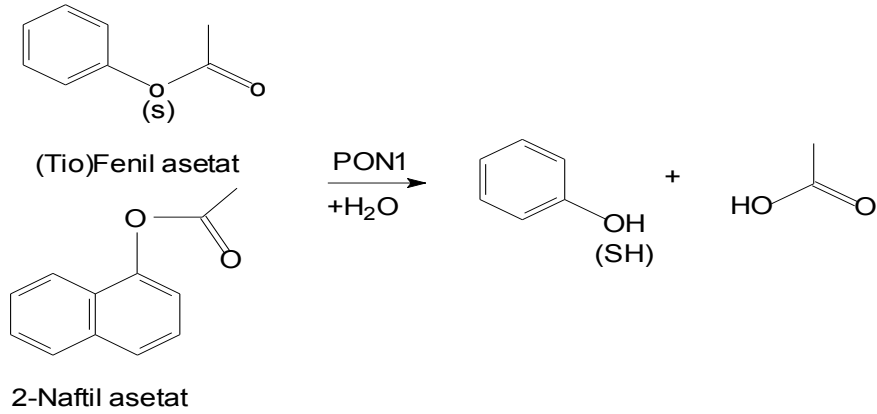
**Şekil 1.13.** İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi [89]



**Şekil 1.14.** Sinir gazlarının hidrolizi [89]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır (Şekil 1.15) [70, 104, 110].





**Şekil 1.15.** Aromatik esterlerin hidrolizi [89]

### 1.2.6. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir [111]. Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promoter aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır [112-114]. PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [115-117].

PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir [110, 118]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine katılarak PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [119]. PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [120, 121]. PON1 enziminin HDL

lipoproteinine bağlanmasında HDL'nin yapısındaki fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır. Ancak LDL'nin fosfolipit içeriği PON1'in hücre zarının dış yüzeyinden salınmasında ve kendisine bağlanmasında yeterli değildir. [119, 120]

### **1.2.7. PON Enziminin Saflaştırılması**

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [122]. Saflaştırma prosedürlerinde öncelikle söz konusu enzimin bağlı olarak bulunduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlk olarak A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz) Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [123] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [124]. Ancak paraoksonaz ismi ile ilk saflaştırma koyun serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [125]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [126].

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzimin serumda veya karaciğerde bulunuş durumuna göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme kromatografisi, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değiştirme kromatografisi, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi, mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ve DEAE biojel kromatografisidir. Uygulanan metotların sırası enzim kaynağının serum veya karaciğer olmasına bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda bir yada diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; Gan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum paraoksonazının saflaştırma prosedürü için iki DEAE anyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır [127]. Furlong tavşan ve insan serumundan paraoksonaz enzimini Cibacron Blue 3GA-

Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografî yöntemlerini kullanarak saflaştırmıştır [128]. Sıçan karaciğerinden paraoksonaz enzimi sırasıyla hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite Mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır [129]. Sıçan karaciğerinden PON3 enzimi de sırasıyla hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite, birinci DEAE anyon değiştirme, ikinci DEAE anyon değiştirme ve konkanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Paraoksonaz enzimi karaciğerde mikrozo mlara, serumda da HDL'ye bağlı olmasından dolayı homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [130-132]. Söz konusu enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde enzimi mikrozo mlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [133] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir [127, 128].

### **1.3. Quorum Quenching ( Yeterlilik bastırma )**

Quorum Quenching (QQ) mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulmasıdır [134].

Çoklu ilaç direncine sahip kökenlerin artışı enfeksiyonların tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bakterilerin birçok virülans faktörünün QS ile düzenlenmesi, yeni antimikrobiyaller geliştirilebilmesi amacıyla ilginin QS üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. QS'nin doğrudan bakteri üremesi üzerine etkisinin olmaması, QS inhibisyonunun antibiyotiklerde gözlenen direnç gelişimine benzer şekilde dirençli kökenlerin seçilmesine neden olmamasıyla bir avantajdır [135].

Çevreyi algılama sistemi (QS) kullanılarak gen işleyişinin engellenmesiyle, çok sayıda bakteri enfeksiyonlarının kontrol edilmesi yeni stratejiler arasındadır [35].

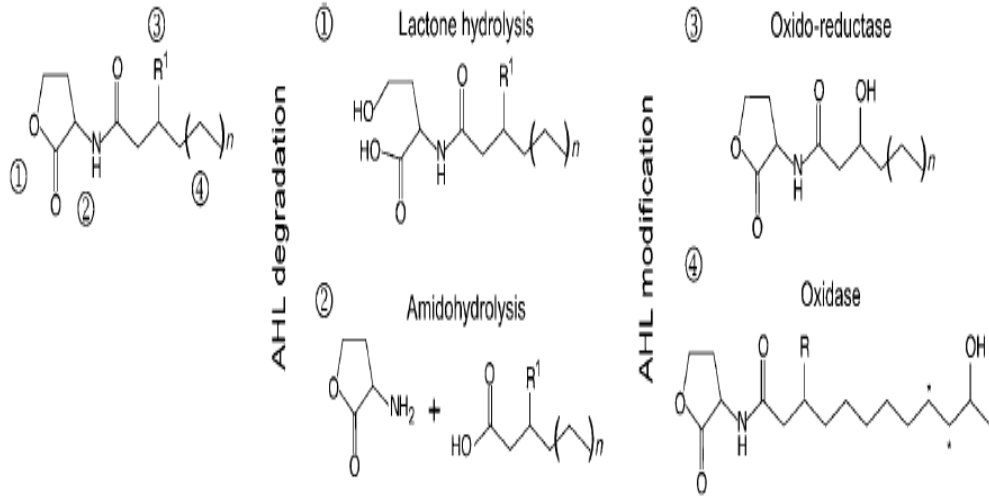
Bu karmaşık regülatör sistemde bir çok potansiyel hedef bölgenin varlığı mevcuttur.

QS inhibitörlerinin (QSI) tanımlanabilmesi amacıyla doğal ve sentetik çok sayıda kimyasal madde taranarak inhibitör etkili birçok bileşik saptanmıştır. Bu bileşikler etkilerini üç farklı seviyede göstermektedirler:

- 1) QS molekülünün sentezinin engellenmesi,
- 2) QS molekülünün yıkılması veya inhibisyonu,
- 3) QS sinyal alınımının önlenmesi [135, 136].

Üzerinde en az araştırma yürütülen yaklaşım sinyal üretiminin blokajı olmuştur. Her ne kadar holo-ACP, L/D-S-adenozilhomosistein, sinefungin, bütiril-S-adeniozilmetyonin (bütiril-SAM) gibi bazı maddelerin AHL üretimini engelledikleri gösterilmişse de [137], bakteri üzerine etkileri *in vivo* çalışılmamıştır. Ayrıca bakteri metabolizmasında önemli görevler alan bu moleküllerin diğer hücre fonksiyonlarını nasıl etkileyeceği bilinmemektedir.

Bir diğer yaklaşım sinyal moleküllerinin etkisizleştirilmesi olabilir. AHL molekülündeki lakton halkasının dayanıklılığı ortamın pH değerine bağlıdır ve pH 7'den yüksek değerlerde lakton halkası açılır (laktonoliz) [138]. Bir bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'nın patolojik etkilerinden korunmak amacıyla bu bakteri ile karşılaşan bitkilerin pH değerini artırarak bakteriye karşı korunma sağladıkları gösterilmiştir [139]. Laktonoliz enzimler yardımıyla da gerçekleştirilebilir, örneğin *Bacillus* türlerinin AiiA adında bir enzim üreterek AHL'yi parçaladığı gösterilmiştir [140], bunun yanısıra *P. aeruginosa* PAI-A, *Arthrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Rhodococcus sp.*'de de AiiA homologue enzim üretimi gösterilmiştir [141-144]. İnsan solunum yolu epitel hücrelerinde de benzer bir enzimatik aktivite ile AHL moleküllerinin parçalandığı gösterilmiştir. 3-okso-C12-HSL'yi etkileyen bu aktiviteden C4-HSL etkilenmemektedir [145].



**Şekil 1.16.** AHL degradasyon yolları ve degradasyon ürünleri. Degradasyon yolları : (1) Lakton hidrolizi; 2) Aminohidroliz; 3) Oksidoredüktaz; 4) Oksidaz ) [141].

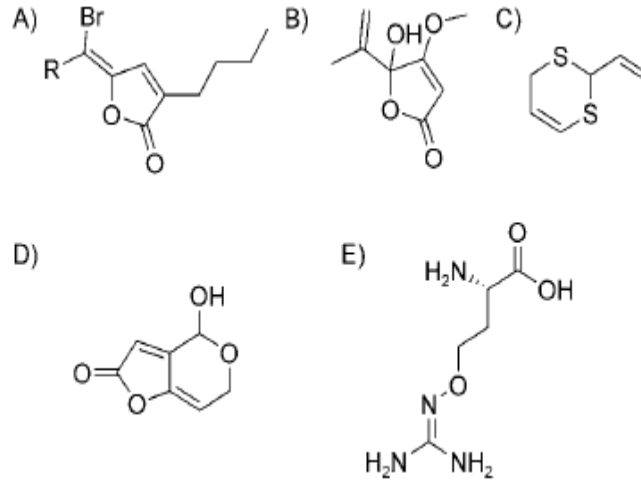
Son olarak QS sistemini durdurmak için bir diğer yaklaşım, sinyalin bakteri tarafından algılanmasını engellemek olabilir. Bu amaçla reseptör proteinin (LuxR homologu) AHL sinyal molekülü analogu ile bloke edilmesini amaçlayan çalışmalar yürütülmüştür [146].

### 1.3.1. Quorum Sensing İnhibitörleri

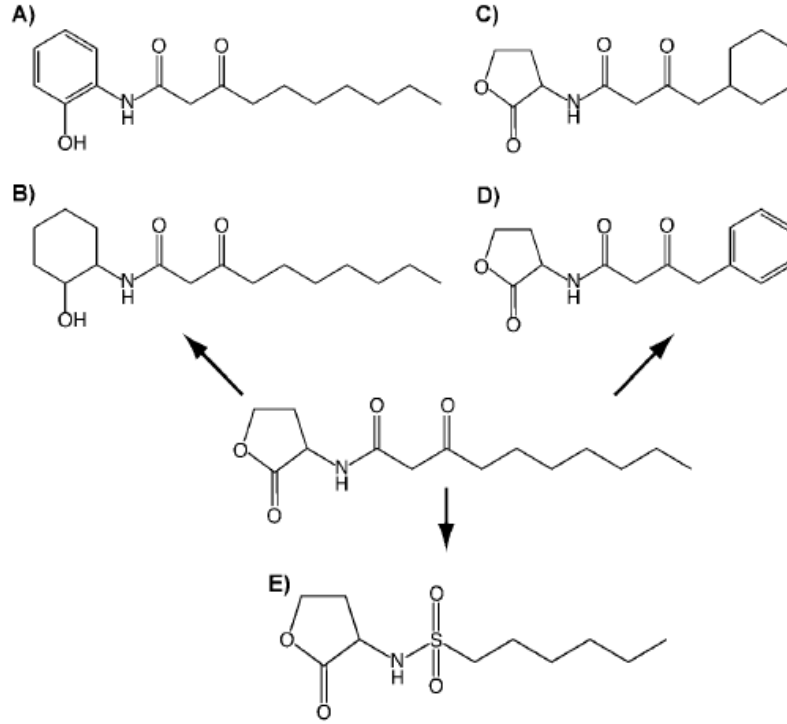
Rasmussen ve ark. [147] rasgele çok sayıda molekülü tarayarak QSI etkili moleküller tanımlamıştır, bunların içinde en etkili bulunan 4-nitro-piridin-N-oksit'in (4-NPO), *P. aeruginosa*' da QS ile düzenlenen genlerin ifadesinde %37'lik bir azalma sağladığını göstermişlerdir.

Aynı etkiyi gösterecek doğal bileşiklerin saptanması amacıyla bitkiler ve mantarlar tarandığında, araştırılan 50 Penicillium türünün %66'sında QSI aktivitesi gösteren ikincil metabolitler olduğu belirlenmiştir. Bunlardan penisilik asit *P. aeruginosa*'da QS ile düzenlenen genlerin ifadesinde %60'lık, patulin ise %45'lik bir azalma sağlamıştır [148]. Ayrıca birçok bitkide (renkli burçak, havuç, soya

fasulyesi, nilüfer çiçeği, domates, bezelye, kırmızı biber ve sarımsak gibi) QSI özelliği olduğu belirlenmiştir [147]. Yapılan kısıtlı sayıdaki *in vivo* çalışmalarda fare akciğer enfeksiyonu modelinde furanon 30 [149], sarımsak özütü [150], patulin [148] gibi bazı QSI molekülleri denenmiş ve moleküllerin akciğerlerdeki bakterilerin temizlenmesine, mortalitenin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. İnsan enfeksiyonları tedavisinde QSI kullanımını için henüz erken olsa da, ümit vaat eden bulgulara erişilmiştir.



**Şekil 1.17.** Doğal kaynaklardan quorum sensing inhibitörleri A) *Delisea pulchra* ‘dan halojenlenmiş furanon. B) *Penicillium* ‘dan penisilik asit. C) Sarımsaktan elde edilmiş siklik sülfür içeren bileşik. D) *Penicillium* ‘dan patulin . E) *Medicago truncatula* ‘ dan L-kanavanin



**Şekil 1.18.** Sentetik quorum sensing inhibitörleri A) 3O,C12-aminofenol. B) 3O,C12 –aminosikloheksanol . C) 3O,sikloheksanil C6-HSL. D) 3O,benzil C6-HSL. E) N-sülfonil- HSL .

### 1.3.2. Quorum Quenching (QQ) Enzimleri

#### 1.3.2.1.Prokaryotlarda yeterlilik bastıran (QQ) enzimler

Bulaşıcı bakteri hastalıklarından korunmak için QS'in uygun bir hedef olup olmadığı araştırılırken, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia stewartii*, *Pseudomonas aruginosa* ve *Xenorhabdus nematophilus* gibi bitki ve insan (ve hayvan) patojen bakterilerinin toksisiteleri için AHL QS sinyallerine bağımlı olduğu bulunmuştur. Bir AHL sinyali konsantrasyonu toksisite gen ekspresyonu için anahtar rol oynadığı için, patojen bakterilerin ürettiği AHL sinyallerinin azaltılması üzerine bir strateji geliştirilmektedir. *aiiA* geni tarafından kodlanan yeterlilik bastıran bir enzim ilk defa Gram-pozitif *Bacillus* türüne ait bir toprak bakterisinde görülmüştür, bunun bir **AHL-laktonaz** olduğu sonradan belirlenmiştir [151].

*aiiA*'nın tanımlanmasından kısa bir süre sonra, Leadbetter ve Greenberg [152] *Variovorax paradoxus*'a (VAI-C) ait tek enerji ve azot kaynağı olarak AHL moleküllerini kullanan bir tür bulmuşlardır. *Variovorax paradoxus*'un AHL metabolik karışımında homoserin lakton bulunması bakterinin **AHL-açılaz** üretebildiğini düşündürmüştür [152], fakat AHL-açılaz gen kodlaması klonlanmış ve tanımlanmış durumdadır [153].

Benzer şekilde, AHL-parçalayıcı enzimler ürettiği bilinen diğer bakteri izolatları ve türleri toprak, bitki ve biyofilm örnekleri ile laboratuvarında bakteri kültürlerinde saptanmıştır [154,155]. QQ (yeterlilik bastıran) enzim etkinliği şimdiye kadar en az 10 bakteri türünde gösterilmiş ve kaydedilmiştir, bunlar arasında dört *Bacillus* türü, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter* türleri ve *V. paradoxus* da bulunmaktadır (Çizelge 1.2 ).

Filogenik analizler bu prokaryotik AHL-laktonazlarının iki gruba ayrılabilirliğini göstermiştir. *aiiA* grubu *Bacillus* sp. türünden tüm AHLlaktonazları içerir, bunlar arasında %90 peptid sırası homolojisi vardır [155] *attM* grubu *A. tumefaciens*, *K. pneumoniae* ve *Arthrobacter* sp. enzimlerini içerir ve bunlar peptid sıralamalarında %30-58 benzerlik gösterirler [151].

### 1.3.2.2. Ökaryotlarda AHL parçalayıcı enzimler

Ökaryot konaklar da düzenli olarak mikrobiyal patojenlerle karşılaştığı için, daha yüksek organizmaların da patojenik istilacıların QS sinyal sistemlerini etkisiz hale getirmek için mekanizmalar ürettiği ya da düzenlediğini düşünebiliriz. Şimdiye kadar ökaryotik olan sadece iki tür AHL-parçalayıcı enzim bulunabilmiştir (Çizelge 1.2). Yeni bir çalışma, ortak porsin böbrek **açılaz I**'in (EC 3.5.14) C4-HSL ve C8-HSL deaçilazı yaparak L-homoserini üretebildiğini göstermiştir [156].

Daha yeni çalışmalar ise, 3OC12-HSL parçalama etkinliğinin en çok *PON* genlerinde kodlanan paraoksonazlara bağlı olduğunu göstermektedir [157]. Bu bulgu şaşırtıcı olmayıp, insan paraoksonazlarının laktonaz etkinliği 30 farklı non-AHL tipi



laktonla gösterilmiştir [2]. Ayrıca, PON enzimleri ilaç metabolizması ve sinirlerin detoksifikasyonu gibi diğer bazı önemli fizyolojik hidrolik etkinlikleri de göstermektedir [158]. QS sinyallerinin inaktivasyonu artık PON enzimlerinin bilinen biyolojik fonksiyonlarından biri olarak sayılmaktadır.

