

**BİR ANTİMİKROBİYAL AJAN OLARAK  
PARAOKSONAZI (LAKTONAZ) ENZİMİNİN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM  
SENSING İLİŞKİLİ DAVRANIŞLARINA  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Aynur AYBEY**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİR ANTİMİKROBİYAL AJAN OLARAK PARAOKSONAZI (LAKTONAZ)  
ENZİMİNİN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSİNG İLİŞKİLİ  
DAVRANIŞLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Aynur AYBEY**

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

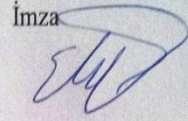
BURSA-2014

## TEZ ONAYI

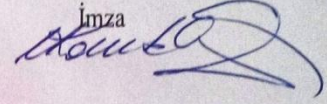
Aynur AYBEY tarafından hazırlanan “Bir antimikrobiyal ajan olarak paraoksonazl (laktonaz) enziminin *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing ilişkili davranışlarına etkisinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

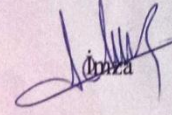
**Başkan:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


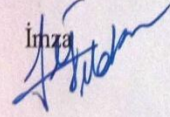
**Üye:** Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU  
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza  


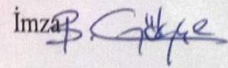
**Üye:** Doç. Dr. Selma SİNAN  
Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza  


**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Başak GÖKÇE  
Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı

İmza  


**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**  
Enstitü Müdürü

.../.../....

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

../.. /....

**İmza**

**Aynur AYBEY**

## ÖZET

Doktora Tezi

BİR ANTİMİKROBİYAL AJAN OLARAK PARAOKSONAZI (LAKTONAZ) ENZİMİNİN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSİNG İLİŞKİLİ DAVRANIŞLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

**Aynur AYBEY**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

*Pseudomonas aeruginosa*'da birçok virulans faktörü üretiminin düzenlenmesinde Quorum sensing (QS)'in rolü gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'da yüksek antibiyotik direnci yeni tedavi seçenekleri arayışına yol açmış ve QS sisteminin inhibisyonu mercek altına alınmıştır. Bakterinin virulansında azalmaya yol açacak QS inhibitörü ajanların bulunması ile *P. aeruginosa* infeksiyonları tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilebilir.

Bu amaçla çalışmada, *P. aeruginosa*'da QS sinyal moleküllerini laktonaz aktivitesi ile hidroliz eden insan serum paraoksonaz 1 (hPON1) enzimi kullanılmıştır. hPON1 enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Sepharse 4B-L-tirozin-1-Naftilamin) yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saf enzim, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile 43 kDa olan tek bir bant olarak saptanmıştır. 3 adet *P. aeruginosa* suşları büyüme eğrisi için değerlendirilmiş ve durağan faz süreleri tespit edilmiştir. Durağan fazdaki bakteri örnekleri hPON1 enziminin artan konsantrasyonu katılarak (0,1-10 mg/ml) üretilmiştir. Bu suşlar arasında, *P. aeruginosa* ATCC35032 üremesinin 2,5 mg/ml konsantrasyondan itibaren azaldığı bulunmuştur ve çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir. Çalışmada, her bir davranış için farklı konsantrasyonlarda kullanılan hPON1 enziminin bakterinin virulans faktörlerini, hareketliliğini ve biyofilm oluşumunu azalttığı bulunmuştur. Ancak, hPON1 enzimi (0,1-10 mg/ml) virulans faktörlerinden elastaz ve LasA proteaz üzerine azaltıcı yönde bir etki göstermemiş, alkali proteaza karşı ise 0,1 mg/ml gibi düşük konsantrasyonda azaltıcı etkisi saptanmıştır. 0,3-5 mg/ml konsantrasyonları arasında piyosyanin ve ramnolipid üretimlerinin 1,25 mg/ml'de önemli ölçüde azalmıştır. hPON1 enzimi (0,1-10 mg/ml), biyofilm oluşumu ve olgun biyofilmleri de 1 mg/ml'de %50 oranında azaltmıştır. Olgun biyofilmlerin EPS bileşenini yıkıma uğratmıştır. Enzimin 0,003-30 mg/ml konsantrasyonları arasında kayma, yüzme ve titreme hareketlerine azaltıcı etkisi düşük konsantrasyon olan 0,3 mg/ml'de oldukça yüksek olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, paraoksonaz1, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, virulans faktörleri.

**2014, xii + 109 sayfa.**

## ABSTRACT

PhD Thesis

### INVESTGATION OF EFFECT OF THE PARAOXONASE1 (LACTONASE) ENZYME AS AN ANTIMICROBIAL AGENT ON QUORUM SENSING RELATED BEHAVIORS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**Aynur AYBEY**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

The role of Quorum sensing (QS) on the regulation of many virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* has been shown. High antibiotic resistance in *P. aeruginosa* has led to the search for new treatment options and inhibition of QS system is scrutinized. By the presence of QS inhibitory agents of lead to a reduction in bacterial virulence, new approaches in the treatment of *P. aeruginosa* infections can be improved.

For this purpose, human serum paraoksonaz1 (hPON1) which is hydrolyzed signal molecules of *P. aeruginosa* by using lactonase activity was used. hPON1 was purified by using ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography (Sephacrose 4B-L-tyrosine-1-Naphthylamine). Purified enzyme was determined as a single band with 43 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. 3 *P. aeruginosa* strains were evaluated for growth curve and stationary phase time was determined. Samples of bacteria in stationary phase by addition of increasing concentrations of hPON1 (0,1-10 mg/ml) were produced. Among strains, growth reduction of *P. aeruginosa* ATCC35032 in 2,5 mg/ml concentration was found, and studies were continued with these strain. In this study, hPON1 enzyme using different concentrations for each behavior have been found to reduce the virulence factors, motility and biofilm formation. However, hPON1 enzyme (0,1-10 mg/ml) on elastase and LasA protease did not show an effect on the decrease, decreasing effect to against alkaline protease in the lowest concentration as 0,1 mg/ml was determined. It was significantly decreased production of pyocyanin and rhamnolipid in 1,25 mg/ml of hPON1 between 0,3-5 mg/ml concentrations. Biofilm formation and mature biofilm were decreased % 50 by 1mg/ml hPON1 concentration (0,1-10 mg/ml). EPS component on mature biofilm was degraded. Decreasing effect of hPON1 between 0,003-30 mg/ml on swarming, swimming and twitching motility was quite high even in 0,3 mg/ml concentration.

**Key Words:** Biofilm, paraoxonase1, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, virulence factors.

**2014, xii + 109 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince engin tecrübe ve bilgi birikimiyle beni yönlendiren, çalışmalarımın her aşamasında deneyimlerinden faydalanmama imkan sunan, her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a,

Çalışmalarım boyunca enzim saflaştırma aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Selma SİNAN'a,

HDP(F) - 2013/29 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığı'na,

Dostluğunu her zaman hissettiren ve çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Alev USTA'ya,

Hayatımın her alanında beni doğru yönde etkileyen, her zaman yanımda olduklarını hissettirerek bana güven veren, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen canım ailem Mesut-Fatma AYBEY ve aramızda mesafeler olmasına rağmen bana her zaman destek olup gülümseten canım kardeşim Esra AYBEY'e, en içten dileklerle teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Aynur AYBEY

.../.../.....

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Quorum Sensing .....	5
2.1.1. Tarihsel gelişimi.....	6
2.1.2. Sinyal molekülleri.....	7
2.1.3. Quorum sensing mekanizmaları.....	10
2.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da quorum sensing .....	13
2.2. <i>Pseudomonas</i> Virulans Faktörleri.....	15
2.2.1. Bakteri yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri .....	16
2.2.1.1. Kirpik (Flagella) .....	17
2.2.1.2. Pili (Fimbriya).....	17
2.2.1.3. Hareketlilik.....	18
2.2.2. Hücre dışına salgılanan virulans faktörleri .....	19
2.2.2.1. Ekzoproteazlar.....	19
2.2.2.1.1. Elastaz .....	19
2.2.2.1.2. LasA proteaz .....	20
2.2.2.1.3. Alkali proteaz.....	21



2.2.2.2. Piyosiyenin.....	22
2.2.2.3. Ramnolipid .....	24
2.3. <i>Pseudomonas</i> ve Biyofilm.....	26
2.3.1. Biyofilm yapısı ve oluşumu.....	26
2.3.2. Biyofilm ve EPS.....	29
2.3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biyofilm ve quorum sensing ilişkisi.....	30
2.4. Quorum Quenching.....	31
2.4.1. Quorum quenching mekanizmaları.....	31
2.4.2. Quorum sensing inhibitörleri.....	33
2.4.2.1. Doğal ve sentetik inhibitörler .....	34
2.4.2.2. Quorum quenching enzimleri.....	36
2.4.2.2.1. AHL laktonaz.....	36
2.4.2.2.2. AHL açılaz.....	37
2.4.2.2.3. Paraoksonaz.....	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	42
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler.....	42
3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar.....	46
3.2. Yöntem.....	47
3.2.1. İnsan serum paraoksonaz 1 (hPON1) enziminin saflaştırılması.....	47
3.2.1.1. Kan serumunun ayrılması .....	47
3.2.1.2. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	47
3.2.1.3. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması .....	47
3.2.1.4. Enzim aktivite tayini .....	48
3.2.2. Lowry yöntemiyle protein tayini.....	48
3.2.3. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü .....	49

3.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşunun seçimi ve üreme eğrisi .....	49
3.2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının üremesine hPON1 enziminin etkisi ....	49
3.3. hPON1 Enziminin Virulans Faktörlerine Etkisi.....	50
3.3.1. Ekzoproteazlara etkisi.....	50
3.3.1.1. Alkali proteaz testi.....	50
3.3.1.2. Stafilolitik LasA proteaz testi.....	50
3.3.1.3. Elastaz testi.....	51
3.3.2. Piyosiyenin testi.....	51
3.3.3. Ramnolipid testi.....	52
3.4. hPON1 Enziminin Antibiyofilm Etkisi.....	53
3.4.1. Tüpte biyofilm oluşumu ve hPON1 enziminin etkisi.....	53
3.4.2. Biyofilm oluşumu ve olgun biyofilmlere hPON1 enziminin etkisi.....	53
3.4.3. EPS degradasyonu.....	54
3.5. Hareketlilik Testleri.....	55
3.5.1. Kayma (swarming) testi.....	55
3.5.2. Yüzme (swimming) testi.....	55
3.5.3. Titreme (twitching) testi.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	56
4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması .....	56
4.3. SDS PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü .....	59
4.4. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini.....	59
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Üreme Eğrileri .....	60
4.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Üremesine hPON1 Enziminin Etkisi....	61
4.7. Virulans Faktörlerinin Üretimine hPON1 Enziminin Etkisi .....	64
4.7.1. Alkali proteaz aktivitesi.....	64
4.7.2. Stafilolitik Las A proteaz aktivitesi.....	65

4.7.3. Elastaz aktivitesi.....	66
4.7.4. Piyosiyanin üretimine hPON1 enziminin etkisi .....	67
4.7.5. Ramnolipid üretimine hPON1 enziminin etkisi.....	69
4.8. hPON1 Enziminin Biyofilm Etkisi ve EPS Yıkımına Etkisi.....	72
4.8.1. Tüpte biyofilm .....	72
4.8.2. U plakada biyofilm oluşumu ve olgun biyofilm .....	73
4.8.3. EPS yıkımı.....	77
4.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Hareketliliği Üzerine hPON1 Enziminin Etkisi .....	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	82
KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ .....	109

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde Orantı
°C	Santigrat Derece
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
C	Karbon
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum iyonu
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalsiyum klorür dihidrat
CNBr	Siyanojen Bromür
CTAB	Cetil Trimetil Amonyum Bromid
dk	Dakika
Fe <sup>+3</sup>	Demir iyonu
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum hidrojen fosfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Potasyum Sülfat
M	Molar
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Magnezyum sülfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodyum hidrojen fosfat
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum klorit
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Diamonyum hidrojen fosfat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
nm	Nanometre
O <sup>2-</sup>	Süperoksit
OD	Optik Dansite
SDS	Sodyum dodesil sülfat
U	Enzim Ünitesi
UV	Ultraviyole
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikrolitre

## Kısaltmalar

AHL  
AI  
AIP  
C4-HSL  
DNA  
ECR  
EPS  
  
hPON1  
HSL  
kDa  
LB  
Las A  
Las B  
LPS  
NMeFe  
ÖK  
PAGE  
PB  
PON  
PQS  
QS  
QSI  
QQ  
RhC10C10  
RhC10  
Rh2C10C10  
Rh2C10  
SAM  
TEMED  
3oxoC12HSL

## Açıklamalar

Açıl HSL  
Otoindükleyici  
Otoindükleyici peptitler  
N-bütiril-homoserin lakton  
Deoksiribonükleik asit  
Elastin Kongo kırmızısı  
Ekzopolisakkarit  
Ekstrasellüler polimerik substans  
İnsan serum paraoksonaz 1  
Homoserin lakton  
Kilo Dalton  
Luria Bertani  
Serin Proteaz  
Çinko metalloproteaz  
Lipopolisakkarit  
N-metil-fenil-alanin  
Ön kültür  
Poli akrilamid jel elektroforezi  
Piyosiyenin broth  
Paraoksonaz  
Pseudomonas Quinolone Signal  
Quorum Sensing  
Quorum sensing inhibitörleri  
Quorum Quenching  
Ramnolipid 1  
Ramnolipid 2  
Ramnolipid 3  
Ramnolipid 4  
S-adenozilmethionin  
N, N, N',N'- tetra metil etilendiamin  
N-3-oksododekanol-homoserin lakton

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Sinyal molekülleri A) Açıl HSL B) Otoindükleyici peptit (AIP) C) AI-2.	7
Şekil 2.2. Homoserin lakton (HSL) ve AI-2 biyosentezi.....	9
Şekil 2.3. Bakterilerdeki üç farklı Quorum Sensing mekanizması.a) Gram negatif bakterilerde quorum sensing, b) Gram pozitif bakterilerde quorum sensing, c) <i>V. harveyi</i> 'de quorum sensing.....	12
Şekil 2.4. <i>P. aeruginosa</i> suşlarında bulunan Las ve Rhl QS sistemi mekanizmaları....	14
Şekil 2.5. PQS sinyal molekülü ve 4-kinolonların temel yapısı.....	15
Şekil 2.6. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunabilen virulans faktörleri.....	16
Şekil 2.7. Flagellalarıyla kayma hareketi yapan <i>P. aeruginosa</i> .....	17
Şekil 2.8. Tip IV pili ve titreme.....	18
Şekil 2.9. <i>P. aeruginosa</i> 'nın ürettiği piyosiyenin molekülü.....	23
Şekil 2.10. <i>P. aeruginosa</i> tarafından sentezlenen R1, R2, R3 ve R4 ramnolipitlerin moleküler yapıları.....	25
Şekil 2.11. Biyofilm oluşumu.....	28
Şekil 2.12. hPON1 enziminin yapısı.....	39
Şekil 2.13. Lakton hidrolizi.....	40
Şekil 2.14. PON enzimlerinin genel mekanizması.....	41
Şekil 4.1. Hidrofobik etkileşim kolonundan hPON1 enziminin elüsyon grafiği.....	57
Şekil 4.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan hPON1 enziminin SDS-PAGE görüntüsü. ....	59
Şekil 4.3. Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	60

Şekil 4.4. <i>P. aeruginosa</i> suşlarına ait üreme eğrileri.....	61
Şekil 4.5. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının üremesine hPON1 enziminin kantitatif etkisi....	63
Şekil 4.6 hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında alkali proteaz aktivitesi....	64
Şekil 4.7. Alkali proteaz aktivitesine hPON1 enziminin etkisi.....	65
Şekil 4.8. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında Las A proteaz aktivitesi....	66
Şekil 4.9. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında elastaz aktivitesi.....	67
Şekil 4.10. <i>Pseudomonas</i> suşunda piyosiyanın üretimi.....	68
Şekil 4.11. hPON1 enziminin piyosiyanın üretimine etkisi.....	68
Şekil 4.12. Işık mikroskopunda piyosiyanın üretimi etkilenmiş bakteri hücrelerinin görünümü (100X).....	69
Şekil 4.13. Ramnolipid üretimine hPON1 enziminin etkisi .....	70
Şekil 4.14. Ramnolipid moleküllerine hPON1 enziminin etkisi .....	70
Şekil 4.15. Petride ve ışık mikroskopunda ramnolipid üretiminin görünümü (100X).	71
Şekil 4.16. Ramnolipid içeren ve içermeyen örneklerin yağ üzerinde yayılmaları.....	72
Şekil 4.17. Tüpte biyofilm yapan ve yapmayan kristal viyole ile boyanmış <i>P. aeruginosa</i> hücreleri.....	73
Şekil 4.18. Biyofilm oluşumuna farklı zaman dilimlerinde hPON1 enziminin etkisi..	73
Şekil 4.19. 24 saatlik biyofilm oluşumuna hPON1 enziminin antibiyofilm etkisi.....	74
Şekil 4.20. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında biyofilm oluşumunun ışık mikroskopunda görünümü (100X).....	75
Şekil 4.21. Olgun biyofilmlere hPON1 enziminin antibiyofilm etkisi.....	76
Şekil 4.22. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında olgun biyofilmlerin ışık mikroskopunda görünümü (100X).....	77
Şekil 4.23. Karbohidrat tayini için glukoz standardı.....	78
Şekil 4.24. Kayma, yüzme, titreme hareketlerine hPON1 enziminin etkisini gösteren petri görüntüleri.....	79
Şekil 4.25. hPON1 enziminin (a) titreme, (b) kayma ve (c) yüzme hareketine etkisi..	81

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunabilen virulans faktörleri.....	16
Çizelge 3.1. Besiyerleri ve çözeltiler.....	43
Çizelge 4.1. Saflaştırma basamakları.....	58
Çizelge 4.2. Kullanılan hPON1 enzimlerinin protein miktarları.....	60
Çizelge 4.3. <i>P. aeruginosa</i> alkali proteaz aktivitesi zon çapları.....	64
Çizelge 4.4. hPON1 enzimi muamele edilmiş örneklerde piyosiyenin konsantrasyonu..	69
Çizelge 4.5. Yağ üzerinde ramnolipid yayılma zonları.....	72
Çizelge 4.6. hPON1 enzimi içeren EPS örneklerinde protein ve karbonhidrat miktarı..	78
Çizelge 4.7. <i>P. aeruginosa</i> titreme, kayma ve yüzme hareketlerinin zon çapları.....	79



## 1.GİRİŞ

Quorum sensing (QS), bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile birbirleri ile haberleşmeleri ve iletişim kurmalarıdır (Bjarnsholt ve ark. 2007). Hücrenin bireysel davranış yerine, organize bir topluluk olarak davranış göstermesi de QS olarak tarif edilir. QS bakterilerde kümeleşme, hareket, biyofilm oluşturma, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virulans (ekzoenzim ve proteaz üretimi) gibi pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar (Sakuragi ve Kolter 2007). Quorum sensing aracılığı ile kontrol edilen davranış biçimleri, ancak bir grup bakteri tarafından gerçekleştirildiğinde fonksiyonel olabilmekle birlikte bu davranış biçimleri arasında bazı *Vibrio* türlerinde ışık oluşturulması, *Pseudomonas aeruginosa*'da biyofilm yapımı, *Photobacterium luminescences*'de antibiyotik üretimi, ayrıca değişik tür bakterilerde çeşitli virulans faktörlerinin sekresyonu, sporulasyon, konjugasyon ve pigment üretimi sayılabilir (Xavier ve Bassler 2003).

Virulansta çok önemli rol oynayan, salgıladığı birçok ekstraselüler enzimin üretiminin kontrolü, sinyal molekülleri ile sağlandığı için, QS sistemlerinin anlaşılmasında üzerinde en çok çalışılan bakterilerden biri de *P. aeruginosa*'dır. Sinyal moleküllerinin saptanması mikroçevre koşullarında *P. aeruginosa*'nın davranışları hakkında önemli ipuçları verir. Bu ipuçları bu bakterinin tanısı ve enfeksiyonun sağaltımında önemli açılımlar sağlayabilir (Bertani ve ark. 2003). *P. aeruginosa*'nın ürettiği ve virulansta önemli olduğu bilinen ekstraselüler enzimler arasında elastaz, proteaz, ramnolipid, piyosiyenin, piyoverdin sayılabilir. Tüm bunların patojenite de önemli katkıları olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. *P. aeruginosa*'da tanımlanan iki farklı sistem ile çalışan QS sisteminin ekstraselüler virulans faktörlerinin ekspresyonunu (elastaz, alkali proteaz, piyosiyenin, ramnolipid gibi) düzenlediği gösterilmiştir (Mcgrath ve ark. 2004, Juhas ve ark. 2005, Wagner 2005, Reading ve Sperandio 2006, Venturi 2006).

*P. aeruginosa* patogenezi çok sayıda virulans faktörünü içeren kompleks bir yapıya sahiptir. Bu faktörlerin üretimi ve kontrolü büyük oranda QS sistemlerine, homoserin lakton (HSL) tabanlı sinyal moleküllerine ve spesifik transkripsiyonal aktivatör proteinlerine bağlıdır. Bu düzenleyici sistemler, *P. aeruginosa*'nın virulans faktörlerini koordinasyon içinde ve hücre yoğunluğu gözetilerek üretmesini ve böylece konak

savunma mekanizmasının üstesinden gelmesini sağlar. *P. aeruginosa* antibiyotiklere direnç geliştirme konusunda oldukça başarılıdır (Stein 2005). Dış membran yapısındaki lipopolisakkaritler doğal bariyer oluşturarak çoğu antibiyotiğin penetrasyonunu engeller. Biyofilm oluşturarak koruyucu bir matriks içinde kolonize olması, antibiyotiklerden korunmasını sağlar. Bakterilerde mukus üretimi ve/veya biyofilm oluşumu gibi virulans faktörlerde etkili genlerin ekspresyonunun engellenmesinin klinik açıdan önemli bir strateji olabileceği kabul edilmektedir. Bu amaçla, örneğin *P. aeruginosa*'da AHL sinyal moleküllerinin tahrip edilmesi veya sentezlerinin inhibisyonu veya LuxR/AHL kompleksinin oluşumunun blokajı ile QS inhibisyonu yeni bir tedavi şekli oluşturabilecektir (Hentzer ve ark. 2003, Sugo ve Smithy 2003). Quorum Quenching (QQ) olarak ifade edilen bu yaklaşım, mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulmasını hedefler (Molina ve ark. 2003). Antimikrobiyal tedavilerde *P. aeruginosa*'nın QS mekanizmaları hedeflenirse anormal biyofilm formasyonu oluşumu aracılığı ile tedaviye yardımcı olunabilir (Huang ve ark. 1998, Hentzer ve ark. 2003, Bjarnsholt ve ark. 2005).

QS sinyalinin yayılmasını önlemenin en bilinen yolu sinyal moleküllerinin yıkıma uğratılmasıdır. Bu sinyal molekülleri yıkan enzimlerin klinik önem taşıyabilecekleri açıktır. Bu enzimlere quorum sensingi bozdukları için, quorum quenching enzimleri denilmektedir (Dong ve ark. 2007). Özellikle gram negatif bakterilerde çevreyi algılama sistemi, açil homoserin laktonlar şeklinde sinyal moleküllerinin varlığına ve üretimine bağlıdır (Rasmussen ve Givskov 2006, Steindler ve Venturi 2007). Bu yapıdaki sinyal moleküllerinin inaktivasyonuna neden olan enzimlerden biri; karakteristik olarak kalsiyuma bağımlı ve laktonaz aktivitesi gösteren paraoksonaz (PON)'dır (Ozer ve ark. 2005, Yang ve ark. 2005, Teiber ve ark. 2008). PON enzimi PON1, PON2 ve PON3 izoenzimlerini içine alan bir multigen ailesidir. Bu izoenzimler ilaç metabolizması ve organofosfat zehirsizleştirilmesi gibi fizyolojik olarak önemli hidrolitik aktivitelere sahiptir (Draganov ve La Du 2004). PON izoenzimlerinin quorum quenching enzim aktivitesi gösterdiği son yıllarda kısmen gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada rekombinant insan PON2 izoenziminin bazı sinyal moleküllerini hidrolizlediği gösterilmiştir (Draganov ve ark. 2005). İnsan serumundan saflaştırılan hPON1 enziminin *P. aeruginosa* tarafından üretilen 3oxoC12 homoserin laktonu hidrolizlediği

belirtilmiştir (Ozer ve ark. 2005). Ancak özellikle PON1 enzimi organofosfat insektisitleri, sinir ajanlarını, aromatik karboksilik asit esterlerini, siklik karbonat esterlerini, aromatik laktonları ve alkil laktonların hidrolizini (Billecke ve ark. 2000, Draganov ve ark. 2005) katalizlediği bilinmesine rağmen, şimdiye kadar söz konusu enzimin fizyolojik substratı tespit edilememiştir. Belirli bir konak-patojen etkileşimi olduğu düşünülürse; örneğin insan patojeni olarak bilinen *P. aeruginosa* tarafından üretilen N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserin laktona karşı konak bağışıklık sisteminde söz konusu enzimin fizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir (Telford ve ark. 1998, Ritchie ve ark. 2003, Ritchie ve ark. 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalar hPON1 enziminin N-hexa-L-homoserin lakton, ve N-3-oxooktonoyl-L-homoserin lakton sinyal moleküllerini hidrolizlediği HPLC analizleri ile gösterilmiştir. Ayrıca oldukça patojen bakteriler olan *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* bakterilerinin üremeleri üzerine etkisi incelenmiştir (Aybey 2010).

Bir yandan gelişen antibiyotik direnci, diğer taraftan yeni geliştirilen antibiyotik sayısındaki azalma infeksiyon hastalıkları tedavisi açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. QS adıyla bilinen ve bakteri hücrelerinin aynı topluluk içindeki yoğunluğunu algılaması ve bunun sonucunda topluluk içindeki tüm bireylerin koordine biçimde davranış değişikliği göstermesi olarak tanımlanabilecek bu özellik çok sayıda gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmada saptanmıştır. Bu mekanizmanın farklı biçimlerde inhibisyonunun antibakteriyel etki gösterebileceğine dair gözlem ve kanıtlar mevcuttur (Akova 2005).