**Çizelge 1.2.** Prokaryotlarda ve ökaryotlarda AHL parçalayıcı enzimler

<b>Tür Enzim</b>	<b>Prokaryotlar</b>	<b>Gen</b>
<i>Bacillus</i> sp. 240B1	<i>aiiiA</i>	AHL laktonaz
<i>B. thuringiensis</i>	<i>aiiiA</i> homologları	AHL laktonaz
<i>B. cereus</i>	<i>aiiiA</i> Homologları	AHL laktonaz
<i>Mycooides</i>	<i>aiiiA</i> homologları	AHL laktonaz
<i>B. anthracis</i>	<i>aiiiA</i> homologları	AHL laktonaz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>attM, aiiB</i>	AHL laktonaz
<i>Arthrobacter</i> sp. IBN110	<i>ahlD</i>	AHL laktonaz
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>ahlK</i>	AHL laktonaz
<i>Variovorax paradoxus</i> VAI-C	-	AHL açılaz?
<i>Pseudomonas</i> strain PAI-A		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>pvdQ</i>	AHL açılaz
<i>Ralstonia</i> strain XJ12B	<i>aiiD</i>	AHL açılaz
<b>Ökaryotlar</b>		
İnsan (dış epitel) Laktonaz		<i>PONs</i>
Porsin (böbrek) Açılaz I		<i>ACYI</i>

Bu amaçla çalışmamızda PON1 enzimi, insan serumundan amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Sepharoz 4B- L tirozin -1 naftilamin) yöntemleri ile saflaştırılmıştır.

Saf enzim ile öncelikle *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha sonra literatürde sinyal molekülü olarak bilinen N-hexa-L-homoserin lakton, N-3-oxooctonoyil-L-homoserin lakton moleküllerinin saflaştırılmış PON enzimi ile hidrolizlendiği *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca lakton yapıdaki sinyal moleküllerini kullanan bazı gram negatif ve gram pozitif bakterilerin üremesi üzerine serum PON1 enziminin etkisi de belirlenmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1. MATERYALLER

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletilediamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl, Fetal Calf Serum (FCS) Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat,  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merk'den sağlandı. Bunlara ilave olarak LB (%1 tripton, %0.5 maya ekstraktı, %0.5 NaCl), kristal viyole (Sigma), metanol (Merck), TSB ( tripton soy broth), asetonitril, aseton, N-hexa-L-homoserine lactone (fluka), N-3-oxooctonoyl-L-homoserine lactone (sigma), HEPES, bakır sülfat, NaK tartarat, folin fenol, iodo nitrotetrazolium violet (fluka) kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Bakteri Suşları ve Besiyerleri

Tez çalışması kapsamında birçok patojen bakterinin sinyal molekülleri üzerine etkinin gözlemlenmesi amacıyla üniversitemiz mikrobiyoloji laboratuvarımızdan temin ettiğimiz gram negatiflerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Escherichia coli* ATCC 11230 ve gram pozitiflerden *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P kullanılmıştır. Ayrıca QS mekanizması sonucu meydana gelen biyofilm davranışı üzerine enzim etkisinin incelenmesi için de *P. aeruginosa* PAO303 Assoc. Dr. Jeppe Lund NIELSEN [Aalborg University Department of Chemistry, Biotechnology and Enviromental Engineering, DENMARK]' dan temin edilmiştir.

*P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* CCM 2318, *E. coli* ATCC 11230, *S. aureus* ATCC 6538P Nutrient Agar, Nutrient Broth besiyerlerinde ayrıca

*Pseudomonas aeruginosa* PAO303 LB agar, LB broth besiyerinde, biyofilm davranışı deneyleri için de TSB (Trypticase Soy Broth) (Sigma) besiyerlerinde 30°C'de üretilmiştir.

### 2.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Peristaltik pompa	Atta SJ1211
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
Kromatogafi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 20 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Laminar Flow	Telstar Bio IIA
Gradient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Thermo-block	Eliwell FALC
İnkübatör	Nuare CO <sub>2</sub> -Water Jacket Incubator

Jel Görüntüleme Sistemi  
HPLC

Gel Doc-H Imaging System  
(UVP)  
Agilent 1100 Series

#### 2.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerlerinin Hazırlanması

➤ **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** *1M*  $(NH_4)_2SO_4$  içeren, *0.1 M*  $Na_2HPO_4$  tamponu (*pH 8.0*); 14.2 g (0.1 mol)  $Na_2HPO_4$  ve 132.14 g (1 mol)  $NH_4(SO)_2$  950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

➤ **Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** *1M*  $NH_4(SO)_2$  içeren, *0.1 M*  $Na_2HPO_4$  tamponu (*pH 8.0*) ve *0.1 M*  $Na_2HPO_4$  tamponu (*pH 8.0*) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14.2g (0.1 mol)  $Na_2HPO_4$  ve 132.14 g (1 mol)  $NH_4(SO)_2$  950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14.2 g (0.1 mol)  $Na_2HPO_4$  950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

➤ **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:**

**Fenol ayıracı:** Folin-fenol ve distile sudan bire bir oranda alınarak hazırlandı .

**Ayıraç A :** % 2'lik  $Na_2CO_3$  0.1 M NaOH'da çözüldü.

**Ayıraç B :** %1 NaK tartarat distile suda çözüldü

**Ayıraç C :** % 0.5'lik  $CuSO_4$  distile suda çözüldü.

**Ayıraç D :** 48 mL A ayıracından, 1mL B ayıracından, 1mL C ayıracından konulup hazırlandı.

**Sığır Serum Albumini (BSA):** 5 mg 5 ml suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

➤ **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** 0,1 M Tris-Baz tamponu (pH 8.0); 1.211 g (0.01 mol) tris-Baz 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **Substrat çözeltisi:** 2 mM paraokson çözeltisi; 10.8 µl paraokson, 1 mL asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1 mL bazal aktivite tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanıldı.

➤ **Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** 2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM tris-HCl, pH=8; 3.0285 g (25 mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8.0'e getirildi. 0.0555 g (0.5 mmol) CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

➤ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β-merkaptetanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 g
Distile su	0.5 mL

➤ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1’de verilmektedir.
- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0.66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.
- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.



**Çizelge 2.1.** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	<b>Ayırma Jeli</b>	<b>Yığılma Jeli</b>
	<b>% 10</b>	<b>% 3</b>
<b><u>Akril amid/Bis</u></b>		
Akril amid 15 g		
Bis 0.4 g	16.65	2.6 mL
Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
Distile su	20.1 mL	12.2 mL
<b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b>		
Tris-HCl 11.82 g		
Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	–
<b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b>		
Tris-HCl 3.94 g		
Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<b><u>% 10 'luk SDS</u></b>		
SDS 1g		
Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 µL	200 µL
<b>TEMED</b>	25 µL	20 µL
<b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b>		
Amonyum persülfat 1g		
Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

➤ **Sinyal moleküllerinin hazırlanışı için kullanılan tamponlar:**

*1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100mM HEPES tamponu (pH 7.4);* 6.507 g HEPES 200 ml distile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 7.4'e getirildi. 0.011 g CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

*1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100mM tris HCl tamponu (pH 7.4);* 0.06057 g tris HCl 80 ml distile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 7.4'e getirildi. 0.011 g CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **Gram boyama için kullanılan çözelti :** %0.5' lik Kristal viyole; 1.25 g kristal viyole 250 ml distile su içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Her bir kullanımdan önce filtre kağıdından süzülür .

➤ **HPLC Çözeltilerinin Hazırlanışı:** Kullanılan elüsyon çözeltileri A (% 0.2 asetik asit), B (% 20 distile su), C (% 80 asetonitril)'dir.

➤ **Tetrazolyum viyole metabolizma indikatörü:** 0.04 g iodo nitrotetrazolyum viyole 5 ml steril distile suda çözümlenerek hazırlandı.

➤ **Serum Fizyolojik Hazırlanışı:** 4 g NaCl, 1 l distile suda çözümlenerek hazırlandı. Daha sonra falcon tüplere paylaştırılarak 20 dk 121°C'de steril edildi. İnokulum süspansiyonunun hazırlanışı işleminde kullanıldı.

➤ **İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı:** Antibakteriyal aktivitede bakteri süspansiyonları serum fizyolojik ile MacFarland 0.5 standardına göre hazırlandı. Aynı zamanda spektrofotometre ile 600 nm'de 0.5 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edildi.

Katı kültürden inokulum hazırlanırken Middlebrook 7H9'da süspansiyon edilen örnek vortekslendikten sonra katı parçacıkların çökmesi beklenerek üstte kalan süpernatant kısmı steril tüpe aktarıldı. MacFarland 0.5 oluncaya dek gözle ayarlama yapıldı. Daha sonra 1 ml alınıp 4 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak inokulum süspansiyonu hazırlandı.

- **Luria-Bertani (LB) Broth ve Agar Besiyerlerinin Hazırlanması:** LB besiyeri Sambrook ve ark., 2001 protokolüne göre hazırlanmıştır. 1000 ml saf su içerisinde 5 g NaCl, 10 g triptone ve 5 g yeast extract (maya özütü) çözündürülerek pH'sı 7.5 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan LB 15 dakika 121°C'de sterilize edilmiştir. Hazırlanan LB besiyerine % 1.5 bacto agar eklenerek katı besi ortamları hazırlanmıştır.
- **Tryptic Soy Broth (TSB) Besiyerinin Hazırlanışı:** Besiyeri, 30.0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilir. Amaca uygun şekilde tüplere ve/ veya erlenlere dağıtılıp, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Otoklav sonrası 25°C'da pH'sı 7.3±0.2 olacak şekilde muhafaza edilir.
- **Nutrient Broth ve Agar Besiyerlerinin Hazırlanışı:** Besiyeri, 8.0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilir ve amaca uygun kaplara (tüp, erlen vs.) dağıtılır. Otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renkli olup, 25 °C'da pH'sı 7.0±0.2 olacak şekilde muhafaza edilir.

## **2.2. METOD**

### **2.2.1. Kan serumunun ayrılması**

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4°C'de ve 10–15 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Serum örneklerinin paraoksonaz enzim aktivitesine spektrometrik olarak bakılmıştır. Belirli aktiviteye sahip örnekler elde edilmesi halinde ayrılan serum saflaştırma işlemine kadar –20°C'de bekletilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### **2.2.2. Enzim Aktivite Tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.05 mL enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1mL tampon (100 mM tris-baz pH:8.00) + substrat (2 mM paraoxon) + koenzim (2 mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de 1 dakikada 37°C'de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde paraoksonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edildi.

### **2.2.3. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini**

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin Cu<sup>+2</sup> katalizli oksidasyonundan sonra, ayrıca bulunan fosfomolibdik, fosfotungistik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin- Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Özetle deneyin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturmaya dayanır [159]. Koyu mavi oluşu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorbans verir. Yöntem çok duyarlıdır. Ancak pH'ya bağlıdır. Hassasiyet aralığı 5-100 µg/mL'dir. Ortam pH'sı 10-10.5 olmalıdır. Bu

yöntem triptofan ve tirozin içeriği fazla olan proteinlerin miktar tayini için avantajlıdır. Zira ayrıca bu aminoasitlere daha yüksek hassasiyet gösterir. Bu yöntemde 4 farklı çözelti kullanılır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µl alındı. Her tüpe 2 ml D ayırıcından eklendi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her tüpe 0.2 mL folin-fenol çözeltisinden eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 600nm de köre karşı absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Protein miktarını ölçmek için hazırlanan enzim çözeltilerinde 0.1 ml 2 ayrı tüpe konuldu. Üzerlerine 2 ml D ayırıcından eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra her tüpe 0.2 ml folin-fenol bileşiği eklenip vorteksle karıştırıldı. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 600 nm de absorbansları okundu. Ölçümlerin ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

#### **2.2.4. Enzimin Saflaştırılması**

##### **2.2.4.1. Amonyum sülfat çöktürme aralığı**

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

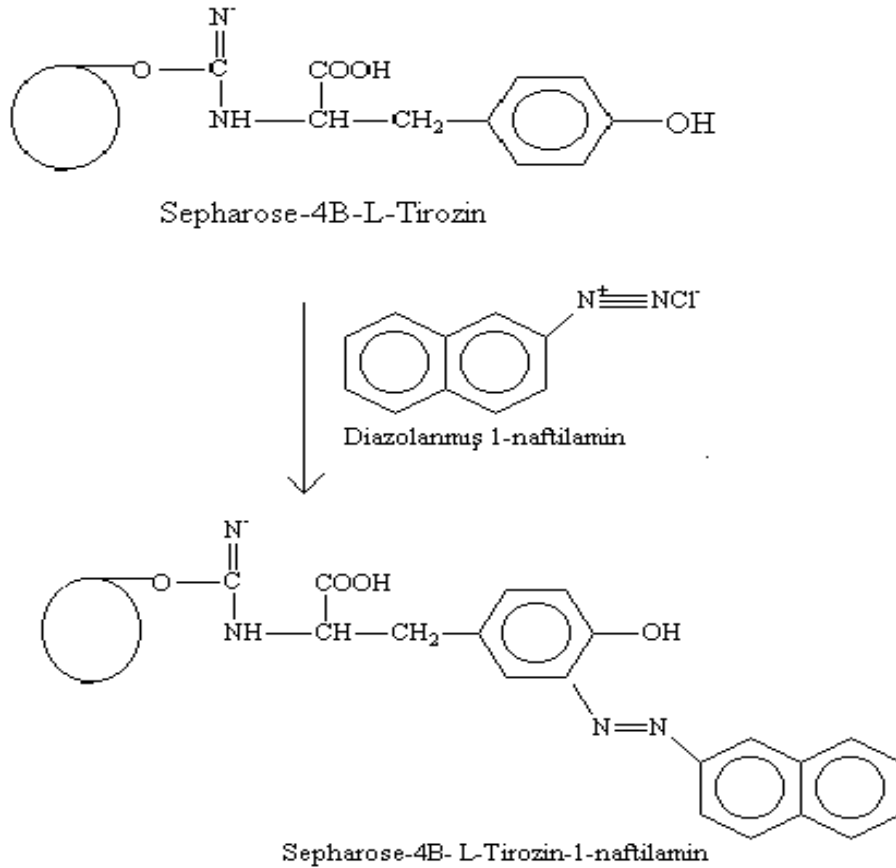
S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimi için uygun amonyum sülfat çöktürme aralığı 60-80'dir. Paraoksonaz enzimini saflaştırmak için % 60-80 aralığında çöktürme yapılmıştır.

#### 2.2.4.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

PON1 enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Bunun için de laboratuvarımızda sentezlediğimiz hidrofobik jel sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır. ( Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Hidrofobik jel sepharose 4B L tirozin 1 naftilamin

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi 5 ml çökelek tampon ile çözüldükten sonra 1M amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu ve 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Kolondan toplanan yıkama ve elüsyon çözeltisi 1.5 mL halinde tüplere alındı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm 1dk 37°C'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.2).

#### **2.2.4.3. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü**

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığılma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [160].

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar otomatik pipet veya enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için distile su ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (30 dakika) üst

yüzeydeki distile su döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla enjektör yardımıyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu. Elde edilen çözelti toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (118.0 kDa), sığır serum albumin (79.0 kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa), β-laktoglobulin (25.0 kDa) ve Lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein markırı kullanıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100°C'de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1–1.5 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar (1 gece) bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.



### 2.2.5. HPLC Analizi

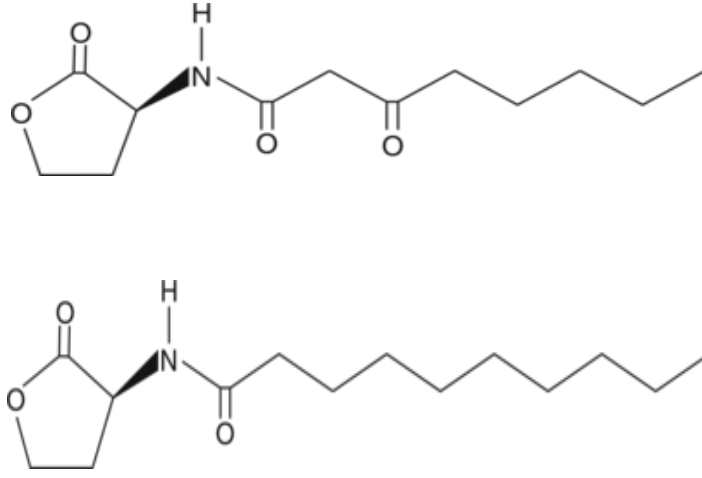
HPLC cihazı, bir Agilent 10100 model HPLC sistemidir. Bu sistem, bir çift dalgıç pompa, UV dedektör, kolon fırını ve 20 µl enjeksiyon ilmiğinden oluşmaktadır. HPLC’de kullanılacak kolon 5 µm paketleme ile bir Apex oktadesil 104 C<sub>18</sub> ( 25 x 0.4 cm ID) kolonudur.