Araştırmacılar tarafından, bakterileri antibiyotik kullanarak öldürmek yerine, onlar arasındaki haberleşme sistemini hedef alarak antibiyotik direncine bir çözüm geliştirilebileceği önerilmiştir (Hentzer ve ark. 2003). QS sistemine ait sinyal moleküllerinin, mikroorganizmaların virulans faktörlerini uyarması ve biyofilm oluşumunda görev alması yeni ilaçların geliştirilmesi için bu sinyal moleküllerini önemli bir hedef haline getirmiştir. QS inhibitörleri ile ilgili araştırmalar henüz deneme aşamasında olup çalışmalar bakteriyel davranışlar üzerinde yoğunlaşmıştır (Rasmussen ve Givskov 2006).

QS sisteminin engellenmesi multiantibiyotik dirençli bakterilerle savaşmada yeni bir umuttur. Bakterisidal ve bakteriyostatik stratejilerden ziyade bakteriyel QS sistemlerinin engellenmesi, gıda teknolojisi, tarım ve tıp gibi çok farklı alanlarda talep görebilir (Bosgelmez-Tınaz 2006).

Bu çalışmanın konusu, son yıllarda antimikrobiyal ajan olarak karşımıza çıkan hPON1 enziminin, özellikle patojen bazı bakterilerin QS mekanizmalarını kullanarak sergiledikleri türe özgü davranışlara etkisinin incelenmesidir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Quorum Sensing

Bakterilerin birbirleri ile iletişim kurduklarının gösterilmesi, mikroorganizmaların oluşturduğu dünya hakkındaki düşüncelerimizi değiştirmiştir. Bu iletişimde kullanılan dil, mikroorganizmaların çevreye saldıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. 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 (Schauder ve Bassler 2001). Son zamanlarda kullanılmaya başlanan Quorum Sensing (QS) terimi bu özellikten hareketle Quorum: salt çoğunluk ve sense: hissetme kelimelerinden oluşturulmuştur.

Bakterilerin ortamdaki otoindükleyici miktarını algılaması ortamdaki diğer bakterilerin sayısı hakkında fikir sahibi olmasını sağlamaktadır. Otoindükleyicilere karşı bakterinin gen ekspresyonunu değiştirerek yanıt vermesi, bir bakteri topluluğu içinde her bir hücrenin bir diğeri ile koordine bir biçimde davranması sonucunu doğurmaktadır. (Akova 2005).

QS bakterilerde kümeleşme, hareket, biyofilm oluşturma, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virulans (ekzoenzim ve proteaz üretimi) gibi pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar. Bu düzenlenme sonucunda bakteri ortamdaki besin maddelerinin daha rasyonel kullanımı, bulunduğu ortama uyum sağlama, çevresel etkenlere karşı korunma, aynı ortamdaki diğer mikroorganizmalarla yarışma veya konağın savunma mekanizması ile mücadele etme, popülasyondaki birey sayısını ortamın gereklerine göre kontrol etme gibi fonksiyonları yerine getirme olanağı bulur (Sakuragi ve Kolter 2007).

### 2.1.1. Tarihsel gelişimi

İlk QS incelemeleri, serbest yaşayan iki deniz vibriosu olan *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) ve *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*) üzerinde gerçekleştirilmiştir ve 1960'lara dayanmaktadır. Normalde deniz suyunun mililitresinde 100'den daha az sayıda olan bu iki bakterinin serbest yaşarken ışığa (biyoluminesans) yapamamaları, ancak bazı deniz balıkları ve mürekkep balıklarının ışığa organellerinde  $10^{10-11}$ /ml düzeyinde konsantre olduklarında çevreye ışığa yaymaya başlamaları dikkatleri çekmiştir. Önceleri, besiyeri ortamında gerçekleştirilen deneylerde bu durum besiyerinde mevcut olan bir inhibitörün yüksek bakteri sayılarına ulaşıldığında uzaklaştırılabilmesi ile açıklanmıştır. Ancak daha sonra, ışığa görülen bir kültürün dilüe edilmesi sonucunda ışıklarını kayboluyor olması veya biyoluminesans görülen bir kültürün süpernatant kısmının az sayıda bakteri içeren bir başka kültüre eklendiğinde ışığın ortaya çıkıyor olması nedeniyle ışığın başlama sebebinin bir inhibitörün uzaklaştırılmasından değil, bir aktivatörün birikmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Bakterilerce üretilen sinyal molekülü bazal seviyede normal olarak üretilmekle birlikte, mikroorganizma sayısının belirli bir düzeye ulaşması ile birlikte bir eşik değerine ulaşmakta ve daha sonra hem sinyal molekülünün kendisinin hem de kontrol edilen virulans faktörünün üretimine artmasına neden olmaktadır (Nealson ve ark. 1970, Eberhard 1972).

*V. fischeri* tarafından üretilen QS molekülü ilk kez 1981 yılında saflaştırılmış ve N-3oxoC6 (3-oxohexanoyl) homoserin lakton (açıl-HSL) yapısında olduğu gösterilmiştir (Eberhard ve ark. 1981). S-adenozil metiyonin türevi olan bu açıl-HSL molekülünün sentezinden sorumlu olan genler tanımlanmış ve QS araştırmaları için örnek sistem olarak kabul edilmiştir (Raffa ve ark. 2005).

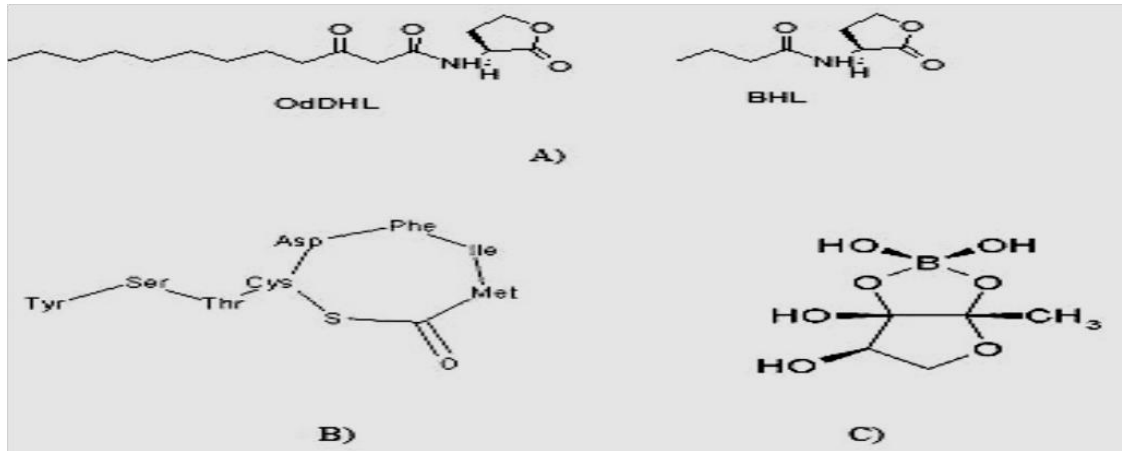
Her iki vibrio türünün ürettiği oldukları QS molekülü de N-açıl- HSL (AHL) yapısında olmakla birlikte, aralarında yan zincir yapılarında farklılıklar gözlenmiştir. QS moleküllerinin otoindükleyici (AI) olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (Akova 2005). Yıllar boyunca AHL temeline dayanan QS çalışmalarının *V. fischeri* ve *V. harveyi* gibi deniz bakterileri ile sınırlı olduğu düşünülmüş, ancak antibiyotik sentezine yönelik çalışmalar bunun böyle olmadığını göstermiştir.

1990'ların başında, karbapenem antibiyotik üretemeyen *Erwinia carotovora* bakterisinin farklı bir mutant bakteri grubu ile birlikte olduğunda diğer bakteri tarafından sağlanan sinyal molekülü sayesinde antibiyotik sentezine yeniden başladığı gösterilmiş, bu molekülün *V. fisheri*'de ışımaya tetikleyen molekül ile aynı yapıda olduğunun görülmesi yeni çalışma alanları doğurmuştur. Daha sonra *Enterobacter*, *Hafnia*, *Rahnella* ve *Serratia* gibi birçok bakteri cinsinde ve mantarlarda değişik QS sistemleri saptanmıştır (Bainton ve ark. 1992).

İlerleyen yıllarda *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* gibi bakteri türlerinde, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, gibi maya ve küf türlerinde çeşitli QS sistemleri tanımlanmıştır (Camara ve ark. 2002, Gera ve Srivastava 2006, Deep ve ark. 2011).

### 2.1.2. Sinyal molekülleri

QS mekanizmasında kullanılan sinyal molekülleri türden türe değişmekle birlikte bakterilerin gram (+) ve gram (-) olma özelliği dikkate alınarak gruplara ayrılmaktadır. Sinyal molekülleri AHL, otoindükleyici peptidler (AIP) ve otoindükleyici-2 (AI-2) bileşikleri başta olmak üzere birkaç farklı sınıfta incelenir (Şekil 2.1). Her bir sınıf içerisinde yan zincir uzunluk farklılığı gibi küçük değişiklikler de söz konusudur (March ve Bentley 2004).



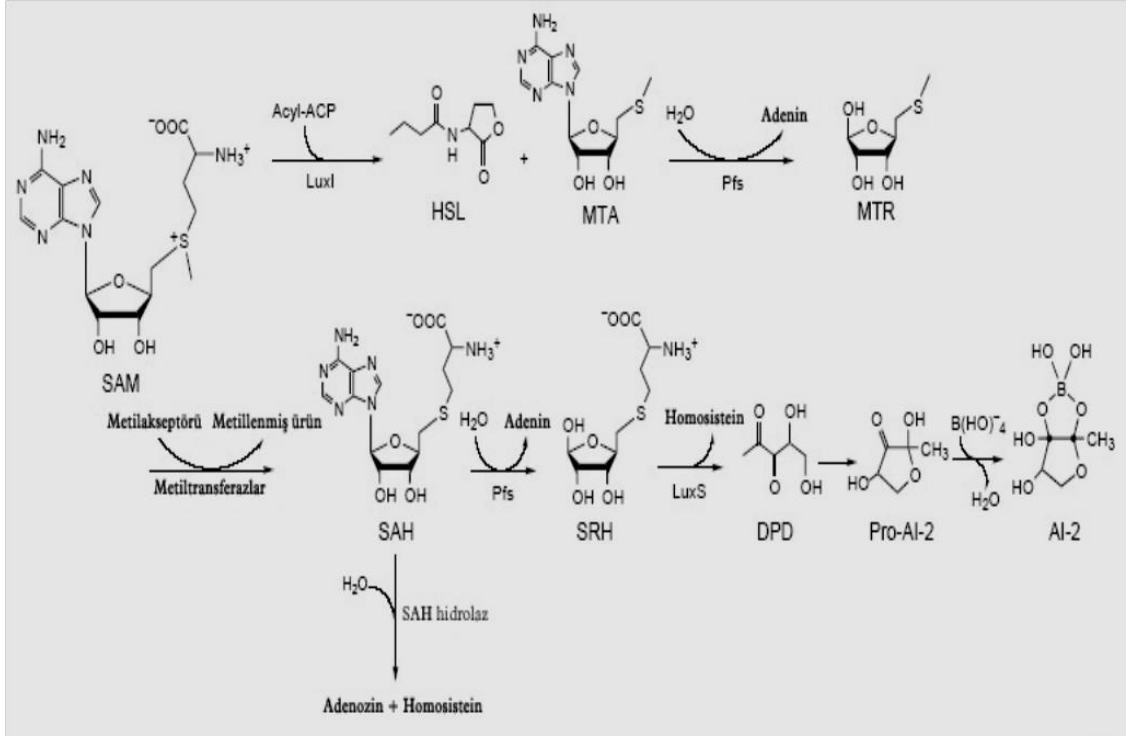
**Şekil 2.1.** Sinyal molekülleri A) Açıl HSL B) Otoindükleyici peptit (AIP) C) AI-2 (Antunes ve Ferreira 2009).

AHL sinyal molekülleri yağ açıl zincirine amid bağıyla bağlanmış homoserin lakton molekülünden oluşur. Farklı bakteriler arasında Açıl-HSL molekülleri açısından çeşitlilikler mevcut iken aynı bakteri türünde sentezlenen farklı Açıl-HSL molekülleri de mevcuttur. Açıl zincirinin uzunluğu 4-16 C arasında değişebilir. C-16 HSL molekülü *Rhodobacter capsulatus* tarafından üretilir. Açıl zincirinin 3.C'u tamamıyla okside olabileceği gibi, taşıdığı hidroksil grubuyla tamamen redükte bir durumda da bulunabilir (Fuqua ve Greenberg 2002).

Otoindükleyici peptidler (AIP) sinyal molekülü olarak ortalama 8-9 aminoasitten oluşan kısa peptit zincirleri şeklinde salgılanırlar. Bu kısa peptitler, önce propeptit olarak sentezlenir. Ardından sitoplazmada bulunan özel enzimlerle kesilip özgün uzunluğa kısaltılır ve son olarak türe özgü modifikasyonlara uğratıldıktan (gerekirse halkasal yapı kazandırıldıktan) sonra hücre dışına salgılanır (Reading ve Sperandio 2005, Xavier ve Bassler 2003).

AHL'lere benzer şekilde AI-2'de SAM (S-adenozil metiyonin)'dan türevlenmektedir (Şekil 2.2) (Xavier ve Bassler 2003). Chen ve ark. (2001) tarafından AI-2'nin yapısı aydınlatıldığında, sürpriz bir durumla karşılaşmıştır. AI-2'nin yapısında ilk kez biyolojik bir molekülde boron atomu olduğu görülmüş ve AI-2 molekülünün kimyasal olarak bir (furanosil borat diester) olduğu ortaya konmuştur (Federle ve Bassler 2003, Coulthurst ve ark. 2002). AI-2'nin SAM'dan üç enzimatik adımla üretildiği görülmektedir. Şimdilik sadece *V. harveyi* 'nin AI-2 yapısı belirlenmiştir, fakat 30'dan fazla farklı bakteri türünün oldukça korunmuş LuxS geni içerdiği bilinmektedir (Coulthurst ve ark. 2002).





**Şekil 2.2.** Homoserin lakton (HSL) ve AI-2 biyosentezi (Podbielski ve Kreikemeyer 2004)

AI-2'nin karakterizasyonu birçok bakımdan önemlidir:

- Doğada oldukça yaygın ve bilinen diğer tip otoindükleyicilerden farklı olması,
- Oldukça geniş bir aralıktaki bakterilerce yapılan ve tanınan otoindükleyici olmasıdır. Bu yüzden farklı bakteriler arasında iletişimi sağladığı bilinen ilk moleküldür.

Hem gram negatif ve hem de gram pozitif bakteriler AI-2'i bir sinyal olarak kullanmaktadır. Bu nedenle AI-2'nin evrensel veya türler arası atasal bir sinyal olduğu önerilmektedir (Coulthurst ve ark. 2002).

Bakteri populasyonlarında, hücrel metabolitler ve QS sinyal moleküllerinin ayırt edilmesi güçtür. Gerçek bir QS molekülünün bir metabolitten farklı olarak taşınması gereken özellikler şöyle özetlenmektedir:

- QS molekülünün üretimi üremenin değişik basamaklarında, özel fizyolojik koşullar altında veya çevresel değişikliklere cevap olarak ortaya çıkar.
- QS molekülü ekstraselüler olarak birikir ve özgün reseptörler tarafından algılanır.

- QS molekülünün birikmesi kritik bir eşik değerine ulaştığında planlanmış bir cevabı doğurur.
- QS molekülün doğurduğu hücrel 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 (Winzer ve ark. 2002).

Farklı insan topluluklarının farklı diller kullanmaları gibi, farklı mikroorganizma türleri de genellikle farklı QS molekülleri kullanır. Bu nedenle farklı QS moleküllerini kullanan mikroorganizmalar da birbirleri ile anlaşamamaktadır.

### 2.1.3. Quorum sensing mekanizmaları

Quorum sensing, yüksek hücre yoğunluğunda spesifik genlerin aktivasyonu ile kimyasal moleküllerin salınmasını içeren bir mekanizmadır. Bu kimyasal moleküller otoindükleyicilerdir. Hücre miktarı arttığı zaman otoindükleyici konsantrasyonu artar, hedef hücrelere bağlanır (örn; LasR-LasI, RhlR-RhlI) ve otoindükleyici protein kompleksi QS'i kontrol eden genleri aktive eder. QS sisteminde kilit rol otoindükleyicilere aittir. Hücre içinde sentezlenen otoindükleyiciler ekstrasellüler ortama salınır. Bu otoindükleyiciler komşu hücre membranındaki reseptörlerce algılanır. Bu algılanma ise hücre içinde gen transkripsiyonuna kadar giden bir sinyal iletişimi başlatır. Oluşan gen ekspresyonu ile de hücre topluluğu ortak bir yanıt geliştirmiş olur. QS gerçekleşmesi için ekstrasellüler ortamdaki otoindükleyicilerin yeterli düzeye ulaşması gerekir. Bunun için de hücre sayısının artarak popülasyonda belli bir yoğunlaşma sağlanması gereklidir. Hücre sayısı yeterli yoğunluğa ulaşmadan QS gerçekleşmez. QS sistemi temel olarak gram negatif bakterilerde bir çift regülasyon protein ve bir otoindükleyiciden, gram pozitif bakterilerde ise bir prekürsör peptid, ondan oluşan otoindükleyici peptid, hücre membranında otoindükleyici peptidi algılayan histidin kinaz reseptöründen oluşur (Schaber ve ark. 2004).

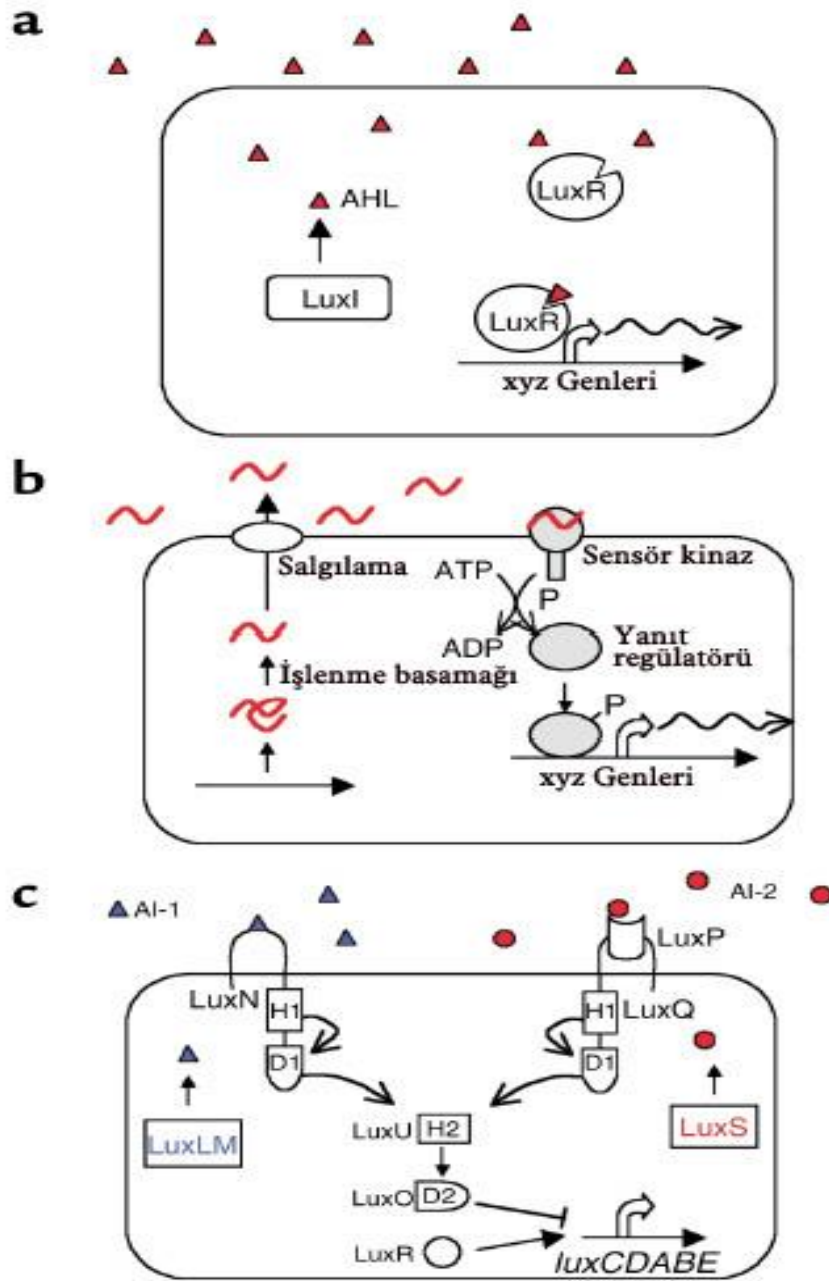
Gram negatif bakterilerde regülasyon protein çifti LuxI/LuxR homoloğu olarak adlandırılır. LuxI/LuxR çifti QS'in ilk kez tanımlandığı *V. harveyi*'de bulunan regülasyon protein çiftidir. QS'in saptandığı diğer tüm gram negatif bakterilerde regülasyon protein

çifti yapı olarak LuxI/LuxR çiftine çok benzediğinden genel bir tanımla LuxI/LuxR homoloğu olarak adlandırılırlar. Otoindükleyici görevi, açılmış homoserin lakton (HSL) molekülü tarafından yapılır ve tüm gram negatif bakterilerde aynıdır. Gram negatif bakterilerde LuxI homoloğu olan protein HSL sentezini indükler. Sentezlenen HSL hücre dışına çıkar. Hücre dışında belli bir yoğunluğa erisen HSL hücre membranı tarafından algılanarak, tekrar hücre içine girer ve diğer regülatör protein olan LuxR ile birleşerek bir kompleks oluşturur. Oluşan HSL-LuxR kompleksi gen transkripsiyonunu başlatır (Rumbaugh ve ark. 1999).

Gram pozitif bakterilerde AHL aracılığıyla oluşan QS sistemi bulunmamaktadır. Bunun yerine gram pozitif bakterilerin kısa oligopeptit otoindükleyicileri yaptığı ve taşıdığı belirlenmiştir. Otoindükleyici peptitler (AIP) olarak bilinen bu oligopeptitler 5-17 aminoasitten oluşup, bazen alışılmışın dışında yan zincir modifikasyonları göstermektedir. AHL sinyalinin aksine, bakteri hücre membranı AIP için geçirgen değildir. Hücreden dış çevreye AIP sekresyonunun taşınması hücre yüzeyindeki oligopeptid taşıyıcılar ile, aranmaları ise iki komponentli sensör transdüksiyon sistemleri ile olmaktadır (Delisa ve Bentley 2002, Federle ve Bassler 2003, Xavier ve Bassler 2003).

İki komponentli sistemler çeşitli gram negatif ve gram pozitif bakterilerde mevcut olup, bu sayede hücre dışındaki değişimler izlenip, çevredeki değişikliğe uygun yanıtı verecek gen ifadesi için gerekli bilgi iletişimi sağlanmaktadır (Federle ve Bassler 2003). İki komponentli tüm bakteriyal sistemler; sensör kinaz ve respons regülatörü olmak üzere bir çift komponent ile fonksiyon göstermektedir (Şekil 2.3). Bu çift oluşup, fosforillendiği zaman, hedef gen ifadesini değiştirebilmektedir (Xavier ve Bassler 2003).

Gram negatif ve pozitiflerden farklı olan bir diğer quorum sensing mekanizması da AI-2 üretiminden sorumlu gen *LuxS* ile gerçekleşen hibrit sistemdir. Örneğin, *V. harveyi* biyoluminesensi regüle etmede hem AI-1 ve hem de AI-2'yi kullanır. Bu organizmadaki sinyalleşme iki paralel sensör yol izleri ile olmaktadır (Coulthurst ve ark. 2002, Delisa ve Bentley 2002).



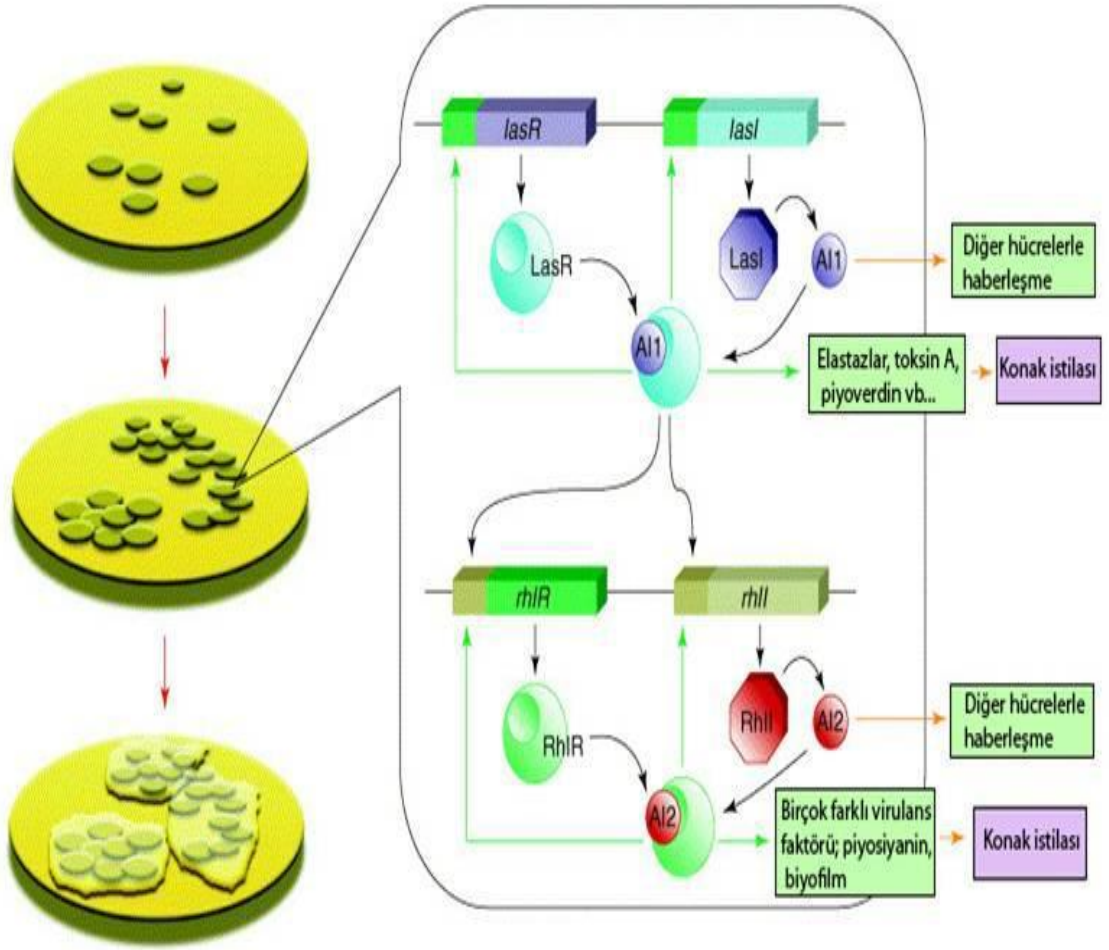
**Şekil 2.3.** Bakterilerdeki üç farklı Quorum Sensing mekanizması. a) Gram negatif bakterilerde quorum sensing, b) Gram pozitif bakterilerde quorum sensing, c) *V. harveyi* 'de quorum sensing (Federle ve Bassler 2003).