HPLC’de analiz için aşağıda belirtilen metod kullanıldı;

Dalga boyu taraması için 10 µM 3-oxo-C8HSL ve 100 µM C10HSL şeklinde sinyal molekülleri hazırlandı. 10 µM 3-oxo-C8HSL, 100 mM HEPES tamponu (pH 7.4) içerisinde çözülerek hazırlanırken [161], 100 µM C10HSL ise 5 mM Tris HCl tamponu (pH 7.4) içerisinde çözüldü [162]. Sinyal molekülleri ilgili reaksiyon tamponunda hazırlandıktan sonra her biri için reaksiyon tamponuna karşı dalga boyu taraması yapıldı.

3-oxo-C8HSL ve C10HSL için absorbans değeri olarak sırayla 220 nm ve 210 nm kullanıldı. Kullanılan elüsyon çözeltileri A (% 0.2 asetik asit), B (% 80 asetonitril), C (% 20 distile su)’dur. Akış oranı 1 ml / dk ve çalışma süresi 30 dakikadır. Çalışma 30°C de yapıldı. Örnek enjeksiyon hacmi 20µl’dir. Bileşiklerin tespit edilmesi onların standartları ile alıkonma süreleri kıyaslanarak yapıldı.

10 mg/ml PON1 enzimi, 10 mg/ml C10HSL ve 100 mg/ml 3OC8HSL sinyal molekülleri ile 9:1 oranında ayrı ayrı karıştırıldıktan sonra 37°C’de 60 dk inkubasyona bırakıldı. Ardından 95°C’de 3 dk reaksiyonun durdurulması amaçlandı [163]. Örnek, HPLC için kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 2.2. 3-oxo-C8HSL ve C10HSL

### 2.2.6. Optimum şartlarda sinyal moleküllerine ait $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması

$K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda substrat olarak kullanılan, ticari olarak satın alınan 3OC8HSL ve C10HSL sinyal moleküllerinin en az beş farklı konsantrasyonunda paraoksonaz enzimine karşı aktivite ölçümü yapıldı. Her ölçüm üç defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

$1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

### 2.2.7. PON1'in *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakterilerinin üremesi üzerindeki etkinin gösterilmesi

Bakteri üremeleri üzerindeki etkinin incelenmesi amacıyla herbir bakterinin 24–48 saatlik taze kültürlerinden Macfarland 0.5 indeksine göre inokulum süspansiyonları hazırlandı. Pozitif kontrol grup olarak plakalardaki her üç kuyucukta bir bakteri örneği olacak şekilde 20  $\mu$ l mikroorganizma, 150  $\mu$ l distile su ve 50  $\mu$ l

nutrient broth besiyeri ilave edildi. Aynı koşullar altında mikroorganizma bulundurmayan negatif grup oluşturuldu. Diğer her bir kuyucuğa da 50 µl nutrient broth besiyeri, 150 µl farklı konsantrasyonlarda ( 1 mg, 500 µg, 250 µg, 100 µg, 1 µg ve 0.1 µg ) filtre edilerek hazırlanmış steril saf serum PON1 enzimi ve son olarak da her bir enzim içeren kuyucuğa 20 µl mikroorganizma ilave edilerek 37 °C’de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Plaka düzeneği şekil 2.5’deki gibidir.

İnkubasyonun ardından her bir kuyucuğa 10 µl tetrazolyum viyoletole metabolizma indikatörü ilave edilerek her bir bakteri türünün boyanma süresine bağlı olarak 37°C’de 1–4 saat tekrar inkubasyona bırakıldı. Ardından her bir plakanın görüntüsü alınarak PON1’in farklı konsantrasyonlarının her bir bakteri üremesine *in vitro* etkisi kalitatif olarak belirlendi. Aynı zamanda tetrazolyum viyoletole eklenmiş plakalardaki PON1 konsantrasyonu artırılıp 600 nm’de OD değerlerine bakılarak enzimin etkisi kantitatif olarak da gösterildi.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bakteri türü	A	-	+	1mg	500µg	250µg	100µg	10µg	1µg	0.1µg			
	B												
	C												
Bakteri türü	D												
	E												
	F												
	G												
	H												

Şekil 2.3. Farklı konsantrasyonlarda PON1 enzimi içeren plaka düzeneği

PON1 enziminin bakteri üremesine etkisinin desteklenmesi amacı ile söz konusu bakteriler plakalardaki belirli kuyucuklardan ve kontrol gruplarından alınarak nutrient agarlı besiyeri içeren petrilere ekildi. 37°C’de 24 saatlik inkubasyondan sonra sonuçlar görüntülendi.

### 2.2.8. PON1 enziminin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm oluşumuna etkisi

Her bir kuyucukta toplam hacim 220 µl olacak şekilde 200 µl TSB besiyeri, 10 µl gram negatif bakteri örneği *Pseudomonas aeruginosa* ve son olarak da farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 10 µl PON1 enzimi ilave edildi. Kontrol grubu olarak kuyucuklara 200 µl TSB besiyeri, 10 µl mikroorganizma ve enzim yerine 10 µl distile su kullanıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0,001	0,001	0,001	0,01	0,01	0,01	0,1	0,1	0,1
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Şekil 2.4.** Biyofilm oluşumu için hazırlanan farklı konsantrasyonlarda PON1 (µg/ml) enzimi içeren plaka düzeneği

Enzimin ortama ilavesi biyofilm oluşumunun farklı evrelerini içermesi açısından farklı zaman aralıklarında yapıldı. Belli sürelerle 37°C’de inkubasyonun ardından örnek bulunduran her bir kuyucuk sırasıyla distile su ile yıkandı. % 0.5 kristal viyole ile boyandı ve etil alkol ile yıkanarak 560 nm’de OD değerleri tespit edildi [161].

Söz konusu ana metod kullanılarak aşağıdaki koşullarda PON1’in etkisi incelendi:

### **2.2.8.1. PON1 enziminin *P. aeruginosa* olgun biyofilmlerine etkisi**

TSB besiyeri ve bakteri ekilerek 24 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Bakterinin besiyerinde log faza ulaşması ile birlikte farklı konsantrasyonlarda PON1 her bir kuyucuğa ilave edildi. 48 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası işlemlerin ardından 560 nm'de OD değerleri tespit edildi. Bu işlemde olgun biyofilmlerde PON1'in etkisinin gözlenmesi amaçlandı.

### **2.2.8.2. PON1 enziminin gelişmekte olan *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerine sürekli ilavesinin etkisi**

TSB besiyeri ve bakteri ekiminin ardından inkubasyona bırakılan plakaya 12 saat sonra farklı konsantrasyonlarda PON1 eklendi ve tekrar inkubasyona bırakıldı. 24. ve 36. saatlerde de PON1 ortama eklenerek toplam 48 saat 37°C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası işlemlerin ardından 560 nm'de OD değerleri tespit edildi.

### **2.2.8.3. PON1 enziminin *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerine zamanın etkisi**

TSB besiyeri, bakteri ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış PON1 enzim örneği içeren kuyucuklar 12, 24, 36, 48. saatlerde ayrı ayrı olmak üzere 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Ardından zamana karşı bakteri konsantrasyonuna PON1'in etkisi 560 nm'de OD değerlerine bakılarak tespit edildi.

### **3.BULGULAR**

#### **3.1. PON1 Enziminin Saflaştırılması**

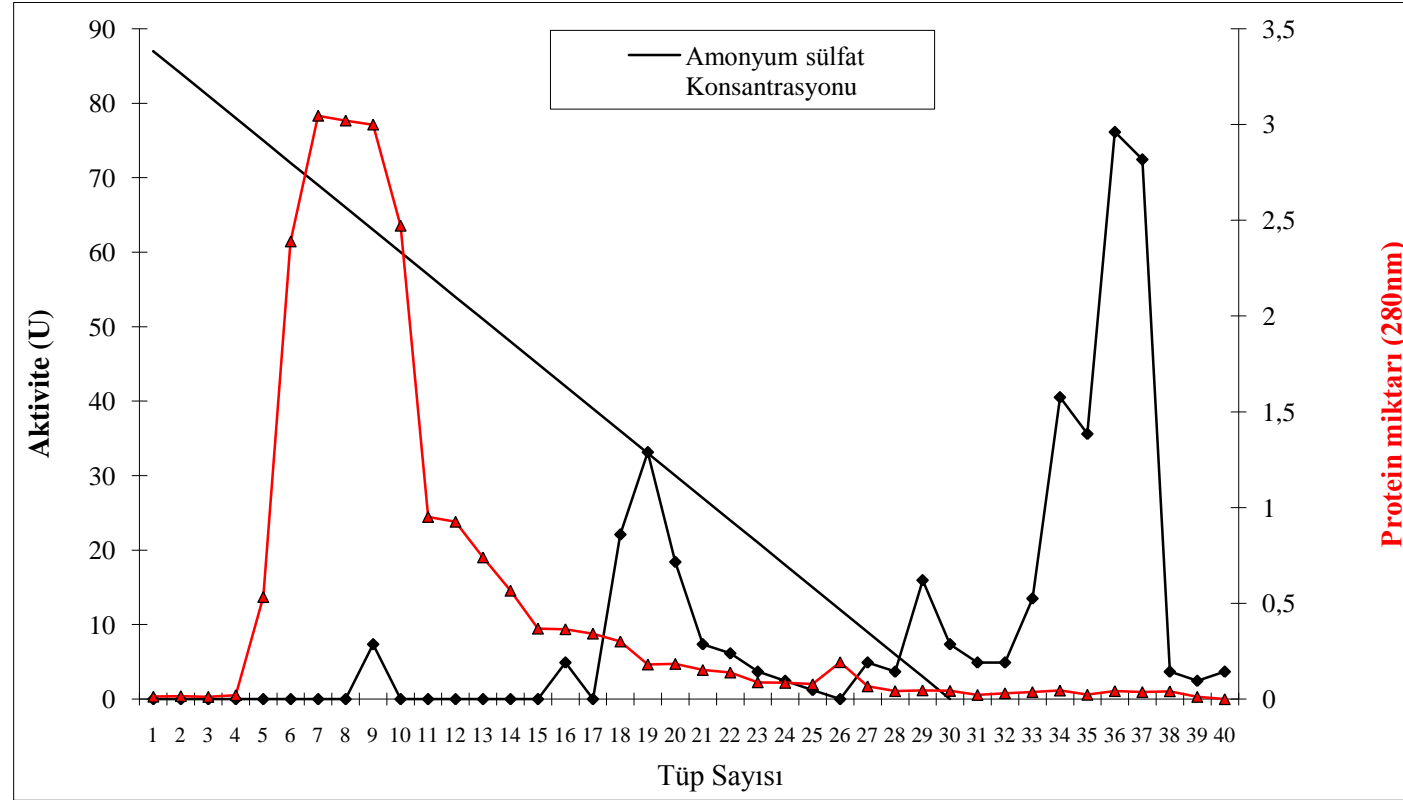
##### **3.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Bölüm 2.2.4.1’de belirtildiği gibi serum paraoksonaz enzimi için daha önce belirlenen % 60-80 amonyum sülfat çöktürme aralığı kullanılmıştır. Çöktürme sonunda 0.1 M Tris-Baz (pH 8.0) tamponu kullanılarak çözölen çökeleğin toplam aktivitesi 1504.58 U/ml ve toplam protein miktarı 19215 mg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Çökeleğin çözölmesiyle elde edilen numune hidrofobik kolona tatbik edilmiştir.

##### **3.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması**

Bölüm 2.2.4.2’de belirtildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen numune diyaliz edilmeden daha önce sentezlediğimiz hidrofobik yapıdaki sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin jelini içeren kolona uygulanmıştır. Kolondan alınan numunelerin 0.1 M Tris-HCl pH:8.0 tamponu kör olarak kullanılarak, 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 412 nm’de aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 3.1’de göröldüğü gibi elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiğinden yüksek aktivite gösteren 18, 19 ve 20 numaralı tüpler birleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen ve birleştirilen elüatlar için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilmiştir ( Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 saflaştırma tablosunda gösterildiği gibi söz konusu enzim %11.89 verimle 324.5 kat saflaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm)

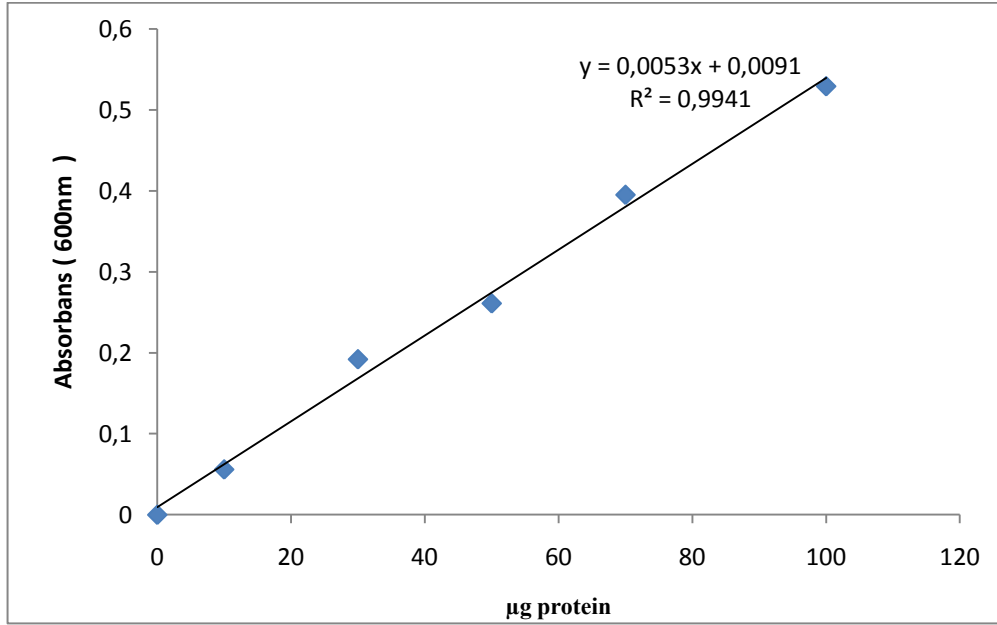
**Çizelge 3.1.** Saflaştırma tablosu

	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Aktivite (U/ml)</b>	<b>Toplam Aktivite (U/ml)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam Protein (mg/ml)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştır ma Derecesi</b>
<b>Serum</b>	50	66.316	3315.8	1482.88	74147	0.0448	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	18	83.588	1504.58	1067.5	19215	0.0783	45.37	1.74
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	3	131.404	394.21	5.17	15.51	25.41	11.89	324.52



### 3.2. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

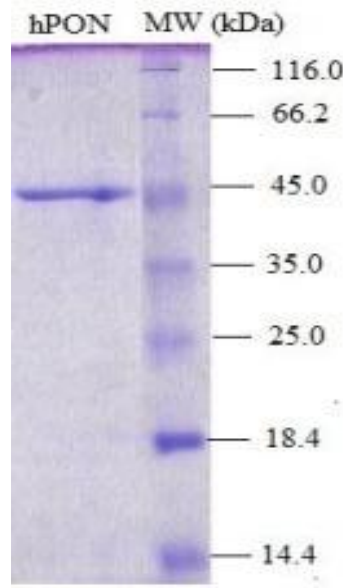
Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Lowry metodu kantitatif diğeri protein tayinlerinden oldukça hassas olup hassasiyet aralığı 5-100 µg/ml'dir. Söz konusu yöntemle protein miktar tayininde sığır serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 3.2'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi regresyon katsayısı 0.9941 olarak belirlenmiştir. Söz konusu grafiğın doğru denkleminde ilgili absorbansa karşılık gelen mg protein miktarı tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

### 3.3. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezine

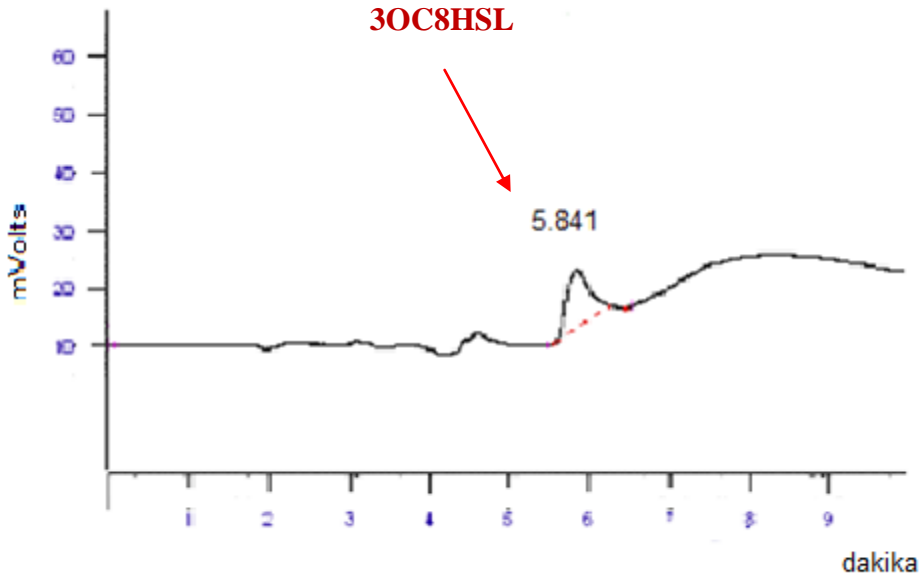
Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.4.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine. Molekül ağırlık standartları; ( $\beta$ -galaktosidaz (118.0kDa), sığır serum albumin (79.0kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa),  $\beta$ -laktoglobulin (25.0kDa) ve Lizozim (19.5 kDa)

### 3.4. HPLC Analizleri ile Sinyal Molekülleri Yıkımı

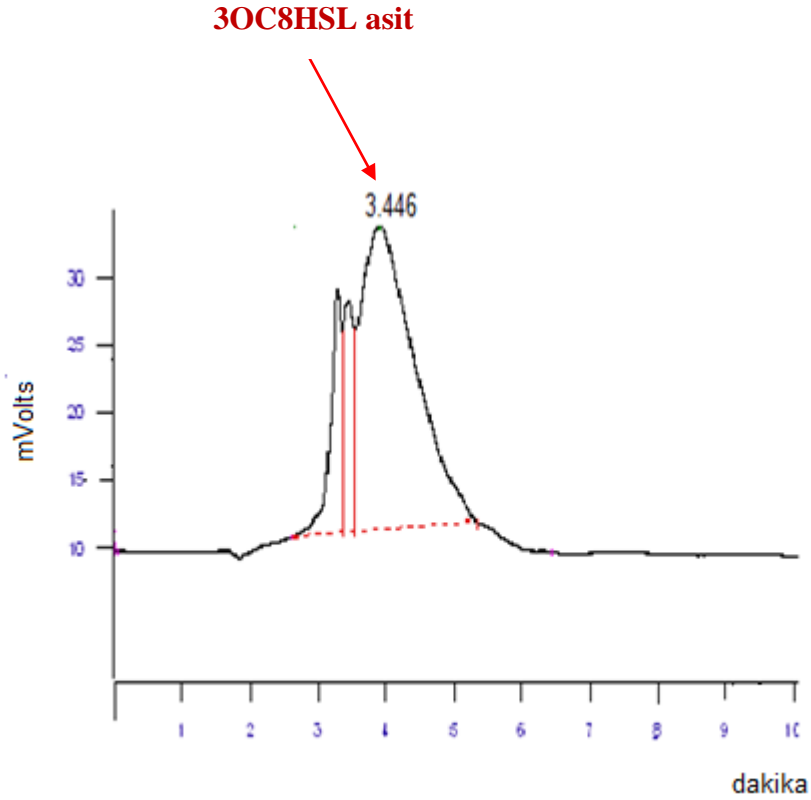
Ticari olarak satın alınan 3-oxo-C8HSL bilinen bazı gram negatif bakteriler tarafından sinyal molekülü olarak kullanılmaktadır. 100  $\mu$ M 3-oxo-C8HSL sinyal molekülünün alıkonma süresinin tayini amacıyla bölüm 2.2.5’de belirtilen yöntemle göre HPLC kolonuna 20  $\mu$ l örnek enjekte edilmiştir. Şekil 3.4’de de görüldüğü gibi 3-oxo-C8HSL sinyal molekülünün söz konusu şartlar altında alıkonma süresi 5.82’inci dakikadır. İlk 10 dakikadan sonra herhangi bir pik gözlenmemiştir. Kromatogramda da görüldüğü gibi ticari olarak satın alınan 3OC8HSL’nun tek pik vermesi molekülün saf olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.4. 3OC8HSL sinyal molekülünün standardı için HPLC kromatogramı

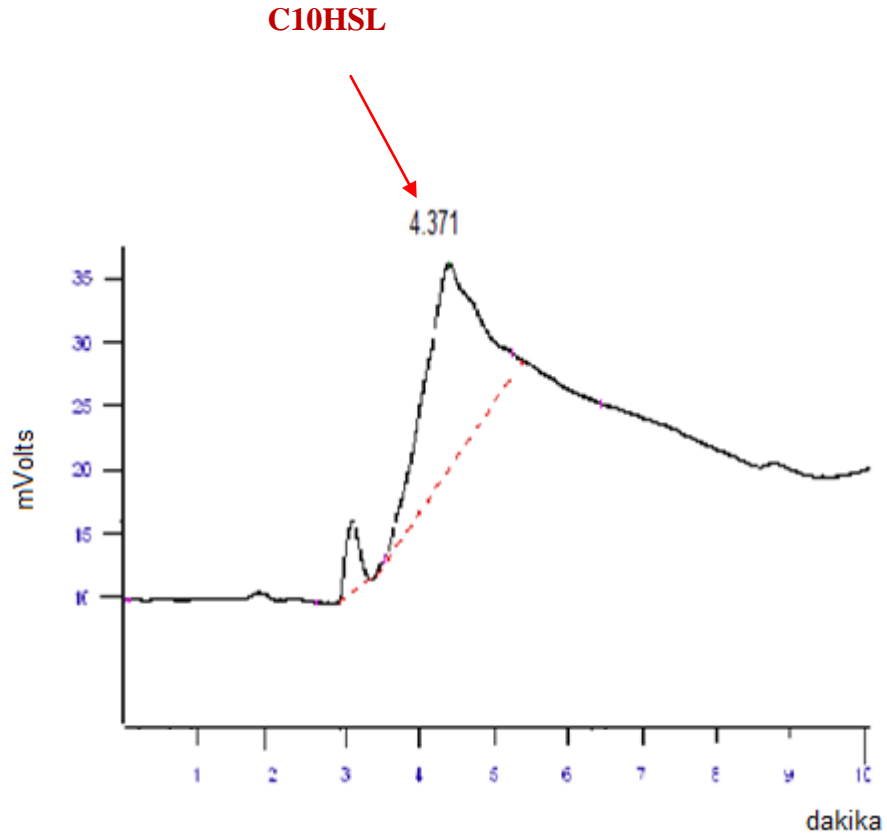
Saflaştırılan PON1 enziminin 3OC8HSL sinyal molekülü üzerindeki etkisi HPLC analizi ile belirlenmiştir. Paraoksonaz enziminin laktonaz aktivitesi ile 3OC8HSL molekölünü 3OC8HSL asit ürününe etkili bir şekilde hidrolizlediği tespit edilmiştir. Bölüm 2.2.5’de belirtildiği gibi konsantrasyon 100 µM olacak şekilde saf PON1 enzimi ve 3OC8HSL sinyal molekülü 9:1 oranında karıştırılmıştır. Saflaştırılan PON1 enzime eklenmiş 3OC8HSL sinyal molekölünün HPLC kromatogram analizi şekil 3.5’de gösterilmiştir.

Kromatogramda görüldüğü gibi 3OC8HSL asit ürününün alınkonma süresi 3.4’üncü dakikadır. Söz konusu pikin dışında herhangi bir pikin bulunmaması lakton yapısındaki sinyal molekölünün saflaştırılan PON1 enzimi ile hidrolizlendiğini göstermektedir.



**Şekil 3.5.** 3OC8HSL sinyal molekölü için ürün piklerini gösteren HPLC kromatogramı

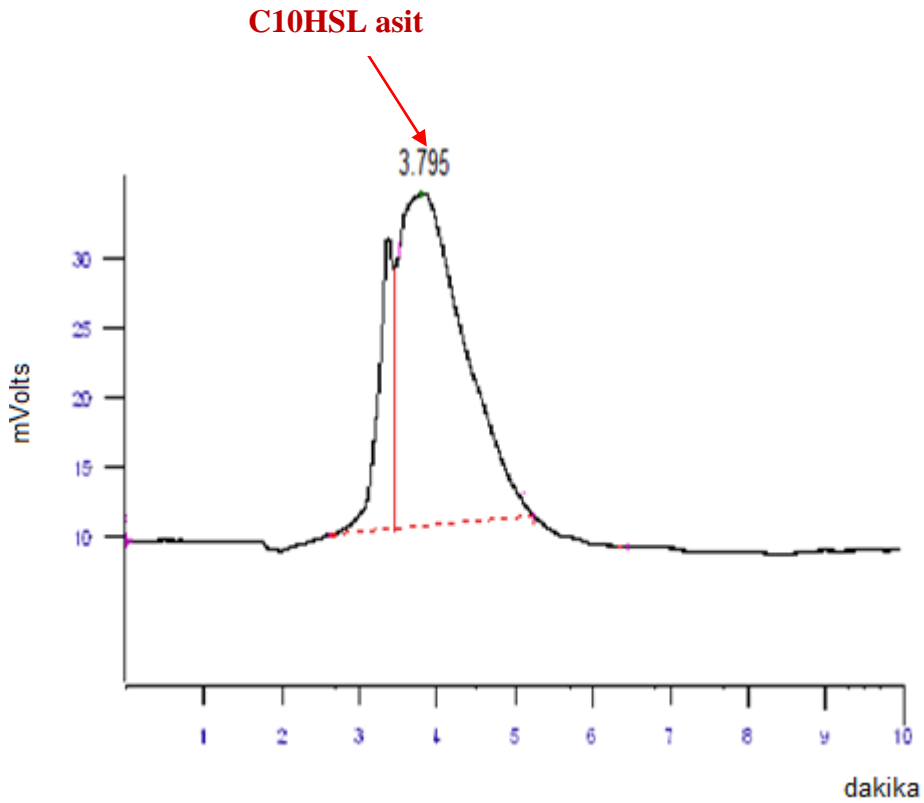
Ticari olarak satın alınan C10HSL bilinen bazı gram negatif bakteriler tarafından sinyal molekölü olarak kullanılmaktadır. 10 µM C10HSL sinyal molekölünün alıkonma süresinin tayini amacıyla bölüm 2.2.5’de belirtilen prosedüre göre HPLC kolonuna 20 µl örnek enjekte edilmiştir. Şekil 3.6’da görüldüğü gibi C10HSL sinyal molekölünün söz konusu şartlar altında alıkonma süresi 4.371’inci dakikadır. İlk 10 dakikadan sonra herhangi bir pik gözlenmemiştir.



Şekil 3.6. C10HSL sinyal molekölünün standartı için HPLC kromatogramı

Safılaştırılan PON1 enziminin C10HSL sinyal molekölü üzerindeki etkisi HPLC analizi ile belirlenmiştir. Paraoksonaz enziminin laktonaz aktivitesi ile C10HSL molekölünü C10HSL asit ürününe etkili bir şekilde hidrolizlediği tespit edilmiştir. Bölüm 2.2.5’de belirtildiği gibi konsantrasyon 100 µM olacak şekilde saf PON1 enzimi ve C10HSL sinyal molekölü 9:1 oranında karıştırılmıştır. Safılaştırılan PON1 enzime eklenmiş C10HSL sinyal molekölünün HPLC kromatogram analizi şekil 3.7’de gösterilmiştir.

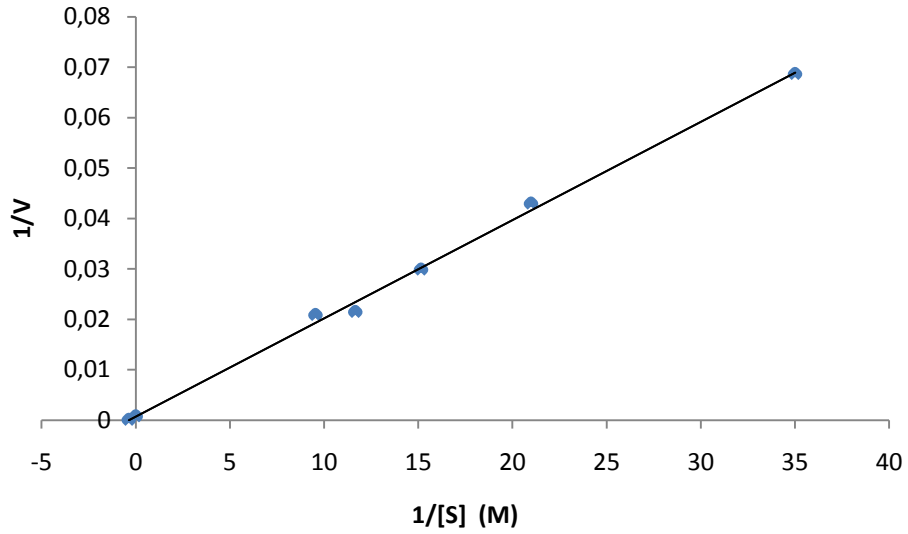
Kromatogramda görüldüğü gibi 3OC8HSL asit ürünü alınıkonma süresi 3,7’inci dakikadır. Söz konusu pikin dişında herhangi bir pikin bulunmaması lakton yapısındaki sinyal molekölünün safılaştırılan PON1 enzimi ile hidrolizlendiğini göstermektedir



**şekil 3.7.** C10HSL sinyal molekölü için ürün piklerini gösteren HPLC kromatogramı

### 3.5. Optimum Şartlarda 3OC8HSL ve C10HSL Sinyal Moleküllerinin $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

HPLC analizleri ile 3OC8HSL ve C10HSL sinyal moleküllerinin saflaştırılan PON1 enzimi ile hidrolizlendikleri tespit edilmiştir. Bu amaçla hidrolizlenmiş söz konusu sinyal moleküllerinin maximum absorbans verdiği dalga boyunda laktonaz aktiviteleri belirlenmiştir. Substrat olarak kullanılan 3OC8HSL ve C10HSL moleküllerinin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edilmiştir.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda substrat olarak kullanılan 3OC8HSL ve C10HSL sinyal moleküllerinin değişen konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Çizelge 3.2 ve 3.3’de belirtilen hacimlerde tampon, substrat ve enzim karışımından elde edilen aktivite hızları gösterilmiştir. Her ölçüm üç kez tekrarlanarak bulunan değerlerin ortalaması alınmıştır.



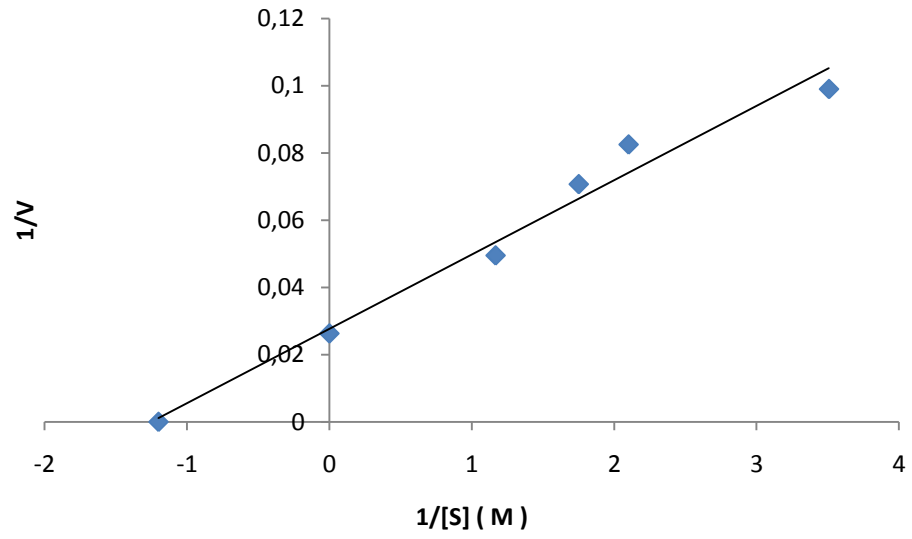
**Şekil 3.8.** Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enziminin 3OC8HSL sinyal molekülü substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 3.2.** İnsan serum paraoksonaz enziminin 3OC8HSL substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$ .

<b>100mM HEPES tamponu (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Enzim Çözeltilisinin Hacmi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Substrat çözeltilisinin hacmi (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Küvetteki toplam hacim (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)</b>	<b><math>\Delta</math>OD (230 nm)</b>	<b>Aktivite (U/ml dak)</b>	<b><math>1/V \times 10^{-2}</math></b>	<b><math>1/[S]</math></b>
720		30		28.57	0.01	14.583	6.82	35.01
700		50		47.62	0.016	23.33	4.29	20.99
680	300	70	1050	66.6	0.023	33.542	2.98	15.15
660		90		85.72	0.032	46.66	2.14	11.66
640		110		104.72	0.033	48.13	2.08	9.545



Her bir sinyal molekülü için belirlenen dalga boyunda ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak gösterilmiştir.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.8–3.9). Grafikten yararlanarak 3OC8HSL için  $K_M$  değeri 2.714 mM ve  $V_{max}$  değeri 1428.57 U/ml dakika, C10HSL için  $K_M$  değeri 0.8 mM ve  $V_{max}$  değeri 45.24 U/ml dakika olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 3.9.** Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enziminin C10HSL sinyal molekülü substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 3.3.** İnsan serum paraoksonaz enziminin C10HSL substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$ .