#### 2.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*'da quorum sensing

Önemli bir insan patojeni olan *P. aeruginosa*'da temel olarak üç tip QS mekanizması vardır. Bunlardan ilki AHL-LasI/LasR sistemidir. İkinci sistem ise, AHL-RhII/RhIR sistemidir. Bu iki AHL temeline dayanan sistem yanında bir de kinolonların rol oynadığı üçüncü bir sistem saptanmıştır. *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) molekülü olarak adlandırılan molekül, las ve rhl sistemleri arasında düzenleyici olarak işlev görmektedir (Delden ve Iglewski 1998, Diggle ve ark. 2007, Wagner ve Iglewski 2008).

*P. aeruginosa*'da ilk tanımlanan QS sistemi LasI/LasR sistemidir. *LasI* geni, açıl homoserin lakton sinyal molekülünün üretiminden sorumludur ve 3oxoC12HSL (N-3-oksododekanol-homoserin lakton) sinyal molekülünü üretir. Bakteri hücre yoğunluğu arttıkça ortamdaki sinyal molekülü konsantrasyonu artar ve belirli bir yoğunluğa ulaştığında *lasR* geni devreye girer. *LasR*, transkripsiyonel aktive edici proteini kodlar. 3oxoC12HSL, transkripsiyonel aktive edici proteine bağlanır ve hedef genin transkripsiyonunu uyarır (Şekil 2.4) (Rasmussen ve Givskov 2006, Antunes ve ark. 2010, Deep ve ark. 2011). *P. aeruginosa*, Las sisteminde ürettiği AHL molekülü sayesinde elastaz, proteaz, ekzotoksin A, swimming (yüzme), swarming (kayma) ve twitching (titreme) hareketi gibi virulans faktörleri ile biyofilm üretimini sağlar (Juhas ve ark. 2005, Parsek ve Greenberg 2005, Gera ve Srivastava 2006).

*P.aeruginosa* suşlarında bulunan ikinci QS sistemi RhII / RhIR sistemidir. Bu sistemde *rhII* geni C4HSL (N-bütiril-homoserin lakton) açıl homoserin lakton sinyal molekülünün sentezinden sorumludur. Sinyal molekülleri belirli bir yoğunluğa ulaştığında *rhIR* geninin transkripsiyonunu uyarır ve hedef genin aktivasyonu sağlar (Şekil 2.4) (Rasmussen ve Givskov 2006, Antunes ve ark. 2010, Deep ve ark. 2011). RhI sistemi tarafından üretilen AHL molekülü ile ramnolipid, piyosyanin, swimming (yüzme), swarming (kayma) ve twitching (titreme) hareketi gibi virulans faktörlerinin üretimi uyarılır (Juhas ve ark. 2005, Parsek ve Greenberg 2005, Gera ve Srivastava 2006).

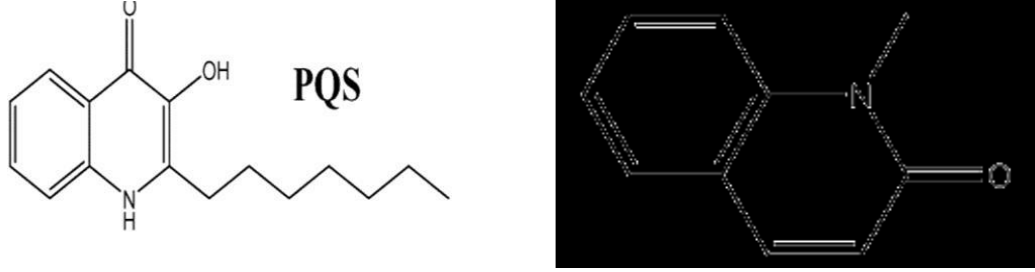


**Şekil 2.4.** *P. aeruginosa* suşlarında bulunan Las ve Rhl QS sistemi mekanizmaları (Suga ve Smith 2003).

*P. aeruginosa* suşlarında bulunan üçüncü QS mekanizması *Pseudomonas* kinolon sinyal (PQS)'dir. Bu sistemde yer alan sinyal molekülü olan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon, homoserin lakton grubunda bulunan sinyal moleküllerinden farklılık gösterir ve sadece PQS sistemine özgüdür. Bu sinyal molekülünün antimikrobiyal kinolonlardan 4-kinolon ailesi ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2.5) (Rahme ve ark. 2000, Deep ve ark. 2011).

PQS, Las ve Rhl QS sistemleri ile birlikte *lasB* elastaz geninin ekspresyonunu kontrol eder. PQS sinyal molekülünün ekspresyonu için *lasR* genine gereksinim vardır. *LasR* geninin varlığında PQS sinyal molekülü olan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon üretilir ve bu molekül *rhlI* geninin transkripsiyonunu indükler. Özetle, LasI/LasR QS sistemi tarafından üretilen sinyal dizileri oluşuktan sonra, PQS devreye girer ve RhlI/RhlR QS

sisteminin aktive olmasına olanak sağlar. Böylece PQS, Las ve Rhl sistemleri arasında bağlantı sağlamış olur (Gera ve Srivastava 2006, Rasmussen ve Givskov 2006).



**Şekil 2.5.** PQS sinyal molekülü ve 4-kinolonların temel yapısı (William 2007).

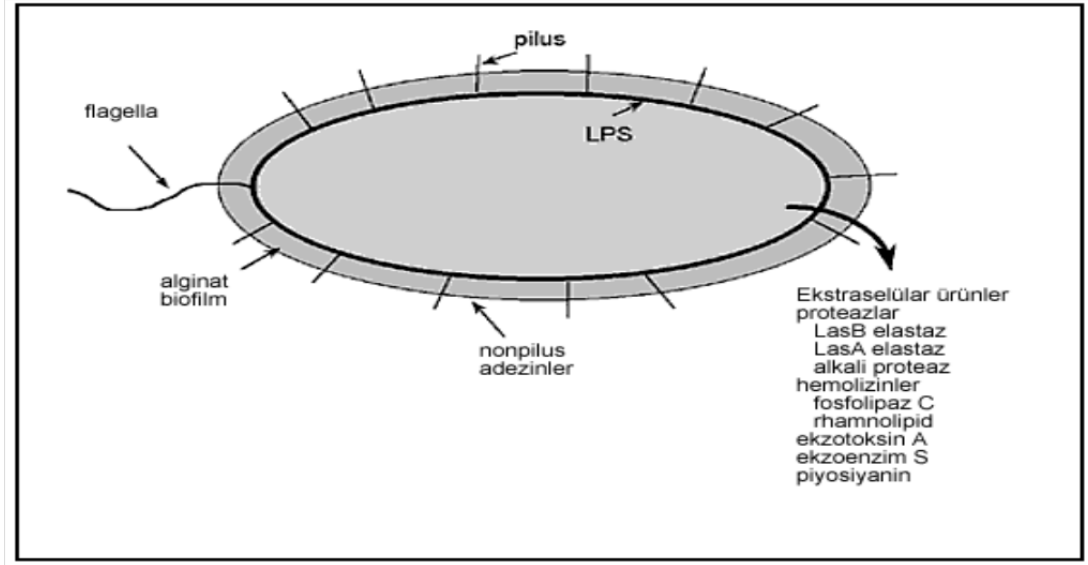
## 2.2. *Pseudomonas Virulans* Faktörleri

Mikroorganizmanın konağa yerleşmesine, çoğalmasına, konak hücrelerinin hasara uğratılmasına ve hastalık oluşturmaya virulans, bu olaydan sorumlu olan mikrobiyal faktörlere de virulans faktörleri adı verilmektedir. *Pseudomonas* 'lar infeksiyonlarından sorumlu olan çeşitli yapısal ve hücre dışı maddelere sahiptir (Delden ve Iglewski 1998). Bir fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa* konak savunmasının bozulduğu durumlarda sahip olduğu çeşitli virulans faktörlerini kullanarak infeksiyonlara neden olabilmektedir. *P. aeruginosa* suşlarında bulunan virulans faktörleri bakteri yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri ve hücre dışına salgılanan virulans faktörleri olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır (Çizelge 2.1, Şekil 2.6) (Delden ve Iglewski 1998, Rumbaugh ve ark. 1999, Gupta ve ark. 2011, Wiener-Kronish ve Pittet 2011).

*P. aeruginosa* 'nın virulans mekanizmaları sinyal molekülleri aracılığı ile QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle *P. aeruginosa* suşlarında bu sinyal moleküllerinin üretimi, virulans faktörlerinin üretilmesi yani patojenitenin oluşturulması açısından önem taşımaktadır.

**Çizelge 2.1.** *P. aeruginosa*'da bulunabilen virulans faktörleri

<b>Bakteri Hücre Yüzeyi İle İlişkili Virulans Faktörleri</b>	<b>Hücre Dışına Salgılanan Virulans Faktörleri</b>
Kirpik	Proteaz
Pili (Fimbriya)	Elastaz
Lipopolisakkarit (LPS)	Piyosiyanin
Alginat	Ramnolipid
	Fosfolipaz C
	Ekzotoksin A
	Sitotoksin



**Şekil 2.6.** *P. aeruginosa*'da bulunabilen virulans faktörleri (Delden ve Iglewski 1998)

### 2.2.1. Bakteri yüzeyi ile ilişkili virulans faktörleri

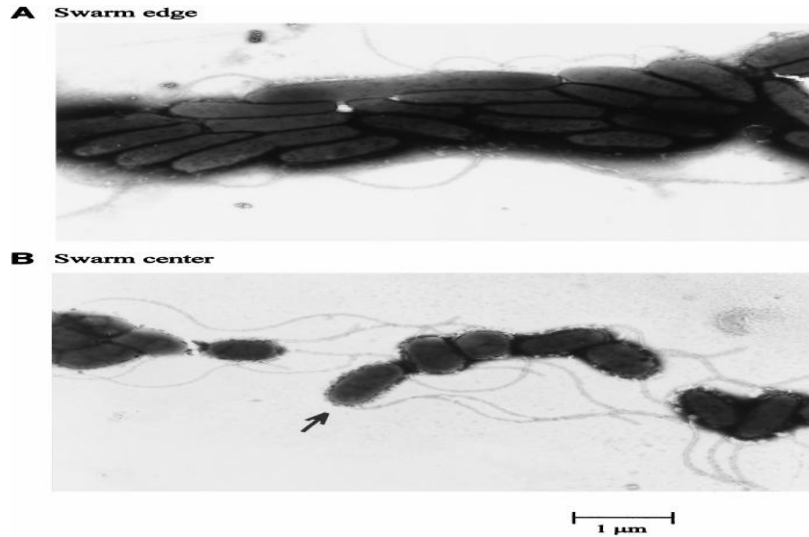
*P. aeruginosa* hücre yüzeyi ile ilişkili bir takım virulans faktörlerine sahiptir ve bunlar kolonizasyonda önemli rol oynar. Bu faktörler kirpik, pili (fimbriya), lipopolisakkarit (endotoksin) ve alginatdır.



### 2.2.1.1.Kirpik (Flagella)

Kirpik hareket organelidir. Protein yapıda, sitoplazmadan köken alan uzantılardır. Hareketli bakteriler kirpikleri sayesinde besin kaynaklarının olduğu bölgeye daha kolay gidebilirler.

Kirpik, *P. aeruginosa*'da swimming (yüzme) ve swarming (kayma) şeklindeki hareketleri sağlar (Şekil 2.7). Yüzme ve kayma hareketleri *P. aeruginosa*'nın sahip olduğu QS sistemi ile kontrol edilmektedir. Ayrıca *P. aeruginosa* infeksiyonun başlangıç aşamasındaki aderans ve kolonizasyon için de kirpiğini kullanır (Wolfgang 2004, Wiener-Kronish ve Pittet 2011).



Şekil 2.7. Flagellalarıyla kayma hareketi yapan *P. aeruginosa* (Shrout ve ark. 2006).