5mM Tris tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki toplam hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)	$\Delta$ OD (205 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-2}$	$1/[S]$
820		30		285	0.005	10.096	9.90	0.0035
800		50		476	0.006	12.115	8.25	0.0021
780	200	60	1050	571	0.007	14.135	7.075	0.00175
760		70		666	0.01	20.192	4.95	0.00150
740		90		857	0.01	20.192	4.95	0.00116

### **3.6. PON1 Enziminin *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* Bakteri Üremelerine Etkisi**

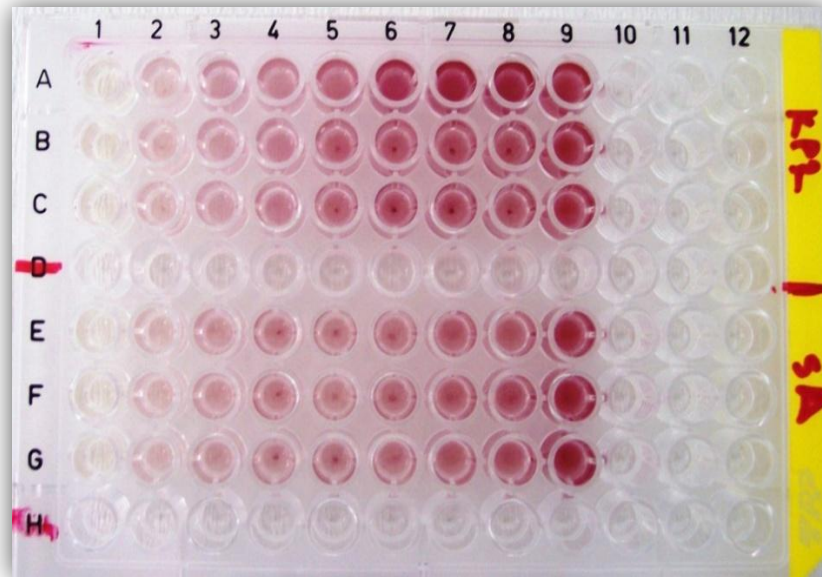
Bölüm 2.2.7.2’ de belirtildiği gibi PON1 enziminin *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremeleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Şekil 3.10’de görüldüğü gibi 96 mikro çukurlu plakanın kuyucuklarına ekilen her bir bakteri için PON1 enziminin farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Enzimin eklenmesinden 24 saat sonra, bakteri yoğunluğunu göstermek amacıyla her bir kuyucuk tetrazolyum viyoletolektrolizma indikatörü ile boyanmıştır.

Şekil 3.11’da görüldüğü gibi artan PON1 konsantrasyonuna bağlı olarak kuyucuklardaki renk şiddetinde azalma gözlenmiştir. Kuyucuklardaki bakteri yoğunluğunun da renk şiddetine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. PON1 enzimi laktonaz aktivitesi ile kullanılan bakterilerin sinyal moleküllerine etki ederek bakteri yoğunluklarında azalmaya neden olmuştur.

Şekil 3.10 ve 3.12’deki gibi hazırlanan plakalardaki PON1 enzimi içermeyen pozitif kontrol grubunda normal bir bakteri büyümesi gözlenmiştir. Negatif kontrol grubunda da bakteri üremesinin olmaması herhangi bir kontaminasyonun olmadığını göstermektedir.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A	Negatif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0,1µg PON1	Pozitif grup
	B	Negatif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0,1µg PON1	Pozitif grup
	C	Negatif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0,1µg PON1	Pozitif grup
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	E	Negatif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0,1µg PON1	Pozitif grup
	F	Negatif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0,1µg PON1	Pozitif grup
	G	Negatif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0,1µg PON1	Pozitif grup
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-

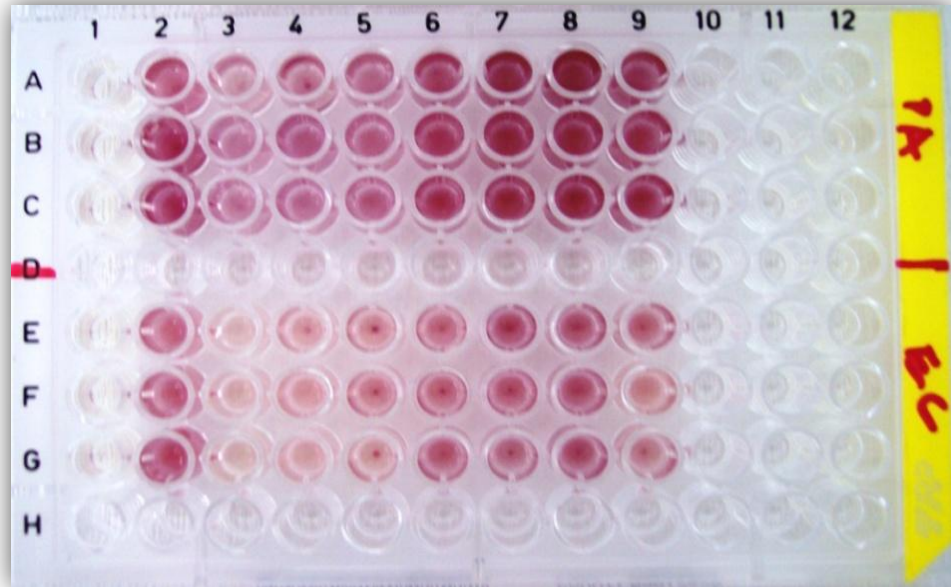
Şekil 3.10. *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakterileri için hazırlanan plaka düzeneği



Şekil 3.11. *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakterileri üzerine PON1'in konsantrasyona bağlı etkisi

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A	Negatif grup	Pozitif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0.1µg PON1
	B	Negatif grup	Pozitif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0.1µg PON1
	C	Negatif grup	Pozitif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0.1µg PON1
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	E	Negatif grup	Pozitif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0.1µg PON1
	F	Negatif grup	Pozitif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0.1µg PON1
	G	Negatif grup	Pozitif grup	1mg PON1	500µg PON1	250µg PON1	100µg PON1	10µg PON1	1µg PON1	0.1µg PON1
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Şekil 3.12. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterileri için hazırlanan plaka düzeneği

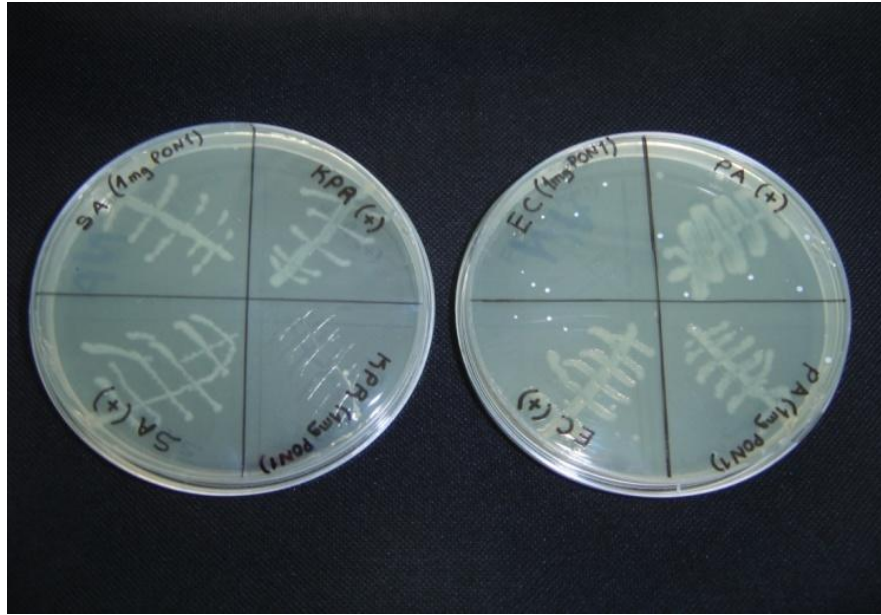


Şekil 3.13. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterileri üzerine PON1'in konsantrasyona bağlı etkisi

Şekil 3.11 ve Şekil 3.13'deki plakaların pozitif kontrol grupları ve 1 mg PON1 içeren kuyucuklarından alınan örnekler nutrient agarlı besiyeri içeren petrilere ekilmiştir. PON1 enzimi içeren bakteri kuyucuklarından alınan örneklerin agarlı besiyerinde üremesinin devam etmesi PON1' in söz konusu bakterileri öldürmediğini göstermektedir.

Şekil 3.14'de görüldüğü gibi *K. pneumoniae* (KP) ve *E. coli* (EC)' nin PON1 enzimi içeren örneklerinde minimum düzeyde bir üreme gözlenmektedir. *P. aeruginosa* (PA) ve *S.aureus* (SA)' nın PON1 enzimi içeren örneklerin de ise pozitif kontrol grubuna göre daha az üreme tespit edilmiştir.

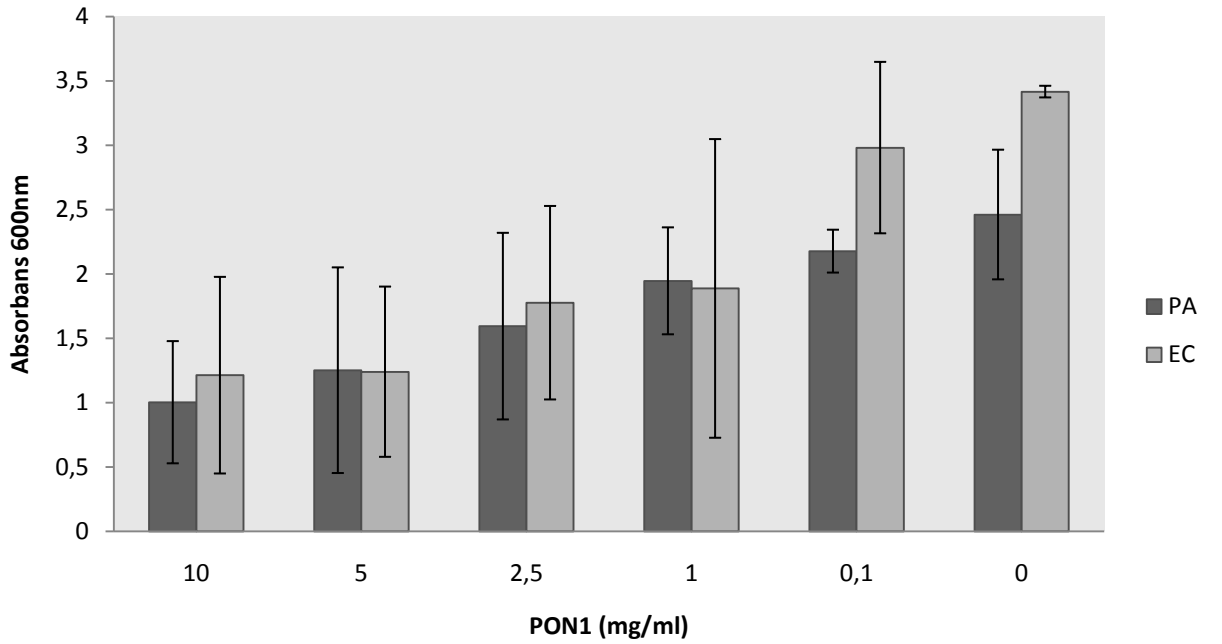
PON1 enziminin söz konusu bakteri türlerinin agarlı besiyerinde de üremesini azalttığı gösterilmiştir. Bu etkiyi laktonaz aktivitesi ile bakterilerin sinyal moleküllerini hidrolizleyerek gösterdiği düşünülmektedir.



Şekil 3.14. PON1 enziminin bakteri üremesi üzerine etkisinin petri görüntüleri

### 3.4. PON1 Enziminin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* Üzerine Etkisinin Kantitatif Belirlenmesi

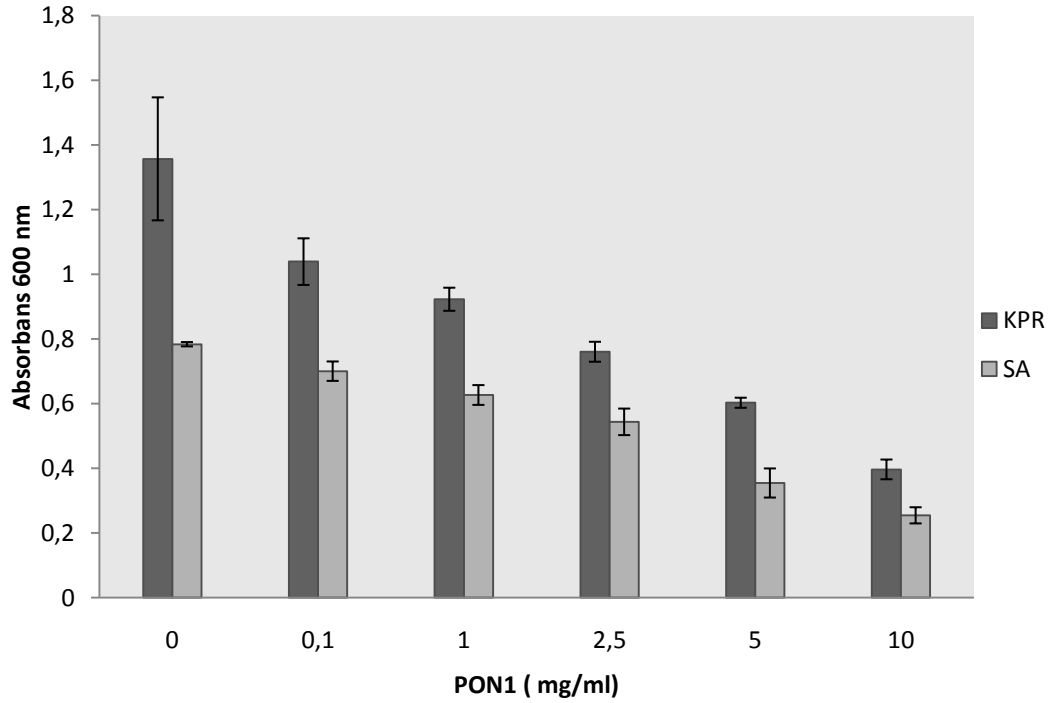
PON1 enziminin *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremesi üzerine etkisinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla Şekil 3.9 ve 3.10'daki plakalardaki PON1 konsantrasyonunu artırarak ( 10 mg, 5 mg, 2.5 mg, 1 mg ve 0.1 mg ) 600 nm'de absorban değerleri tespit edilmiştir. Çizelge 3.4 ve 3.5'de üç tekrarlı olarak belirlenen değerlerin ortalama OD ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Şekil 3.13 ve 3.14'de görüldüğü gibi artan PON1 konsantrasyonu bağlı olarak söz konusu bakteri yoğunluğunun azaldığı kantitatif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.15. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakteri üremesine PON1'in kantitatif etkisi

**Çizelge 3.4.** *P. aeruginosa* (PA) ve *E. coli* (EC)' nin PON1 varlığında 600 nm'deki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA) ve <i>Escherichia coli</i> (EC)										
PON1 (mg/ml)	OD 600 DEĞERLERİ						ORTALAMA		STANDART SAPMA	
	PA			EC			PA	EC	PA	EC
<b>0(kontrol)</b>	2.281	2.071	3.029	3.379	3.401	3.466	2.46	3.415	0.50	0.04
<b>10</b>	1.144	1.39	0.473	1.594	1.71	0.333	1.002	1.212	0.47	0.76
<b>5</b>	2.105	1.126	0.522	0.859	2.003	0.856	1.251	1.239	0.79	0.66
<b>2.5</b>	2.414	1.041	1.325	1.353	2.643	1.33	1.59	1.775	0.72	0.75
<b>1</b>	2.376	1.547	1.913	1.006	3.201	1.452	1.945	1.886	0.41	1.16
<b>0.1</b>	2.352	2.115	2.021	2.213	3.405	3.323	2.176	2.980	0.16	0.66



**Şekil 3.16.** *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremesine PON1'in kantitatif etkisi



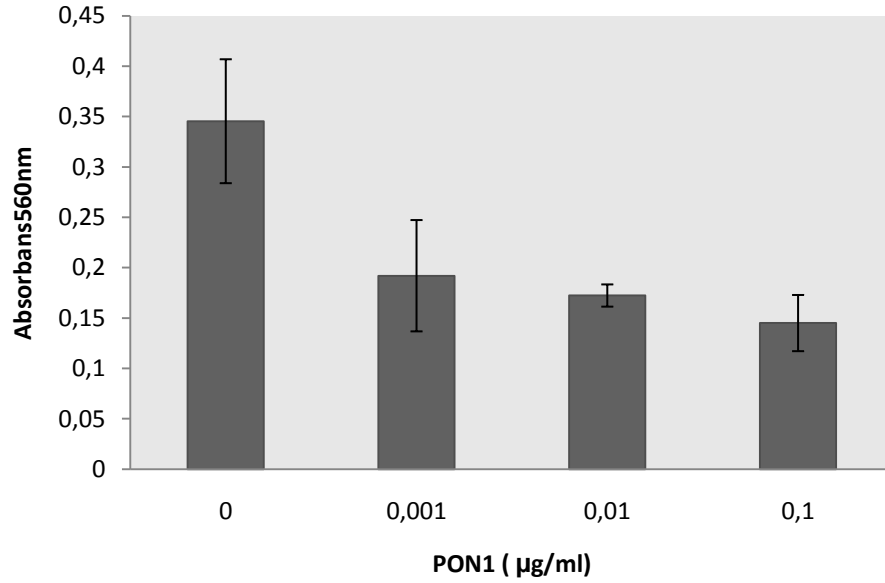
**Çizelge 3.5.** *K. pneumoniae* (KP) ve *S. aureus* (SA)'nın PON1 varlığında 600 nm'deki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP) ve <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)									
PON1 (mg/ml)	OD 600 DEĞERLERİ						ORTALAMA		STANDART SAPMA		
	KP			SA			KP	SA	KP	SA	
<b>0(kontrol)</b>	1.17	1.35	1.55	0.791	0.782	0.778	1.35	0.78	0.19	0.006	
<b>10</b>	0.39	0.37	0.43	0.28	0.254	0.23	0.39	0.25	0.03	0.025	
<b>5</b>	0.619	0.588	0.601	0.39	0.37	0.304	0.602	0.35	0.015	0.045	
<b>2.5</b>	0.795	0.75	0.736	0.588	0.507	0.536	0.76	0.54	0.03	0.041	
<b>1</b>	0.956	0.927	0.885	0.638	0.592	0.65	0.92	0.62	0.035	0.03	
<b>0.1</b>	1.37	1.112	0.968	0.67	0.701	0.73	1.03	0.70	0.072	0.03	

### 3.8. *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Oluşum Evrelerinde PON1 Enziminin Etkileri

#### 3.8.1. Olgun Biyofilmlerde PON1 Enziminin Etkisi

*P. aeruginosa* biyofilm davranışına PON1 enzim etkisinin incelenmesi amacıyla bölüm 2.2.8.1’de belirtildiği gibi 24 saat inkubasyona bırakılmış *P. aeruginosa* bakterisi üzerine saflaştırılmış PON1 enzimi eklenmiştir. Saf PON1 enziminin gelişimini tamamlamış biyofilmler üzerinde biyofilm kütlelerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu azalmanın artan PON1 konsantrasyonuna bağlı olduğu Şekil 3.15’de gösterilmiştir.



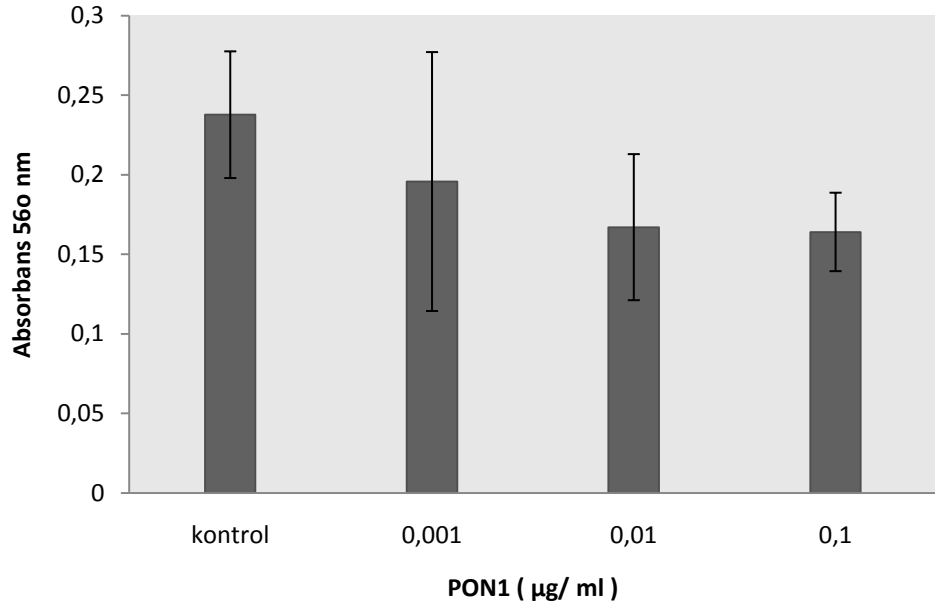
Şekil 3.17. Olgun biyofilmlerde PON1 konsantrasyonuna bağlı etki

**Çizelge 3.6.** *P. aeruginosa*'nın PON1 içeren olgun biyofilmlerinde OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

PON1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD 560 Değerleri			Ortalama	Standart Sapma
<b>0 ( kontrol grubu )</b>	0.329	0.372	0.275	0.34	0.06
<b>0.001</b>	0.174	0.254	0.148	0.19	0.05
<b>0.01</b>	0.165	0.185	0.167	0.17	0.01
<b>0.1</b>	0.168	0.153	0.114	0.14	0.02

### **3.8.2. Biyofilm Gelişimi Boyunca PON1 Enziminin Sürekli İlavesinin Etkisi**

*P. aeruginosa* biyofilm gelişimi boyunca PON1 enzim etkisinin incelenmesi amacıyla bölüm 2.2.8.2'de belirtildiği gibi her 12 saatte bir bakteri ortamına farklı konsantrasyonlarda PON1 enzimi ilave edilmiştir. Saf PON1 enziminin biyofilm gelişimi boyunca artan PON1 konsantrasyonuna bağlı olarak biyofilm oluşumunu azalttığı Şekil 3.16'da gösterilmiştir. Söz konusu azalmayla beraber belirli zaman aralıklarında ortama ilave edilen PON1' in biyofilm gelişimi boyunca herhangi bir bozulmaya uğramadığı da tespit edilmiştir.



Şekil 3.18. Gelişmekte olan biyofimlerde PON1 enziminin etkisi

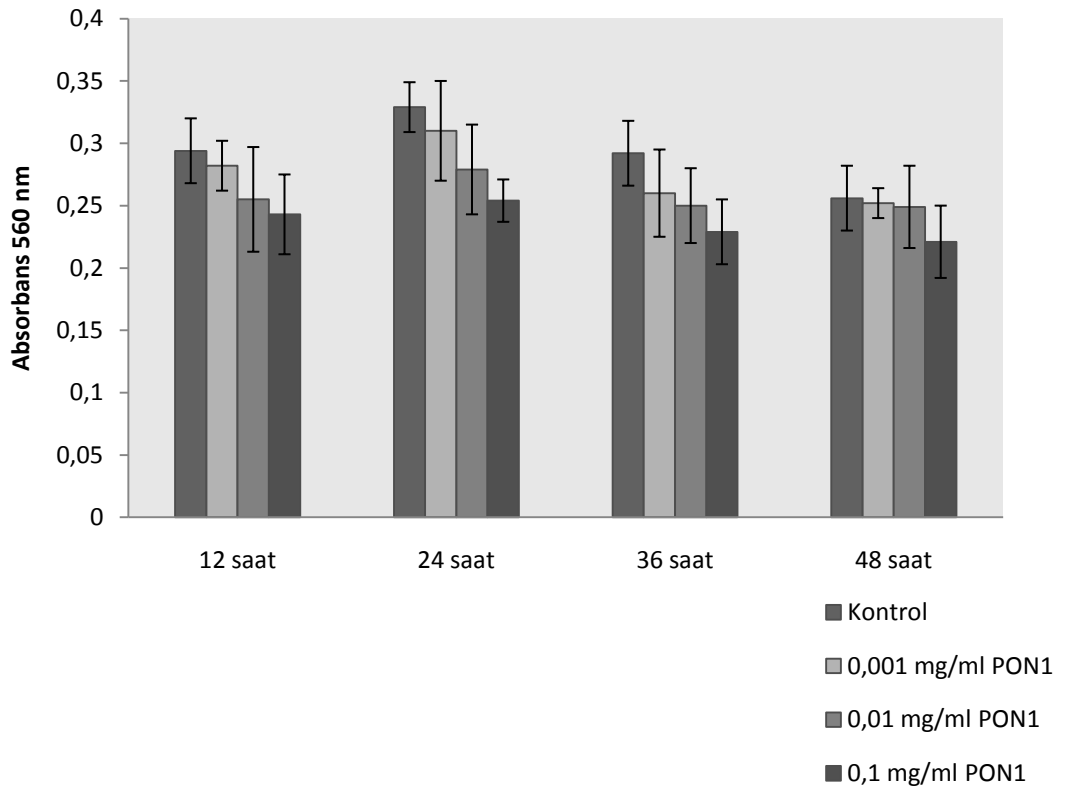
Çizelge 3.7. *P. aeruginosa* biyofilm gelişimi boyunca PON1 ilavesinin OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

PON1 (µg/ml)	OD 560 Değerleri			Ortalama	Standart Sapma
0 (kontrol grubu)	0.226	0.205	0.282	0,23	0.039
0.001	0.281	0.187	0.119	0.19	0.081
0.01	0.16	0.216	0.125	0.16	0.045
0.1	0.187	0.167	0.138	0.16	0.024

### 3.8.3. Gelişmekte Olan Biyofilmlerde PON1 Enziminin Zamana Bağlı Etkisi

PON1 enziminin gelişen biyofilmler üzerinde zamana bağlı etkisinin gösterilmesi amacıyla bölüm 2.2.8.3’de belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda PON1 içeren her bir plaka farklı inkubasyon sürelerine tabi tutulmuştur.

İnkubasyon süreleri artıkça PON1 enziminin biyofilmler üzerindeki etkisinin azaldığı şekil 3.17, 3.18 ve 3.19’da gösterilmiştir. Ayrıca uzun süreli inkubasyonların PON1 enziminin bozulmasına sebep olmakla beraber enzimin biyofilmler üzerindeki etkisini de azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.19. Gelişmekte olan biyofilmlerde PON1 enziminin zamana bağlı etkisi

**Çizelge 3.8.** PON1 varlığında *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 12 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

PON1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD 560 Değerleri			Ortalama	Standart Sapma
<b>0 ( kontrol grubu )</b>	0.267	0.298	0.319	0.294	0.026
<b>0.001</b>	0.3	0.296	0.252	0.282	0.026
<b>0.01</b>	0.275	0.234	0.258	0.255	0.020
<b>0.1</b>	0.248	0.215	0.268	0.243	0.026

**Çizelge 3.9.** PON1 varlığında *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 24 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

PON1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD 560 Değerleri			Ortalama	Standart Sapma
<b>0 ( kontrol grubu )</b>	0.345	0.337	0.307	0.329	0.02
<b>0.001</b>	0.314	0.326	0.251	0.297	0.04
<b>0.01</b>	0.265	0.32	0.254	0.278	0.035
<b>0.1</b>	0.214	0.231	0.206	0.217	0.012

**Çizelge 3.10.** PON1 varlığında *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 36 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

PON1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD 560 Değerleri			Ortalama	Standart Sapma
<b>0 ( kontrol grubu )</b>	0.341	0.273	0.264	0.292	0.042
<b>0.001</b>	0.273	0.219	0.289	0.26	0.036
<b>0.01</b>	0.278	0.256	0.217	0.25	0.03
<b>0.1</b>	0.26	0.235	0.194	0.229	0.033

**Çizelge 3.11.** PON1 varlığında *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 48 saat sonraki OD değerleri, ortalama ve standart sapmaları

PON1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD 560 Değerleri			Ortalama	Standart Sapma
<b>0 ( kontrol grubu )</b>	0.282	0.219	0.267	0.25	0.032
<b>0.001</b>	0.237	0.217	0.202	0.21	0.017
<b>0.01</b>	0.275	0.222	0.251	0.24	0.026
<b>0.1</b>	0.226	0.249	0.19	0.22	0.029

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde çoklu antibiyotik direnci gösteren mikroorganizma infeksiyonları klinikte ciddi tedavi sorunu yaratmaktadır. Buna karşın özellikle son yıllarda yeni antibiyotik geliştirilmesi ciddi biçimde azalmıştır [164]. Halen kullanılan antibiyotiklere karşı yaygın direnç gelişimi ve çoğu kere gelişen direncin farklı sınıftan antibiyotiklere karşı da direnç gelişimini kolaylaştırması, yeni antibakteriyel hedeflerin bulunması ve bu hedeflere yönelik ilaç ve stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır [165, 166]. Günümüzde yeni antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar arasında, bir bakteri topluluğu içindeki tek tek hücrelerin birbirleri arasındaki iletişimin engellenmesi konusundaki çalışmalar, henüz pratiğe yansımamış olsa da, gelecek için umut vaatmektedir. Kısaca “quorum sensing” (QS) , bakteri hücresinin otoindükleyici olarak işlev gören bazı sinyal molekülleri sentezleyerek çevresinde bulunan aynı türden diğer bakterilerin sayısını/yoğunluğunu izlemesidir. Belli bir ortamdaki otoindükleyici yoğunluğu, o ortamda bulunan bakteri sayısı ile doğru orantılıdır. Bu nedenle bir bakterinin ortamdaki otoindükleyici miktarını “hissetmesi” ortamdaki diğer bakterilerin sayısı hakkında fikir sahibi olmasını sağlamaktadır [167]. Özellikle lakton yapısında olan bu moleküllere karşı bakterinin gen ekspresyonunu değiştirerek yanıt vermesi, bir bakteri topluluğu içinde her bir hücrenin bir diğeri ile koordine bir biçimde davranması sonucunu doğurmaktadır. İnsan patojeni olan 20’den fazla bakterinin farklı moleküller aracılığı ile bu özelliği sergilediği gösterilmiştir [168]. QS sinyalinin yayılmasını önlemenin en bilinen yolu iletişim moleküllerinin yıkıma uğratılmasıdır. Lakton yapısındaki bu molekülleri yıkan enzimlerin klinik önem taşıyabilecekleri açıktır. Bu enzimlere “quorum sensing”i bozdukları için “quorum-quenching” enzimleri denilmektedir [153]. Yapılan bir çalışmada ilk olarak insan epitelyum hücrelerinde bu sinyal moleküllerin inaktivasyonunu sağlayan aktivite tespit edilmiştir [145]. Daha sonra tavşan, fare, at, koyun ve sığır gibi pek çok memelide benzer aktivite tespit edilmiştir [163]. Bu sinyal moleküllerinin inaktivasyonuna neden olan enzim; karakteristik olarak kalsiyuma bağımlı ve laktonaz aktivitesi gösteren paraoksonaz (PON) enzimlerini hatırlatmaktadır [161, 163].



Bu çalışmada laktonaz olarak bilinen insan serumundan saflaştırılmış paraoksonaz 1 enziminin üç farklı açıdan QS sinyal molekülleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak saflaştırılmış PON1 enziminin N-hexa-L-homoserin lakton, ve N-3-oxooktonoyil-L-homoserin lakton sinyal moleküllerini hidrolizlediği HPLC analizleri ile gösterilmiştir. İkinci aşamada PON1 enziminin besiyeri ortamında gelişmekte olan *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakterilerinin üremeleri üzerine etkisi incelenmiştir. Son olarak PON1 enziminin söz konusu AHL yapıdaki sinyal molekülleri aracılığıyla meydana gelen türe özgü davranışlardan *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Araştırmamızda insan serum paraoksonaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak 324.5 kat saflaştırılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi olarak laboratuvarımızda daha önce sentezlenen sepharose 4B- L-tirozin-1-naftilamin jeli kullanılmıştır. Kullanılan saflaştırma yöntemi iki aşamalı olup literatürde bilinen pek çok yöntemle göre daha kısa sürede gerçekleşmekte ve yüksek derecede saflık sağlamaktadır. Örneğin Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan agarose blue, sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen saflaştırma katsayısından daha düşük bir değer (62.1) elde etmişlerdir [128]. Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan blue agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak yaklaşık 600 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. [127]. Çalışmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen PON1 enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak belirlemişlerdir [127]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [128]. PON1 enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON1 enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [127,128,169].

Araştırmamızın ilk aşaması olan HPLC analizi ile PON1 enziminin ticari olarak alınan 3oxoC8HSL ve C10HSL sinyal moleküllerini hidrolizlediği gösterilmiştir. PON1 enzimi içermeyen HPLC kromatogramlarında söz konusu sinyal moleküllerinin tek pik verdiği gözlenmiştir. Sinyal molekülüne enzim ilavesi ile söz konusu piklerin lakton halkalarının açıldığı ve laktonaz aktivitesi ile asit formuna dönüştükleri alıkonma sürelerinin farklılığı ile tespit edilmiştir. Benzer bir yöntem kullanılarak literatürde 3OC12HSL sinyal molekülüne serum ve karaciğer homojenatının hidroliz etkisi gösterilmiştir [162]. Yang ve arkadaşları fare PON genlerinin ekspresyonu sonucu elde edilen enzimin 3OC12HSL sinyal molekülünü hidrolizlediğini HPLC ve ESI-MS analizi ile ortaya koymuşlardır [163].

Çalışmamızda kullandığımız sinyal moleküllerinin lakton halkası ortamın sıcaklık ve pH'sından etkilenmektedir. Yates ve arkadaşları C4HSL ve C6HSL sinyal moleküllerini 37°C' de 22°C' ye göre 1.5 kat daha hızlı hidrolizlendiğini göstermiştir. pH'nın 7'den büyük olduğu ortamda da lakton halkasının hidrolize olduğu Byers ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir [134.] Bir bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'nın patolojik etkilerinden korunmak amacıyla bu bakteri ile karşılaşan bitkilerin pH değerini artırarak bakteriye karşı korunma sağladıkları da gösterilmiştir [139]. Bu amaçla araştırmamızda sinyal moleküllerinin hazırlanışında kullanılan tamponların ve *in vitro* çalışma ortamının pH'ının 7'den büyük olmamasına dikkat edilmiştir. Böylece sinyal moleküllerinin pH' ya bağlı hidroliz etkisi ortadan kaldırılmıştır.

Yukarıda açıklanan sinyal moleküllerinin saflaştırılan PON1 tarafından hidrolizinin kinetik değerleri olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  tespit edilmiştir. Sırasıyla 3OC8HSL ve C10HSL için  $K_m$  değerleri 2.714 mM ve 0.8 mM,  $V_{max}$  değerleri 1428.57 U/ml dakika ve 45.24 U/ml dakika olarak hesaplanmıştır. Enzimin C10HSL sinyal molekülüne karşı ilgisi 3OC8HSL sinyal molekülünden oldukça fazladır. Ancak PON1'in 3OC8HSL molekülü üzerindeki katalitik etkinliği daha yüksektir.