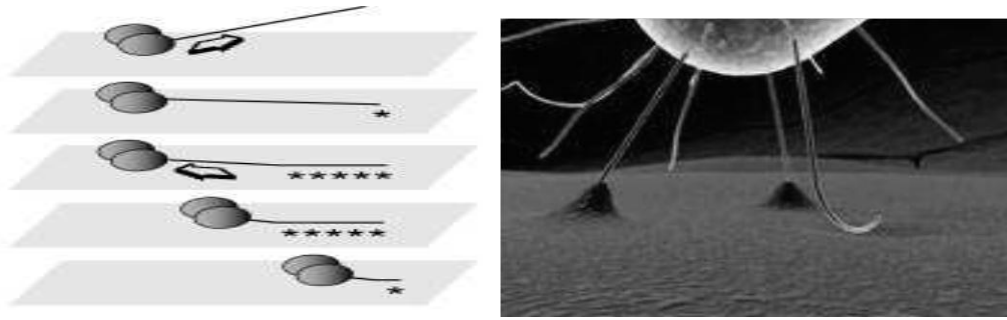
### 2.2.1.2. Pili (Fimbriya)

Pili; bakterinin kısa, filamentöz, ekstrasellüler yüzey yapılarıdır. Pili, *pilA* geni tarafından kodlanır. 15-18 kDa'luk homopolimerlerden oluşan uzun polar filamentlerdir. Pilin adı verilen protein ünitelerinin birleşmesiyle meydana gelir. Pilerin yaklaşık 5,2 nm çapındadır ve ortalama 2,5 mm uzunluğundadır.

*Pseudomonas pilisi* tip IV veya N-metil-fenil-alanin (NMeFe) olarak adlandırılan sınıfa aittir. Ayrıca epitel hücrelere ve mukozal yüzeylere tutunmasında önemli role sahiptir.

Pilin ucu konak hücre yüzeyine tutunmadan sorumludur. Pili aynı zamanda bakteriyofajlar için reseptör görevi görür (Bradley ve Pitt 1974). Pili, *pilA* geni tarafından kodlanan ve pilin olarak adlandırılan 15-18 kDa'luk homopolimerlerden oluşan uzun polar filamentlerdir. PilA öncelikle prepilin olarak sentezlenir ve taşınması sırasında pilin alt ünitesini oluşturmak üzere işlenir. Kesildikten sonra yeni oluşan N-ucundaki ilk peptit metillenir (Bradley 1980).

*P. aeruginosa*'da bulunan Tip IV pili, titreme olarak adlandırılan twitching hareketini sağlar (Şekil 2.8). Titreme hareketi QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Tip IV pili, kolonizasyon sırasında konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak patogeneizde de önemli rol oynar (Darzins 1993, Glessner ve ark. 1999, Deziel ve ark. 2001).



**Şekil 2.8.** Tip IV pili ve titreme (Patriquin ve ark. 2007)

### 2.2.1.3. Hareketlilik

Hareketlilik, bakterinin simbiyotik ve patojenik özelliklerini göstermesi için gerekli bir fonksiyondur. Hareket yeteneği sayesinde bakteri besin elemanlarına ulaşır, toksik maddelerden kaçır, konak hücrelerine translokasyon yapar, oluşturduğu koloni içerisinde yer değiştirir, biyofilm içinde hareket eder (Toutain ve ark. 2005).

Hareket bakteri fizyolojisinde oldukça ilginç ve önemli bir yer tutar. Bakteri hareketliliği ile ilgili çalışmalar kayma, yüzme ve titreme olarak üç farklı tip hareket olduğunu göstermiştir (Rashid ve Kornberg 2000). Bu üç hareket tipinden yüzme ve kayma flagella bağımlı, titreme ise tip IV pili bağımlıdır. *P. aeruginosa*'nın hücre

yüzeysel elamanlarından olan flagella bakterinin sıvı ortamdaki yüzme hareketinden sorumludur. Flagella aynı zamanda kayma hareketinden de sorumludur. Hareket etme yeteneğine sahip bakterilerin sıvı ortamda yer değiştirmeleri flagellalarının dönerek hareket etmesi ile olur. *P. aeruginosa* tek polar flagellası ile sıvı ortamda yüzer (Doyle ve ark. 2004). *P. aeruginosa*'nın katı yüzeydeki ilerlemesi titreme hareketi ile olur. Tip-IV pili ile sağlanır. Titreme hareketi sırasında pilus uzayarak yüzeydeki bir noktaya tutunur. Daha sonra kısalarak bakteriyi o noktaya doğru çeker ve hücrenin yüzey üzerinde ilerlemesi sağlanır. Pili aynı zamanda epitelyal yüzeye yapışmakta da önemlidir, böylece virulansa katkıda bulunur (Mattick 2002, Patriquin ve ark. 2007). Bakterinin yarı katı yüzeyde ilerlemesi kayma hareketi ile olur. Kayma hareketi yapan hücrelerin boyu normal haline göre uzar ve flagella yapısı değişir. Normal şartlarda tek polar flagellası olan *P. aeruginosa* kayma hareketi yaparken çift polar flagellaya sahiptir (Shrout ve ark. 2006).

### **2.2.2. Hücre dışına salgılanan virulans faktörleri**

*P. aeruginosa* çok sayıda salgı sistemine sahiptir. Bu sistemler sayesinde hücre dışına salgıladığı virulans faktörleri, bakterinin çevreye adaptasyonunda ve patojenliğinde oldukça yarar sağlar (Wiener-Kronish ve Pittet 2011).

#### **2.2.2.1. Ekzoproteazlar**

*P. aeruginosa* proteazları, mikroorganizmanın patogeneğinde rol oynayan en önemli ve en iyi bilinen virulans faktörlerindedir. Morihara ve Tsuzuki (1977) *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan proteazları tanımlamıştır.

##### **2.2.2.1.1. Elastaz**

Elastaz, 39.5 kDa molekül ağırlığında ve nötral pH'da aktif olan bir metalloproteazdır. Aynı zamanda, elastini parçalayabilen LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) olarak etkisini gösteren enzimdir. *P. aeruginosa* elastolitik aktivitesinin tümünü 4 gen (*LasA*, *LasB*, *LasR* ve son zamanlarda bilinen *rhlR*) ile yerine getirir.

*LasA* ve *LasB* genlerinin ekspresyonu *LasR* ve *rhlR* genleri tarafından kontrol edilir. Ayrıca *LasR* ve *rhlR* genleri *P. aeruginosa*'nın kendi indüksiyonunu cevaplayan düzenleyici sistem üyesidirler.

*P. aeruginosa*'nın yapısal *LasB* geni 22 kDa büyüklüğünde bir proteindir. *LasA* elastini parçalayarak, *LasB* elastaz, alkali proteaz ve nötrofil elastaz gibi diğer proteazlara karşı duyarlı hale getirmektedir. Elastin içerisinde bol miktarda Gly-Gly peptit bağlarının *LasA* tarafından ortadan kaldırılmasıyla elastolitik aktivitenin daha da arttığı düşünülmektedir. Elastaz aktivitesi, ağır metal iyonları ve çinko varlığında inhibe olabildiği gibi, proteinaz inhibitörlerinden olan plazma, alfa makroglobulin ve fosforamidon varlığında da inhibe olur. Ayrıca ortamda demir konsantrasyonunun artmasıyla birlikte elastaz aktivitesi de azalmaktadır (Pollack 1995, Coin ve ark. 1977).

Elastaz, elastin ve kollajen gibi ökaryotik proteinleri parçalayan ve insanlarda immunoglobulin G hücrelerini inaktive eden bir metalloproteazdır (Hamood ve ark. 1996). Elastaz *LasB* geni tarafından kodlanır. *LasB* geni, *LasR*-*LasI* çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki *LasR* regülatörü tarafından kontrol edilir (Seed ve ark. 1995). Elastazın, *P. aeruginosa*'nın patojenitesine, önemli katkısı olduğu hayvanlar üzerinde yapılan çalışmada belirtilmiştir. *LasB* elastaz ya tek başına ya da *Pseudomonas* tarafından üretilen proteazlar ile birlikte çalışarak biyolojik olan birçok substratı parçalar ya da inaktive eder (Nicas ve Iglewski 1985).

#### **2.2.2.1.2. *LasA* proteaz**

*Pseudomonas*lar tarafından *LasA* proteaz, *LasA* tarafından kodlanan 41 kDa'luk prekürsör olarak sentezlenir ve 22 kDa ağırlığında aktif proteinin oluşumunda kullanılır (Nicas ve Iglewski 1985). *LasA*, 22 kDa ağırlığında, çinko içeren bir metalloproteazdır. Ayrıca bir ekstraselüler serin proteazıdır. *LasA* elastindeki Gly-Gly-Ala zincirindeki Gly-Ala köprülerine bağlanarak elastolitik etki yapar. Elastin yanında fibrin ve kolajeni de hasara uğratar. Kendisi elastolitik aktiviteye sahip olduğu gibi elastaz ve diğer proteinazların elastolitik etkisini artırır. Elastaz ile sinerjistik olarak çalışır (Grande ve ark. 2007).

LasA aynı zamanda stafilolitik proteazdır ve *S. aureus* hücrelerini lizise uğratar. Bunun için peptidoglikan duvarındaki pentaglisin köprülerine bağlanarak stafilolitik aktivite gösterir. Bu özellik lasA aktivitesini göstermekte kullanılır. Elastaz geni (*LasB*), *LasA* geni LasR-LasI sistemi ile düzenlenir. LasR; *LasB*, *LasA*, alkali proteaz genlerini ve ekzotoksin A üretimini regüle eder. Bu genler QS sisteminde görevli genlerdir. Diğer QS genleri ise RhlR-RhlI sistemi olup, elastaz salgılanması kadar alkali proteaz, hemolizin, piyosiyenin salgılanmasıyla da ilgilidir (Brint ve ark. 1995).

İnsan proteinleri; elastin, kollajen tip-III ve tip IV, laminin, IgA ve G ,  $\alpha$ 1-antiproteinaz elastaza hassastır. Elastaz ve LasA'nın sinerjik çalışmasıyla oluşan doku hasarı bakterinin doğal bariyerleri aşmasını sağladığı gibi organ yetmezliklerine de sebep olur. Elastinin parçalanması ile bağ dokusunu zayıflatır. Bunun sonucunda örneğin korneada ülserler oluşur, nekrotik cilt infeksiyonları gelişir, yanık alanında nekroz görülür. Bazal membran yapısındaki elastinin parçalanması ile bütünlüğü bozularak epitelyal bariyer zedelenir (Cowel ve ark. 2003).

### **2.2.2.1.3. Alkali proteaz**

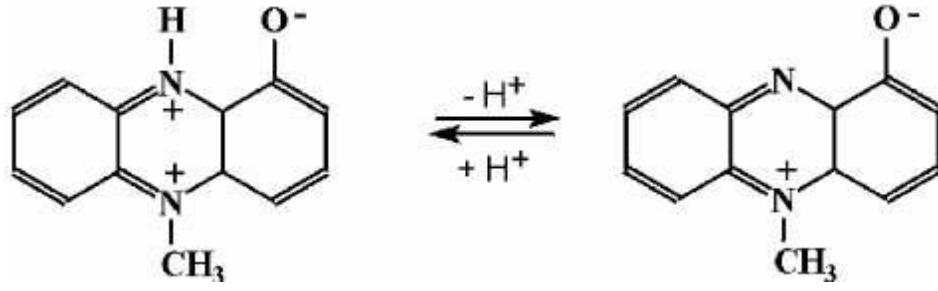
Alkali proteaz, 48 kDa molekül ağırlığında ve pH 8-9'da iyi etkisini gösterir. Alkali proteaz, insanlarda T hücrelerinin gamma interferon oluşturmasını inhibe eder. Aynı zamanda daha önceden oluşan gamma interferonun antiviral aktivitesini de azaltabilir. Bu enzim kollogen, laminin A, polipeptiti parçalar. Bu enzim dokularda hasara neden olurken bakterinin ihtiyaç duyduğu besin maddelerini de sağlayarak *Pseudomonas* infeksiyonlarının yayılmasına sebep olurlar (Moriyama ve Tsuzuki 1977, Pollack 1995).

Alkali proteaz, fibrinoliz özellikte bir metalloproteazdır ve apr geni tarafından kodlanır. Akut akciğer harabiyetinde, erken evrede, alveoller içerisinde oluşan fibrinin alkali proteaz tarafından eritilmesinin, infeksiyonun ilerlemesinde rol oynadığı belirtilmiştir. Alkali proteazın kornea infeksiyonlarında önemli rolü bilinmesine rağmen, hastalığın yayılmasında ve sistemik hastalıklarda rolü üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Karatuna ve Yağcı 2008).