Araştırmamızın ikinci aşamasını oluşturan saflaştırılmış PON1 enziminin artan konsantrasyonuna bağlı olarak *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremelerini azalttığı tespit edilmiştir. Ortamda enzimin etki edeceği

sinyal molekölü konsantrasyonunun bakteri konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu göz önüne alınırsa eklenen enzimin sinyal molekölünü hidrolizlemesi ile bakteri üremesini azalttığı düşünölmektedir. Ancak yapılan çalışmalar daha çok sinyal moleküllerini yıkan enzimlerin veya inhibitörlerin, bakterilerin söz konusu molekölleri kullanarak gösterdiği türe özgü davranışlar üzerine etkisi konusundadır.

Bakterilerin kullandığı birçok sinyal molekölünün ticari olarak satın alınamaması, izolasyonlarının da teknik açıdan zaman gerektirmesi ve mali açıdan masraflı olması nedeniyle araştırmamızda enzimin etkisinin bakterilerin üreme ortamında gözlenmesi uygun görölmüştür. Bu şekilde fazla miktarda saf enzim elde etmenin güç olması ve PON1 enziminin bakteri üremeleri üzerine etkisinin incelenmesinde kullanılan miktarın da minimum olmasıyla da enzim israfının önüne geçilmiştir. Yapılan plaka çalışmalarında kullanılan inkubasyon sürelerinin belirlenmesinde ortamdaki sinyal molekölü konsantrasyonlarının maximum olduğu zaman dilimi kullanılmıştır.

Çalışmamızda *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremeleri üzerine artan konsantrasyonda PON1 etkisinin tetrazolyum viyoleto metabolizma indükatörü ile boyandıktan sonra elde edilen görüntülerin kantitatif değeri için spektrofotometrik analiz yapılmıştır. Bunun sonucunda elde edilen değerler artan PON1 konsantrasyonunun söz konusu bakterin üremesini azalttığı sonucunu desteklemektedir. Aynı zamanda saflaştırılmış PON1 enziminin kullanılan bakteriler için antimikrobiyal ajan olduğu söylenilebilir. PON1 enziminin sinyal molekölüne etki ederek bakteri üremesini azalttığı ve bakterileri öldürmediği, enzim içeren plakadan alınan örneklerin petride üremenin gösterilmesi ile desteklenmiştir. Uroz ve arkadaşları tarafından da açıklandığı gibi QQ stratejileri bakterileri öldürmekten ziyade bakterilerin türe özgü davranışlarının ortaya çıkmasını etkilemeyi amaçlamaktadır. Bu ise enfeksiyonlara karşı tedavide yeni stratejilerin geliştirilmesi için önemli bir özelliktir [134].

Bu çalışmada QQ ajanı olarak kullandığımız PON1 enziminin birçok bakterinin türe özgü davranışlarından biri olan biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi *Pseudomonas aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmler üzerinde incelenmiştir.

Bazı bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahiptir. Bunlardan en yaygınları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'dur [170]. Dolayısıyla biyofilm davranışının incelenmesi amacıyla çalışmamızda yaygın olarak kullanılan patojenik bir bakteri olan *P. aeruginosa* tercih edilmiştir.

Biyofilm oluşumu, bakterilerin sadece bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunduktan sonra araya yapışması ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri şeklinde gerçekleşen rastgele bir olay değildir. Birçok mikroorganizma aktivitelerini kontrol etmek için QS mekanizmasını kullanırlar. Biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip sinyal molekülleri aracılığıyla haberleşerek söz konusu türe özgü davranışlarını sergileyebilirler [171]. Patojenik bir bakteri olan *P. aeruginosa* da virülens faktörlerini salgılama, elastaz üretimi, antibiyotik sentezi ve biyofilm oluşumu gibi birçok türe özgü davranışı sergilemek için AHL yapıdaki 3OC12HSL ve C4HSL sinyal moleküllerini kullanmaktadır [172, 173]. Önemli bir çevre ve sağlık sorunu haline gelen biyofilm oluşumunun önlenmesi, mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulmasını hedefleyen ve QQ olarak adlandırılan yaklaşım ile mümkün olabilmektedir. Örneğin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumundan sorumlu 3OC12HSL sinyal molekülünün yıkımı ile biyofilm oluşumunun azaltılabildiği Ozer ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [161]. Son yıllarda yapılan yeni çalışmalarla biyofilmlerin parçalanması için enzimlerin de kullanılabildiği ve *P. aeruginosa* biyofilm oluşumundan sorumlu sinyal moleküllerinden biri olan 3OC12HSL parçalanma etkinliğinin de en çok PON genlerinde kodlanan paraoksonazlara bağlı olduğu da tespit edilmiştir [157]. Ayrıca insan paraoksonazlarının laktonaz aktivitesi 30 farklı non-AHL tipi lakton üzerinde gösterilmiştir [2].

Çalışmamızın bu bölümünde PON1 enziminin sırasıyla olgun biyofilm ve gelişmekte olan biyofilmler üzerine etkisi belirlenmiştir. Aynı zamanda enzimin biyofilm oluşumunda zamana bağlı etkisi tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmalar Aalborg University Department of Chemistry, Biotechnology and Environmental Engineering, Denmark biyoteknoloji laboratuvarlarında Assoc. Dr. Jeppe Lund NIELSEN danışmanlığında yapılmıştır. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın

türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır [174]. Buna bağlı olarak çalışmamızda *P. aeruginosa* bakterisinin olgun biyofilm oluşturması için en uygun inkubasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Söz konusu inkubasyon süresi sonundaki yüksek konsantrasyonda bakteri popülasyonu ortamdaki sinyal molekülü konsantrasyonu hakkında da bilgi vermektedir. Bu çalışmada artan konsantrasyonda PON1 enziminin olgun biyo-filmleri ortamda fazla miktarda bulunan sinyal molekülleri yıkmak koşulu ile bozduğunu göstermektedir.

Biyofilm gelişimi boyunca belirli zaman aralıklarında sürekli artan konsantrasyonlarda PON1 enzimi ilavesi ile de biyofilm oluşumunun azaldığı görülmüştür. Enzimin söz konusu bakteri ortamına sürekli ilavesinin amacı, ortamda enzimin bozulması veya yıkılmasından kaynaklanan aktivitesinin kaybolmasını önlemektir. Biyofilm oluşumu bilindiği gibi mikroorganizmaların yüzeye tutunması, kolonizasyon ve kopma basamaklarından oluşan bir olaydır [175, 176]. Dolayısıyla *P. aeruginosa* bakterilerinin henüz yüzeye tutunduğu andan itibaren ortama belirli zaman aralıklarında sürekli PON1 enziminin ilavesi ile biyofilm oluşumdaki azalma, enzimin biyofilm gelişimi boyunca herhangi bir bozunmaya uğramadığını göstermiştir. Ayrıca kolonizasyon sonrası ortamın sinyal molekülü konsantrasyonunun arttığı göz önünde bulundurulursa enzim az miktarda sinyal molekülünü yıkmak koşulu ile de biyofilm oluşumunu azaltabilmektedir.

Araştırmamızın son aşamasında gelişmekte olan biyofilm üzerinde PON1 enziminin zamana bağlı etkisi incelenmiştir. Biyofilm gelişiminin ilk basamağında ortama ilave edilen artan konsantrasyonda PON1 enzimi etkisinin inkubasyon sürelerini artırdıkça biyofilm oluşumu üzerine etkiyi de azalttığı görülmüştür.

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi ile sinyal moleküllerini yıktığı düşünülerek bakteriler arası iletişim olan QS inhibisyonuna neden olduğu yapmış olduğumuz çalışmalarda gösterilmiştir. Paraoksonaz enzimlerinin *Burkholderia*, *Yersinia*, *Serratia* ve *Aeromonas* gibi birçok patojenik bakteri tarafından üretilen AHL yapıdaki sinyal moleküllerini hidrolizlediği bilinmektedir [177-179]. Ayrıca 3OC12HSL [162], 3OC8HSL ve C10HSL gibi birçok AHL sinyal molekülünü de

hidrolizleyebilmesi PON enzimlerinin AHL inaktivasyonunda öncül enzimler olabileceğini göstermektedir. Devam eden çalışmalar PON enzimlerinin AHL laktonaz aktivitesi ile QQ ajanı olarak birçok gram negatif ve gram pozitif bakterilerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesini sağlayacağı düşünülmektedir [162]. Detoksifikasyon ve antiaterosikloratik aktiviteleri ile karşımıza çıkan PON enzimlerinin son yıllarda da QS inhibisyonunu sağlayarak antimikrobiyal ajan olabileceği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıda bulgular elde edilmiştir:

- İnsan serum paraoksonaz 1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısına sahip bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile iki aşamada saflaştırılmıştır.
- Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan insan serum PON1 enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- Saflaştırılan PON1 enziminin ticari olarak alınan 3oxoC8HSL ve C10HSL sinyal moleküllerini hidrolizlediği HPLC analizleri ile gösterilmiştir.
- Söz konusu sinyal moleküllerinin saflaştırılan PON1 enzimi tarafından hidrolizinin kinetik değerleri olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  tespit edilmiştir. Sırasıyla 3OC8HSL ve C10HSL için  $K_m$  değerleri 2.714 mM ve 0.8 mM,  $V_{max}$  değerleri 1428.57 U/ml dakika ve 45.24 U/ml dakika olarak hesaplanmıştır.
- Saflaştırılmış PON1 enziminin artan konsantrasyonuna bağlı olarak *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremelerini sinyal moleküllerini yıktığı düşünülerek azalttığı tespit edilmiştir.
- *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakteri üremeleri üzerine artan konsantrasyonda PON1 enzim etkisinin kantitatif değeri için spektrofotometrik analiz yapılmıştır.

- QQ ajanı olarak kullandığımız PON1 enzimi *P.aeruginosa* bakterisinin türe özgü davranışlarından biri olan olgun biyofilmler üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir.
- Gelişmekte olan biyofimler üzerine sürekli PON1 enzimi ilavesi biyofilm üzerindeki inhibisyon etkisini arttırdığı tespit edilmiştir.
- Biyofilm ortamına eklenen PON1 enziminin uzun süreli inkubasyonlar sonunda etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Henke, JM., Bassler, BL. "Bacterial Social Engagement". *Trends in Cell Bio.* (2004), 14 (11), 648-656.
- [2] Teiber, JF., Draganov, DI, La Du Bert." Lactonase and lactonizing activities human serum paraoxonase(PON1) and rabbit serum PON3". *Biochemical Pharmacology* (2003), 66 , 887–896.
- [3] Costa, L., Vitalone, A., Colea, TB., Furlong, CE." Modulation of paraoxonase (PON1) activity" *Biochemical Pharmacology.* (2005), 69, 541–550.
- [4] Schauder, S., and Bassler, B. L. "The languages of bacteria". *Genes & Development*, (2001), 15, 1468–1480.
- [5] Greenberg, E.P. "Quorum sensing in Gram-negative bacteria". *ASM News* (1997), 63, 371-377.
- [6] Kempner, E. S. and Hanson, F. E. "Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*". *J. Bacteriol.* (1968), 95, 975-979.
- [7] Eberhard, A. "Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis". *J. Bacteriol.* (1972), 109, 1101-1105.
- [8] Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. and Oppenheimer, N. J. "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase". *Biochem.* (1981), 20, 2444-2449.
- [9] Eglund, K. A. & Greenberg, E. P." Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Elements of the *luxI* promoter". *Mol. Microbiol.* (1999) 31, 1197-1204.
- [10] Williams, P., Bainton, N. J., Swift, S., Chabra, S. R., Winson, M. K., Stewart, G.S.A.B., Salmond, G. P. C. and Bycroft, B. W. "Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes: Bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics". *FEMS Microbiol. Lett.* (1992), 100, 161-168.
- [11] Nottingham QS web site: [www.nottingham.ac.uk/quorum/](http://www.nottingham.ac.uk/quorum/)
- [12] Fuqua, C., Greenberg E. P. "Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signalling". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2002), 3, 685-695.
- [13] Winzer K, Hardie KR, Williams P. "Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch!". *Curr. Opin. Microbiol.* (2002), 5, 216-222.



- [14] Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR. "Bacterial communication (QuorumSensing) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*(2005), 312, 417-423.
- [15] <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/what2.htm> (Erişim tarihi: 30 Mayıs 2006).
- [16] Bassler, BL." How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing". *Current Opinion in Microbiology.* (1999), 2, 582–587.
- [17] Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, MR. "Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections". *Lab Med.* (2002), 33, 295–306.
- [18] Sharma, A., Sahgal, M., Johri, B.N. "Microbial communication in the rhizosphere: Operation of quorum sensing". *Current Science.* (2003),85, 1164-1172.
- [19] Miller, M.B., Bassler, B.L. "Quorum sensing in bacteria". *Annu. Rev. Microbiol.* (2001), 55, 165-199.
- [20] Parsek, M.R., Greenberg, E.P. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involve in associations with higher organisms". *PNAS.* (2000), 97, 8789-8793.
- [21] Fuqua, C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. "Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators". *Annu. Rev. Microbiol.* (1996), 50, 727-751.
- [22] Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J.R., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S., Winson, M.K., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. "The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *P. aeruginosa*". *EMBO J.* (1993), 12, 2477-2482
- [23] Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. "N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*". *Biochem J.* (1992), 288, 997-1004.
- [24] Van Delden, C., Iglewski, B. "Cell-to-cell signaling and *P. aeruginosa* infections". *Emerg. Infect. Dis.* (1998), 4, 551-560.
- [25] Williams, P., Camara, M., Hardman, A."Quorum sensing and the population-dependent control of virulence". *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (2000), 355, 667–680.
- [26] De Kievit, T. R., Parkins, M.D., Gillis, R.J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B.H., Storey, D.G. "Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *P. aeruginosa* biofilms". *Antimicrob. Agents. Chemother.* (2001), 45, 1761–1770.

- [27] Gambello, M. J., Kaye, S., Iglewski, B. H. "LasR of *P. aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression". *Infect. Immun.* (1993), 61, 1180-1184.
- [28] Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. "Expression of *P. aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication". *Science.* (1993), 260, 1127-1130.
- [29] Ochsner, U.A., Reiser. J."Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *P. aeruginosa*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1995), 92, 6424- 6428.
- [30] Brint, J. M., Ohman D. E. "Synthesis of multiple exoproducts in *P. aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family". *J. Bacteriol.* (1995), 177, 7155-7163.
- [31] Pessi, G., Haas, D. "Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum sensing regulators LasR and RhlR in *P. aeruginosa*". *J. Bacteriol.* (2000), 182, 6940-6949.
- [32] Whiteley, M., Lee, K.M., Greenberg, E.P. "Identification of genes controlled by quorum sensing in *P. aeruginosa*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1999), 96, 13904-13909.
- [33] Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H. "Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *P. aeruginosa*". *Proc Natl Acad Sci US.*, (1999), 96, 11229-11234.
- [34] McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, E.C." The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *P. aeruginosa*". *J. Bacteriol.* (2000), 182, 2702-2708.
- [35] Kline, T., Bowman, J., Iglewski, B.H., de Kievit, T., Kakai, Y., Passador, L. "Novel synthetic analogs of the *Pseudomonas* autoinducer". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1999), 9, 3447-3452.
- [36] Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. "Bacterial Biofilms: A common Cause of Persistent Infections". *Science.* (1999), 284, 1318-1322.
- [37] Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. "Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation". *Molecular Microbiology.* (2004), 52, 917-924.
- [38] Allison DG."The biofilm matrix". *Biofouling.* (2003), 19 (2), 139-150.

- [39] Padera RF. "Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm". *Cardiovasc. Pathol.* (2006), 15, 264–270.
- [40] Hussain M, Wilcox MH, White PJ. "The slime of coagulase negative *Staphylococci*: biochemistry and relation to adherence". *FEMS Microbiol.* (1993), 10, 191-207.
- [41] McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of N-acylhomoserine lactones". *Microbiology.* (1997), 143, 3703-3711.
- [42] Geisenberger, O., Givskov, M., Riedel, K., Hoiby, N., Tummeler, B., Eberl, L. "Production of N-acyl-L-homoserine lactones by *P.aeruginosa* isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis". *FEMS Microbiol Lett.* (2000), 184, 273–278.
- [43] Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., Ausubel, F.M. "Killing of *Caenorhabditis elegans* by *P. aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1999), 96, 715-70.
- [44] Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., Goldberg, J.B., Prince, A. "Contribution of specific *P. aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection". *Infect Immun.* (1996), 64, 37-43.
- [45] Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N. "The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*". *Microbes Infect.* (2000), 2, 1721–1731.
- [46] Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., Greenberg, E.P. "Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms". *Nature.* (2000), 407, 762-764.
- [47] Schierholz, J.M., Beuth, J., Konig, D., Nurnberger, A., Pulverer, G. "Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria". *Zentbl Bakteriol.* (1999), 289, 165-177.
- [48] Xu, K. D., McFeter, G. A., Stewart, P. S. "Biofilm resistance to antimicrobial agents". *Microbiology.* (2000), 146, 547-549.
- [49] Delden, C. V., Iglewski B. H. "Cell-to-Cell signaling and *P. aeruginosa* Infections". *Emerging Infectious Diseases.* (1998), 4, 551-560.
- [50] Aldridge, W.N., Reiner, E, "Enzyme inhibitors as substrates: interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acid". *American Elsevier, New York.* (1975), 176-189,

- [51] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Enzyme Nomenclature. Recommendation 1984 Suppl. 2, correction and additions. *European Journal of Biochemistry* (1989), 489-533.
- [52] Mackness, M.I., Thompson, H.M., Hardy, A.R., Walker, C.H., "Distinction between A-esterase and arylesterase. *Biochemistry Journal* (1987), 245, 293-296.
- [53] Main, A.R., "The role of A- esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion", *Can. J. Biochem. Physiol.*, (1956) , 34, 197.
- [54] La Du, B.N., Furlong, C.E. and Reiner, E., "Recomended nomenclature system for the paraoxonases", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) 119-120, 599.
- [55] Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. "Human serum Paraoxonase". *Gen Pharm.* (1998), 3, 329-36.
- [56] Aviram M, Rosenblat M, Scott B, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CI, Newton RS, La Du B. "Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants". *Free Rad Biol & Med.* (1999), 26, 892-904.
- [57] Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Bhatnagar D, Durrington PN. "Presence of paraoxonase in human interstitial fluid". *FEBS Letters.* (1997), 416, 377-80.
- [58] Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr 1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci*, (2001), 98, 6842-47.
- [59] Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. "Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein- associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation". *J Biol Chem.* (2000), 275, 4435-42.
- [60] Aviram M. "Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease?". *Mol Med Today* .(1999), 5, 381-6.
- [61] Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1999), 19, 2214-25.
- [62] Sönmez H. "Lipid metabolizmasının ana hatları, primer ve sekonder hiperlipidemiler". *Türkiye Klinikleri.* (2000), 13, 1-8.