Alkali proteaz ve elastaz enzimlerinin immünsüpressif etkileri vardır. Yardımcı T lenfositlerinin yüzeyinde bulunan CD4 reseptörlerini parçalayarak antikorların bu reseptörlere bağlanmasını inhibe ederek infeksiyonun yerleşmesine neden olmaktadır (Pollack 1995). Alkali proteaz fibrin formasyonuna engeleyerek fibrini lize eder. Elastaz ve alkali proteaz, elastin ve fibrinin meydana getirdiği diğer destek yapıları ile kornea yapılarını tahrip ederler. Ayrıca tümör nekroz faktörlerini ve gamma interferonu birlikte hareket ederek inaktive ettikleri bildirilmiştir (Delden ve Iglewski 1998, Todar 2002). *Pseudomonas* bakterilerinin yayılmasında, elastaz ve alkali proteaz oldukça önemli virulans faktörleridir. Elastaz kollajeni, IgA, IgG ve komplementi parçalar ve solunum sisteminde epitel hücreleri bozarak siliar fonksiyonlara engel olur. Ayrıca fibronektini lize ederek akciğer mukozası üzerinde yer alan ve yapışmada rolü olan reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar (Delden ve Iglewski 1998, Todar 2002).

#### **2.2.2.2. Piyosiyenin**

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyal kolonilere mavi-yeşil renk veren piyosiyenin (N-metil-1-hidroksifenazin) pigmentini üretirler (Şekil 2.9) (Denning ve ark. 1998). Piyosiyenin mavi renkli, kloroformda eriyen bir pigmenttir. *P. aeruginosa* tarafından üretilir, bakterinin fizyolojisinde ve patojenezinde önemli rol oynarken, oluşturduğu mavi renkte tanı konmasında kolaylık sağlar (Mavrodi ve ark. 2001). *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyenin molekülü, önemli patojenite faktörlerinden birisidir ve üretimi çevreyi algılama sisteminin kontrolü altındadır (Fuqua ve ark. 2001). Bu molekül birçok bakteri türüne karşı antibiyotik özelliği göstererek, *P. aeruginosa*'nın bulunduğu ortamda rekabet şansını artırır (Hassett ve ark.1992).



**Şekil 2.9.** *P. aeruginosa* 'nın ürettiği piyosiyanın molekülü a) nötr veya bazik pH'ta zwitteriyon olarak davranır ve mavi renklidir b) asidik ortamda ise kırmızı renklidir.

Piyosiyanın, N-metil-1-hidroksifenazinin ve iki elektron alarak redüksiyona uğradığında renksiz lökopyosiyanine dönüşür. Redüksiyon kapasitesi olduğu için *P. aeruginosa* metabolizmasında solunum için gereklidir (Britigan ve ark. 1999). Piyosiyanın *Pseudomonas* metabolizmasındaki bir diğer rolü bakterinin dış ortamdan demir iyonu almasını kolaylaştırmasıdır (Buckling ve ark. 2007). Demir bu bakterinin üremesi için gereklidir. Konakta demir çoktur fakat ulaşılamayacak şekilde hücre içinde; çözünemeyen hidroksit, karbonat, fosfat ile ferik formunda bulunur. Konak demir metabolizması bakterinin üremesi için gerekli demir kaynağını sağlamaz. Demir kullanımı için *P. aeruginosa*, piyoselin ve piyoverdin sideroforlarını kullanır. Sideroforlar; bakteri hücrelerine demir sağlayan küçük ligantlardır. Bu sideroforlar dış ortamdaki demir iyonunun hücre içine alınmasını sağlar, ancak konakçı organizmanın en önemli demir kaynağı olan transferrinden demir iyonu almakta yeterli olmaz. Piyosiyanın redüksiyon yeteneği olan bir molekül olarak transferrinden demiri ayırma özelliğine sahiptir. Bu olayda ilk reaksiyon piyosiyanınin lökopyosiyanine redüksiyonudur. İkinci reaksiyon lökopyosiyanın tarafından  $Fe^{+3}$ 'ün redüksiyonudur. Üçüncü reaksiyon demir iyonunun transferrinden ayrılması ve sideroforlar aracılığı ile *P. aeruginosa*'ya alınmasıdır. Kültür ortamında piyosiyanınin redüksiyonu oluşmuş olan mavi rengin açılması ile gözlemlenir. Renksiz olan lökopyosiyanınin hem oksijen hem de  $Fe^{+3}$  ü redükte eder (Vasil ve Ochsner 1999).

Piyosiyanın bakteri metabolizmasındaki bu önemli rolü yanında sitotoksik özelliği ile de virulansa katkıda bulunur. Piyosiyanınin ökaryot hücrelerde hücre solunumunu engellediği, silia aktivitesini bozduğu, epitel hücresi ve lenfosit proliferasyonunu inhibe

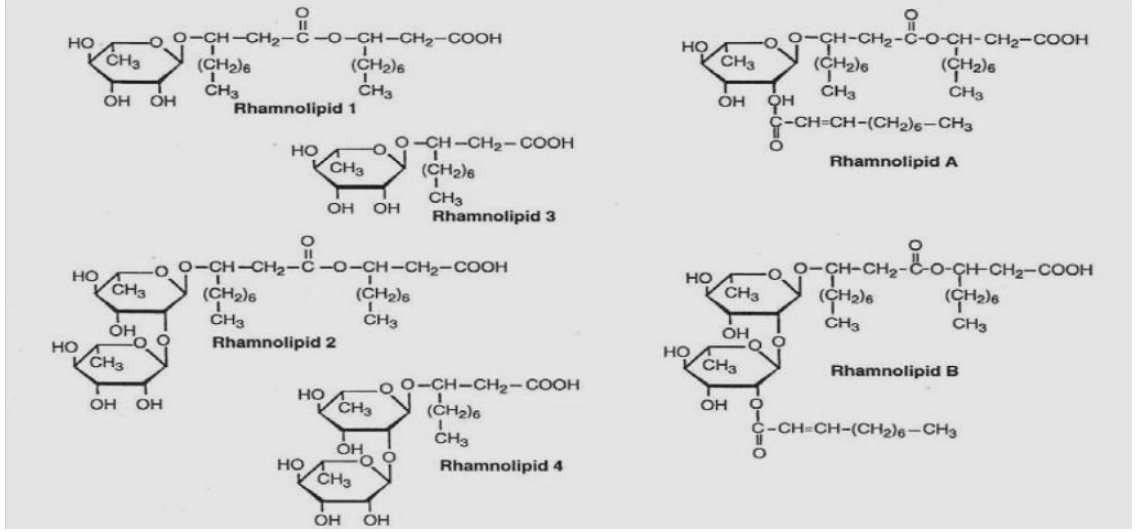
ettiği gösterilmiştir (Lau ve ark. 2004). Piyosiyanın otooksidasyon yaparak serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açmakta ve böylece sitotoksik etki göstermektedir. Yapılan in vitro çalışmalar, piyosiyanınin kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde oldukça fazla hücresel hasara neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu molekül insan hücrelerinde hücresel solunumun, epidermal hücre büyümesinin engellenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir (Denning ve ark. 1998). Bu molekülün konak hücreye sitotoksitesi genellikle redoks döngüsünün potansiyeliyle güçlü bir şekilde ilgilidir. Elektronları doğrudan NADH veya NADPH moleküllerinden alır ve aerobik koşullarda bu elektronları, reaktif oksijen türevleri (ROS) süperoksit ( $O^{\cdot -2}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumuna yol açan  $O_2$  molekülüne aktarır (Griffith 1999). Yine piyosiyanın epitel hücrelerinde katalaz aktivitesini inhibe ederek akciğerde oksidatif hasara neden olur.

Pek çok memeli hücresi radikal oksijen türevlerinin oluşmasını sınırlayacak birkaç tipte mekanizmaya sahiptir. Bu moleküllerin oluşumunu engellemek için kullanılan hücresel moleküllerden birisi glutatyondur. Ancak piyosiyanın glutasyonun aktivitesini inhibe eder.

### 2.2.2.3. Ramnolipid

*P. aeruginosa* belirli çevresel koşullar altında ramnolipid olarak adlandırılan, hidrofilik kısmı bir veya iki ramnoz molekülü içeren ve hidrofobik kısmı yağ asidi yapısında olan biyosümfaktan üretir. Bunlar ramnolipid I, Ramnosil-L-ramnosil-B-hidroksi-dekanoil- $\beta$ -hidroksi-dekanoat (mono ramnolipid) ve Ramnolipid II ise ramnosil-ramnosil- $\beta$ -hidroksidekanoil- $\beta$ -hidroksi-dekanoat (diramnolipid) şeklindedir. Bunlar dışında Syldatk ve Wagner (1987) tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli karbon kaynaklarında *P. aeruginosa* tarafından sentezlenen ramnolipit biyosümfaktanların ramnolipit-1 (RhC10C10), ramnolipit-2 (RhC10), ramnolipit-3 (Rh2C10C10) ve ramnolipit-4 (Rh2C10) şeklinde sınıflandırılabilceğini bildirmişlerdir (Şekil 2.10).





**Şekil 2.10.** *P. aeruginosa* tarafından sentezlenen R1, R2, R3 ve R4 ramnolipitlerin moleküler yapıları (Lang ve Wullbrandt 1999).

Ramnolipidler yüzey gerilimini azaltıcı özelliklerinden dolayı, endüstriyel ve çevreyle ilgili pek çok alanda kullanılmaktadır. Bunlar arasında hidrokarbonlar gibi düşük çözünürlüğe sahip kirleticilerin uzaklaştırılması ya da biyodegradasyonunun artırılması sayılabilir (Maier ve Chavez 2000).

*Pseudomonas* ' ların ürettiği bu molekül, diğer birçok bakteri için antibakteriyel özellik göstererek buldukları ortamda bu bakterilere avantaj sağlar. Ramnolipidler, konakta, akciğer yüzeyindeki fosfolipidleri çözerek *P. aeruginosa* tarafından üretilen fosfolipaz C molekülünün etki etmesini kolaylaştırırlar. Ayrıca bu bakterilerin kayma hareketinin (Kohler ve ark. 2000, Deziel ve ark. 2003) ve biyofilm oluşturmalarının da (Deziel ve ark. 2003) ramnolipid üretimiyle yakından ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Ramnolipidler de ekzopolisakaritler (EPS) gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen ve üreticilerine çeşitli avantajlar sağlayan şeker içerikli polimerlerdir (Moraes ve ark. 2002, Rocha ve ark. 2006). Ramnolipidlerin mikrobiyal üremenin gelişme, durgun ve ölüm fazlarında sentezlendiği belirtilmektedir (Guerra ve ark. 1986). Bunlar, hücre duvarının yapısında buldukları zaman hidrokarbonlu bileşikleri periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmaları, ekstraselular olarak salındıklarında ise hidrokarbonlu

bileşikleri emülsifiye etmeleri ile özellikle çevre kirliliğinin kontrolünde önemli rol alan biyosürefektanlardır (Patel ve Desai 1997). Ramnolipid biyosürefektanları, kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirlenmeyi azaltan maddelerin parçalanmasını arttıran ve çevrenin kendi kendisini yenilemesini sağlayan bileşikler olduğu belirtilmiştir (Bonilla ve ark. 2005).

### **2.3. *Pseudomonas* ve Biyofilm**

Mikrobiyal hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskopik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 µm yükseklikte koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz ve giderilmesi çok zor olan yapıya biyofilm denir (Donlan 2002).

Biyofilmin en yeni tanımı ise mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu hücre dışı polimerik madde (EPS) oluşmuş matriks şeklindedir (Donlan 2002).

#### **2.3.1. Biyofilm yapısı ve oluşumu**

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Biyofilm, bakterinin yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarid bir matrikstir. Mikroskopik olarak incelendiğinde biyofilm; arasından kanalların geçtiği, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstraselüler yapıda toplanmasıyla, mercan kayalıklar benzeri yapı oluşturan ve bunun üzerindeki piramid veya mantar şekilli uzantılardan oluşan bir oluşum görünümündedir. Yapılan çalışmalarda matriksin yoğunluğu ve genişliğinin mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Allison 2003).

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür. Heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış oranı, farklı türlerin sayısı ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm kalınlığı laminer ve türbülant akış arasında maksimum seviyededir. Laminer alandaki kalınlık substrata ulaşabilirliğine, türbülant akışta ise aşınmaya bağlı olarak değişmektedir (Poulsen 1999). Son yıllarda bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından salınma ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen sunumunu düzenleyen moleküller (AHL vs.) aracılığı ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda quorum sensingin önemini çok artırmıştır (Stickler ve ark. 1998, Dong ve Zhang 2005).