[63] Ali AB, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. "Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender and regulated during inflammation". *Free Rad Bio & Med.* (2003), 34, 824-9.

[64] Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. "Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions". *Circulation.* (2000), 101, 2510-17.

[65] La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M. "On the physical role(s) of the paraoxonases". *Chem -Biol Inter.* (1999), 119-120, 379-88.

[66] Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. "Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to oxidized and cytotoxic complex". *J Lipid Res* (1991), 32, 63-70.

[67] Lu,H.,Zhu, Z.,Ze,Y.,Qin,J.,"Cloning, Purification,And Refolding Of Human Paraoxonase-3 Expressed In *Escherichia Coli* And Its Characterization". *Protein Expression And Purification.* (2006), 46, 92-99.

[68] Jawad, Z. and Paoli, M. "Novel sequences propel familiar folds". *Structure (Camb) Review.* (2002), 10(4), 447.

[69] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A. "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Curr. Opin. Lipidol.* (1996) 7, 69

[70] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N. "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1995), 92, 7187.

[71] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritsch, G., Lücke, C. and Rüterjans, H. "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*". *Structure.* (2001), 9, 493.

[72] Marie-Claude Garn, B., Abbott, C., Messmer, T. S., Mackness, M., Durrington, P., Pometta, T.D., James, R. W "Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations". *Biochem. J.* (1994), 304, 549-554.

[73] Rodrigo, L., Gil,F., Hernandez, A.F., Lopez, O., Pla, A."Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purificationand biochemical properties". *Biochem. J.* (2003) 376, 261–268

[74] Mackness, M.I., “Commentary. ‘A’ esterases, Enzymes looking for a role?”, *Biochem Pharmacol*, (1989a) 38, 385.

[75] Mackness, M.I., (1989b) “Possible medical significance of human serum ‘A’ esterases In: Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds”. Ellis Horwood, Chichester, 202-213.

[76] Laplaud, P.M., Dantoine, T. and Chapman, M.J., “Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses”, *Clin. Chem. Lab. Med.*, (1998), 36, 431.

[77] Shih, D.M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y-R., Navab, M., Fogelman, A.M. and Lusis, A.J. “Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model”. *J. Clin. Invest.* (1996), 97, 1630.

[78] Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y-R., Navab, M., Li, W-F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M. and Lusis, A.J. “Serum paraoxonase knockout mice are susceptible to organophosphate insecticides and lipoprotein oxidation”. *Nature*. (1998), 394, 284.

[79] Navab, M., Hama, S.Y., Wagner, A.C., Hough, G., Watson, A.D., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., Laks, H. and Fogelman, A.M. “Protective action of HDL-associated PON1 against LDL oxidation. In: Costa LG, Furlong CE (eds) Paraoxonase (PON1) in health and disease”. Kluwer, Norwell, (2002) pp 125–136.

[80] Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N. “Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R”. *Arterioscler. Thromb Vasc.Biol.* (1998), 18, 1617.

[81] Mackness, M.I., Arrol, S. and Durrington, P.N. “Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein”, *FEBS Lett.*, (1991), 286, 152.

[82] Mackness, M.I., and Durrington, P.N., “Paraoxonase: another factor in NIDDM cardiovascular disease”. *Lancet*. (1995), 346, 856.

[83] Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Beaudoux, J.L., Peynet, J., Legrand, A. and Delattre, J. *Clin. Chem. Lab Med.* (1999), 37, 939.

[84] Stein, O. and Stein, Y., “Atheroprotective mechanisms of HDL”. *Atherosclerosis*. (1999) ,144, 285.

[85] Rye KA, Clay MA, Barter PJ. “Remodelling of high-density lipoproteins by plasma factors”. *Atherosclerosis*. (1999), 145, 227-238.

[86] Maron DJ, Ridker PM, Pearson TA, Grundy SM. "Dyslipidemia, other risk factors, and the prevention of coronary heart disease!!". Ch 38. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke R. Hurst's The Heart 10<sup>th</sup> edn. McGraw-Hill Companies. USA (2001), 1131-60.

[87] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. "Paraoxonase and atherosclerosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2001), 21, 473-80.

[88] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik. "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes". *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) 11, 412.

[89] Draganov, D.I. and La Du, B.N. "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) , 369, 78.

[90] Lusis, A.J. "Atherosclerosis". *Nature.* (2000), 407, 233.

[91] Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease". *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (2001), 21, 1451.

[92] Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N. "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters". *Drug Metab. Dispos.* (2000), 28(11), 1335

[93] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrell, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Panayiotis, A., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M.P., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E. "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid  $\gamma$ -lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism". *J. Med. Chem.* (2000), 43, 19.

[94] Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., "Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities", *Circulation*, (2000), 101, 2510.

[95] Jakubowski, H., "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation", *J. Biol. Chem.*, (2000), 275, 3957.

[96] Kearny, A.S, Crawford, L.F., Mehta, S.C. and Radebaugh, G.W., "The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981", *Pharm. Res.*, (1993), 10, 1461.

- [97] Garrett, E.R., Lippold, B.C. and Mielck, J.B., "Kinetics and mechanisms of lactonization of coumarinic acids and hydrolysis of coumarins I", *J. Pharm. Sci.*, (1971), 60, 396.
- [98] Augustinsson, K.B., "Homologous enzymes and biochemical evolution", (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311.
- [99] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase", *J. Clin. Invest.*, (1998), 101(81), 1581.
- [100] Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., "Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase", *Chemico-Biological Interaction*, (1999), 119-120, 235.
- [101] Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I-W., Rosegay, A. and Duggan, D.E., "Metabolic disposition studies of simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug", *Drug Metab Dispos* (1990), 18, 138.
- [102] Tang, B.K. and Kalow, W., "Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1995), 47, 449.
- [103] Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y. and Morino, A., "Paraoxonase Has a Major Role in the Hydrolysis of Prulifloxacin (NM441), a Prodrug of a New Antibacterial Agent", *Drug Metab. Dispos.*, (1998), 26, (4), 355.
- [104] La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51.
- [105] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J. "PON1 and organophosphate toxicity", pp. (2002) 165-83
- [106] Broomfield, C.A. and Ford, K.W., "Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes", *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases, La Grande-Motte, France*, (1991), 167.
- [107] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. and Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genetics*, (1996), 14, 334.
- [108] Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, New York, (1989)



- [109] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).
- [110] Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence", *Biochemistry*, (1991), 30, 10141.
- [111] Blatter, G, M.C., Abbott, C., Messmer, S., Mackness, M., Durrington, P.N., Pometta, D. and James, R.W., "Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations", *Biochem. J.*, (1994), 304, 549.
- [112] Leviev, I., Negro, F. and James, R.W., "Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA: an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1997), 17, 3935.
- [113] Leviev, I. and James, R.W., "Promoter polymorphisms of the human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2000), 20, 516.
- [114] Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. and James, R.W., "Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2003), 23, 2083.
- [115] Feingold, K-R., Memon, R-A., Moser, A-H. and Grunfeld, C., "Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response", *Atherosclerosis*, (1998), 139, 307.
- [116] Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Nayak, D.P., Hama, S., Navab, M. and Fogelman, A.M., "HDL loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection", *Circulation*, (2001), 103, 2283.
- [117] Cabana, VG., Reardon, C.A, Feng, N., Neath, S.X., Lukens, J.R. and Getz, G.S., "Serum paraoxonase: effect of the apoproteins of HDL and the acute phase response", *J. of Lipid Research*, (2003), 44(4), 780.
- [118] Martoglio, B. and Dobberstein, B., "Signal sequences - more than just greasy peptides", *Trends Cell Biol.*, (1998), 8, 410.
- [119] Deakin, S., Leviev, I., Nicaud, V., Brulhart Meynet, M. C., Tiret, L. and James, R. W. "Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families". *J. Clin. Endocrinol.Metab.* (2002), 87, 1268–1273

- [120] Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity", *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1999), 19, 2214.
- [121] Oda, M.N., Bielicki, J.K., Berger, T. and Forte, T.M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein a-I primary structure modulate paraoxonase activity", *Biochem*, (2001), **40**, 1710.
- [122] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., "Antioxidative activity of high-density lipoproteins in vivo", *Atherosclerosis*, (1993), 100, 13.
- [123] Mazur, A., "An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates". *J. Biol. Chem.* (1946) ,164, 271-289.
- [124] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., "Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties". *J. Biol. Chem.* (1953), 204, 221-232
- [125] Main, A. R. (1956) *Can. J. Biochem. Physiol.* 34, 197-216.
- [126] Furlong, C.E., Costa, L.G., Hassett, C., Richter, R.J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Disteché, C.M., Omiecinski, C.J., Chapline, C., Crabb, J.W. and Humbert, R., "Human and rabbit paraoxonase: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification", *Chem. Biol. Interact.*, (1993), 87, 35.
- [127] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab. Dispos.*, (1991), 19, 100.
- [128] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991), 30, 10133.
- [129] Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vázquez, J. and Pla, A., "Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver", *Biochem. J.*, (1997), 321, 595.
- [130] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase", *Biochem J*, (1973), 135, 93.
- [131] Don, M.M., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Further evidence for the concept of bovine plasma arylesterase as a lipoprotein", *Biochem J*, (1975), 151, 625.
- [132] Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., "Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum". In "Enzymes

Hydrolyzing Organophosphorus Compounds”, Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989), 128-142.

[133] Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. and Villanueva, E., “Partial purification of paraoxonase from rat liver”, *Chem. Biol. Interact.*, (1993), 87, 69.

[134] Uroz, S., Yves, D., Oger, P. “ Quorum sensing and quorum quenching : The yin and yang of bacterial communication”. *Chem. Bio. Chem .* (2009), 10, 205-216.

[135] Rasmussen TB, Givskov M.”Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects”. *Microbiol.* (2006), 152, 895-904.

[136] Juhas M, Eberl L, Tümmler B. “Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*”. *Environ Microbiol.* (2005), 7(4), 459-471.

[137] Parsek MR, Val, DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. “Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation”. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999), 96, 4360–4365.

[138] Yates EA, Philipp B, Buckley C. “N-acylhomoserinelactones undergo lactonolysis in a pH, temperature, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*”. *Infect Immun.* (2002), 70, 5635–5646.

[139] Byers JT, Lucas C, Salmond GP, Welch M. “Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorumsensing signaling molecule”. *J Bacteriol .* (2002), 184, 1163–1171.

[140] Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. “AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*”. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000), 97, 3526–3531.

[141] Uroz S, D’Angelo-Picard C, Carlier A. “Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plantpathogenic bacteria”. *Microbiol.* (2003), 149, 1981–1989.

[142] Carlier A, Uroz S, Smadja B. “The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, aiiB, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity”. *Appl Environ Microbiol.* (2003), 69, 4989–4993.

[143] Park SY, Lee SJ, Oh TK. “AhlD, an Nacylhomoserinelactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria”. *Microbiol.* (2003), 149, 1541–1550.

- [144] Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. ‘‘Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1’’. *Appl Environ Microbiol.* (2003), 69, 5941–5949.
- [145] Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. ‘‘Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia’’. *Proc Natl Acad Sci U SA* (2004), 101(10), 3587-3590.
- [146] Karatuna, O., Yagci, A. ‘‘Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and quorum sensing’’. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* (2008), 38 (1), 42-51.
- [147] Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME. ‘‘Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector’’. *J Bacteriol.* (2005), 187, 1799–1814.
- [148] Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T. ‘‘Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species’’. *Microbiol.* (2005), 151, 1325–1340.
- [149] Hentzer M, Wu H, Andersen JB. ‘‘Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors’’. *EMBO J.* (2003), 22, 3803–3815.
- [150] Bjarnsholt T, Jensen PO, Rasmussen TB. ‘‘Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections’’. *Microbiol.* (2005), 151, 3873–3880.
- [151] Dong YH, Gusti AR, Zhang, Q, Xu JL, Zhang LH. ‘‘Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species’’. *Appl Environ Microbiol.* (2002), 68, 1754-9.
- [152] Leadbetter JR, Greenberg EP. ‘‘Metabolism of acylhomoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*’’. *J Bacteriol.* (2000), 182, 6921-6.
- [153] Dong YH, Zhang LH. ‘‘Quorum sensing and quorum-quenching enzymes’’. *J Microbiol.* (2005), 43, 101-9.
- [154] Lin YH, Xu JL, Hu J. ‘‘Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorumquenching enzymes’’. *Mol Microbiol.* (2003), 47, 849-60.
- [155] Ulrich RL.’’ Quorum quenching: enzymatic disruption of *N*-Acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*’’. *Appl Environ Microbiol.* (2004), 70, 6173-80.
- [156] Xu F, Byun T, Deussen HJ, Duke KR. ‘‘Degradation of *N*-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase’’. *J Biotechnol.* (2003), 101, 89-96.

- [157] Greenberg EP, Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J. "Enzymatic inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. Cell-cell communication in bacteria". *American Society for Microbiology Conferences*. (2004), 5, S1-18.
- [158] Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. "The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention". *Am J Cardiovasc Drugs*. (2004), 4, 211-7.
- [159] Özdemir, H., Rezaki, M., *Depresyon Saptanmasında Genel Sağlık Anketi -12 Türk Psikiyatri Dergisi*; 18(1):13-21 (2007)
- [160] <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2000-2/Makale-14.pdf>  
15.07.2009
- [161] Ozer, EA., Pezzula, A., Shih, DA., Chun, C., Furlong, C., Lusic, AJ., Greenberg, EP., Zabner, J. " Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing". *FEMS Microbiol. Lett.* (2005), 253, 29-37.
- [162] Teiber, JF., Horke, S., Haines, DC., Chowdhary, PK., Xiao, J., Kramer, GL., Haley, RW., Draganov, DI. " Dominant role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone". *Infect. and immunit.* (2008) p. 2512-2519.
- [163] Yang, F., Wang, LU., Wang, J., Dong, YH., Hu, JY., Zhang, LH. " Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species". *FEBS Letters*. (2005), 579, 3713-3717.
- [164] Bush K. "Antibacterial drug discovery in the 21st century". *ClinMicrobiol Infect.* (2004), 10, (Suppl 4),10-7.
- [165] Powers JH: Antimicrobial drug development-the past, the present, and the future, *Clin Microbiol Infect* (2004), 10 (Suppl 4),23-31.
- [166] Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE Jr: Trends in antimicrobial drug development: implications for the future, *Clin Infect Dis.* (2004), 38(9), 1279-86.
- [167] Taga ME, Bassler BL: Chemical communication among bacteria, *PNAS.* (2003), 100, (Suppl 2),14549-54.
- [168] Xavier KB, Bassler BL: LuxS quorum sensing: more than just a number game, *Curr Opin Microbiol.* (2003), 6(2),191-7.
- [169] Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.S., Teiber, J. and La Du, B.N. "The human serum paraoxonase/arylesterase gen (PON1) is one member of a multigene family", *Genomics*, (1996), 33, 498.

- [170] Donlan RM, Costerton JW. "Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms". *Clinical Microbiol*, (2002), 15 (2), 167-193.
- [171] Arnold JW., Silvers S. "Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation". *Poul Sci.* (2000), 79, 1215-1221.
- [172] Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. "Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .(1994), 91, 197–201.
- [173] Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. "The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing". *Trends Microbiol.* (1997), 5, 132–134.
- [174] Jones HC, Roth IL, Saunders WM III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* (1969), 99,316-25.
- [175] Lindsay D, Von Holy A." Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know?" *J Hosp Infect* . (2006), 64, 313-25.
- [176] Watnick P, Kolter R. "Biofilm, city of microbes". *J Bacteriol.* (2000), 182, 2675-9.
- [177] Cataldi, T. R., G. Bianco, L. Palazzo, and V. Quaranta "Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry". *Anal. Biochem.* (2007), 361, 226–235.
- [178] Draganov, D. I., J. F. Teiber, A. Speelman, Y. Osawa, R. Sunahara, and B. N. La Du "Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities". *J. Lipid Res.* .(2005), 46, 1239–1247.
- [179] Stoltz, D. A., E. A. Ozer, C. J. Ng, J. M. Yu, S. T. Reddy, A. J. Lulis, N. Bourquard, M. R. Parsek, J. Zabner, and D. M. Shih. "Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia". *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* (2007), 292, L852–L860.