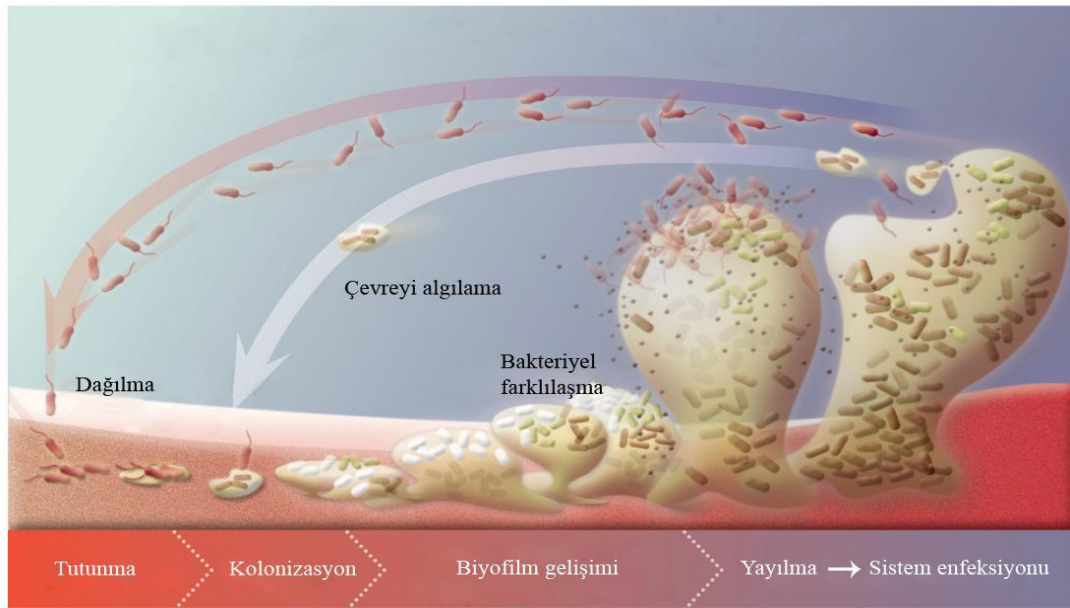
Biyofilm oluşumu ve bakterilerin biyofilme tutunması birkaç aşamada meydana gelir. İlkinde yüzey organik materyal ile kaplanır, bu yapışmanın ardından bakteri hücrelerinin transfer aşaması meydana gelir ve hücreler yüzeye transfer olur. Hücre ile tabaka arasında geri dönüşümsüz bağlar meydana gelir. Bakteriye EPS'ler organik filme tutunmak için aracılık eder, canlı veya cansız bir yüzeye bağlantıyı sağlarlar. Bakteri EPS'leri ile organik bileşimli film oluşur. Hücre yüzeyinin özellikleri, flagella, fimbria, içerip içermemesine ve pili durumuna bağlı olarak biyofilm miktarında değişiklik olabilir.

Yapılan çalışmalar sonucu yapısal olarak planktonik hücreden köken alan biyofilmin oluşum aşamaları şu şekildedir (Şekil 2.11) (Gonpot ve ark. 2000, Watnick ve Kolter 2000, Shirliff ve ark. 2002).

1. Tutunma yüzeyinin oluşumu
2. Öncü bakterinin tutunması
3. Sekonder kolonizasyon
4. Olgun biyofilm oluşumu
5. Kopma/Ayrılma

Biyofilmin oluşumu mikroorganizmaların hücrenin yüzeye yapışması ile başlayan aktif bir süreçtir. Çoğu hücre negatif yük taşımakta, bu da sıvı akışı ile şarj olan yüzeye yapışmayı kolaylaştırmaktadır. Fimbria ya da pilus gibi yapıların hücrelerin hidrofobik

özelliğinde kalmasına yardımcı olduğu hatta aynı çalışmada incelenen çoğu fimbria yapısının hidrofobik aminoasit kalıntılara sahip olduğu bildirilmiştir. Fimbrianın, yüzeye arada bulunan akıma karşı gelerek tutunmayı sağladığı bildirilmiştir (Bullitt ve Makowski, 1995). Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özelliğinde tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır. Yüzeye tutunan hücreler, bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır (Altun ve Şener 2008). Mikrokoloniler kolonizasyonla birlikte su ve besin maddesinin dağıtıldığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapı şeklinde olgun biyofilmleri oluştururlar. Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluşuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir (Altun ve Şener 2008).



**Şekil 2.11.** Biyofilm oluşumu (Costerton, 2002)

### 2.3.2. Biyofilm ve EPS

Biyofilm, temel olarak mikroorganizma ve ekstrasellüler polimerik substans (EPS) oluşur. EPS biyofilmdeki tüm karbonun yaklaşık % 50-90'ını oluşturur ve biyofilmin ana matriks kısmını oluşturduğu kabul edilir. Kimyasal ve fiziksel yapılanma olarak değişken olmakla birlikte temel olarak polisakkaritlerden oluşur. Bu polisakkaritlerin bir kısmı gram negatif bakterilerde olduğu gibi nötr ve polianyondur. Üronik asit (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asit gibi) veya keton bağlı piruvatların varlığı anyonik özelliği belirler. Bu özellik önemlidir. Çünkü kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonlarla bağlanmayı sağlar ki, bu da polimer zincirleri arasında çapraz bağlanma ile biyofilm içinde güçlü bağlanma oluşturur (Stewart 2003).

EPS yapısındaki hidrojen bağları ile çok miktarda suyu içinde tutabilir. EPS hidrofobik olabilir ancak çoğu tipi hem hidrofilik hem de hidrofobiktir. EPS'nin çözünürlüğü de değişkendir. EPS'nin iki önemli özelliğinin biyofilm üzerinde belirgin etkisi vardır. Birincisi polisakkaritlerin kompozisyon ve yapısı primer yapıyı belirler. İkincisi ise biyofilm yapısındaki EPS tek bir biçimde değildir ve 3 boyutlu yapı zaman içerisinde farklı konfigürasyonlarda görülebilir. EPS metal iyonlar, divalent katyonlar ve diğer makromoleküller (proteinler, DNA, lipidler gibi) ile birlikte olabilir. EPS üretimi ortamda besleyici elemanların durumundan etkilenir, karbon fazlalığına karşılık, nitrojen potasyum ve fosfatın azlığı sentezi artırır. Yavaş bakteri çoğalması da artırır. EPS yüksek su tutucu özelliği ile biyofilmin kurumasını önler. Antimikrobiyal rezistansa katkıda bulunabilir. Bunu muhtemelen ya antibiyotiklerin biyofilm içine transportunu engelleyerek ve/veya bu ajanları doğrudan bağlayarak yapar (Stewart 2003).

Ayrıca *P. aeruginosa*'nın ürettiği EPS'nin büyük kısmı alginattan oluşur. Alginat hücre adezyonunu sağlayan önemli bir moleküldür. Alginat liyaz ise alginat üretimini azaltarak hücrelerin biyofilmden ayrılmasına yol açar. Bu enzimi kodlayan *algL* geninin hücre ayrılması ile biyofilm yıkılmasına yol açtığı düşünülmektedir. Buna benzer polisakkarit üretiminde rolü olan enzimlerin biyofilm gelişiminin farklı dönemlerinde rol oynadığı düşünülmektedir (Sauer ve ark. 2002).

### 2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm ve quorum sensing ilişkisi

*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 enfekte olmuş kistik fibrozis hastalarının akciğerlerinde de biyofilm oluşturarak canlılıklarını devam ettirirler. Bakterilerin bu yapıyı oluşturması, bakteriyel antibiyotik direncini arttırması ve biyofilm üzerindeki bakterilerin konağın immün cevabından daha az etkilenmesi nedeniyle tıbbi açıdan önem taşımaktadır. Aerobik ortamlarda biyofilm oluşumunda *las* sistemi merkezi rol oynar. Yine bir biyosurfaktan olan ramnolipid üretimi de biyofilm oluşturulmasında önem taşımaktadır (Ulusoy 2007).

*P. aeruginosa*'nın hücre dışına salgıladığı birçok virulans etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun birbiri ile ilişkili *las* ve *rhl* olarak tanımlanan iki çoğunluğu algılama sistemi ile kontrol edildiği gösterilmiştir (Favre-Bonté ve ark. 2007). Bu sistemler; biyofilm oluşumu, elastaz (*LasA* ve *Las B*), alkali proteaz, ekzotokzin A, piyosiyenin, lektin, ramnolipid başta olmak üzere çeşitli virulans etmenlerinin üretimini kontrol etmektedir (Rumbaugh ve ark. 2000).

Bakteri mikroçevrede birikmeye başlayınca besin azlığı nedeniyle üreme yavaşlamaktadır. Olgun biyofilmlerde meydana gelen üremenin yavaşlaması, antibiyotiklere dirence neden olabilmektedir. Kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinden izole edilen *P. aeruginosa* virulans etmenlerinin çevre koşullarına göre düzenlendiği gösterilmiştir. Kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinin solunum yüzeylerinin düşük oksijen içermesi nedeniyle bu mikro çevrede oluşan *P. aeruginosa* biyofilmleri, aerobik koşullarda oluşan biyofilm yapılar için gerekli olan farklı genlerin aktivasyonu ile oluşmaktadır (Murray ve ark. 2007).

*P. aeruginosa* yavaş üreme evresinde, planktonik ve biyofilm hücrelerinin siprofloksasine eşit direnç gösterdiği görülmüştür. Ancak üreme hızı arttıkça, planktonik hücreler biyofilm hücrelerinden daha duyarlı hale gelmektedir. Bu sonuca

göre biyofilmin yapısal elemanlar ve üremenin yavaşlaması, biyofilmlerin neden olduğu dirençte oldukça önemlidir. Biyofilm hücrelerinin planktonik hücrelerden 15 kat daha fazla antibiyotik direnci kazandığı dönem, durağan dönemdir. Buna göre üremenin hızlanması direnç seviyeleri için bir göstergedir ve üremenin yavaşlaması da koruyucu bir etki gösterebilmektedir (Costerton 1999).

## **2.4. Quorum Quenching**

QS araştırmalarının en muhtemel yararı, mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulmasıdır (Uroz ve ark. 2009). Bu bağlamda bakteri hücreleri arasındaki iletişimin engellenmesi ile ilgili mekanizmalar Quorum Quenching olarak adlandırılmaktadır.

Bakteri hücresinde virulans genlerinin ekspresyonunun engellenmesi ve bu sayede bakteri virulansının azaltılması QS inhibisyonu ile mümkün olabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda QS inhibisyonu yeni antibakteriyel tedavi rejimlerinde önemli bir strateji olarak düşünöldüğünden, konuya ilişkin çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip kökenlerin artışı infeksiyonların tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bakterilerin birçok virulans 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 (Rasmussen ve Givskov 2006a).

### **2.4.1. Quorum quenching mekanizmaları**

Quorum quenching ile ilgili araştırmalar üç temel stratejide toplandığı görölmektedir:

- QS molekülünün sentezinin engellenmesi
- QS molekülünün yıkılması veya inhibisyonu
- QS sinyal alınımının önlenmesi (Rasmussen ve Givskov 2006a, Juhas ve ark. 2005).

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 (Parsek ve ark. 1999), bakteri üzerine etkileri *in vivo* çalışılmamıştır. Ayrıca bakteri metabolizmasında önemli görevler alan bu moleküllerin diğer hücre fonksiyonlarını nasıl etkileyeceği bilinmemektedir. Bununla birlikte gram negatif bakterilerde önemli bir sinyal molekülü olan AHL'nin sentezinde görevli bir enzimi inhibe eden triklosan dolayısıyla bu molekülün sentezini de engellemiş olur. Ayrıca bazı makrolit antibiyotiklerin de benzeri etkileri olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa* izolatlarında yapılan bir çalışmada, azitromisin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu azalttığı ve elastaz gen ekspresyonunu önleyerek enfeksiyonun şiddetini azaltarak alternatif bir tedavi yaklaşımı sağladığı gösterilmiştir (Tateda ve ark. 1996).

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) (Yates ve ark. 2002). Bir bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'nın patolojik etkilerinden korunmak amacıyla bu bakteri ile karşılaşan bitkilerin pH değerini artırarak bakteriye karşı korunma sağladıkları gösterilmiştir (Byers ve ark. 2002). Laktonoliz enzimler yardımıyla da gerçekleştirilebilir, örneğin *Bacillus* türlerinin AiiA adında bir enzim üreterek AHL'yi parçaladığı gösterilmiştir (Dong ve ark. 2000), bunun yanı sıra *P. aeruginosa* PAI-A, *Arthrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Rhodococcus sp.*'de de AiiA homologu enzim üretimi gösterilmiştir (Uroz ve ark. 2003, Huang ve ark. 2003, Park ve ark. 2003). İnsan solunum yolu epitel hücrelerinde de benzer bir enzimatik aktivite ile AHL moleküllerinin parçalandığı gösterilmiştir. 3oxoC12HSL'yi etkileyen bu aktiviteden C4HSL etkilenmemektedir (Chun ve ark. 2004).

Sinyalin yıkıma uğratılmasında gram negatif bakterilerde AHL inhibitörleri olan AHL laktonaz ve AHL açılaz S52 enzimleri, gram pozitif bakterilerde protein kinaz inhibitörleri olan closantel ve RWJ-49815'in etkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve Dong 2004).



QS sinyal moleküllerinin engellenmesi ile ilgili diğer bir yaklaşım da bakteriler tarafından algılanan sinyallerin alınımının önlenmesidir. Bu da reseptör protein-LuxR homologların ya yok edilmesi ya da bloke edilmesiyle gerçekleştirilebilmektedir. Çevreyi algılama sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla sinyal reseptör proteinlerinin ya da AHL analogları aracılığıyla reseptöre bağlanmanın azaltılması da üçüncü mekanizma olarak denenmektedir. Bir kırmızı makro alg olan *D. pulchra*'nın ürettiği ve veziküllerinde depolamış olduğu furanon bileşikler yapısal olarak AHL sinyal analogu olup LuxR proteinine bağlanarak AHL'nin ayrılmasına neden olduğu ve böylece *V. fisheri*'nin tedavisinde bakteriyel çevreyi algılamayı inhibe ettiği bildirilmektedir (Zhang ve Dong 2004).

#### **2.4.2. Quorum sensing inhibitörleri**

Çoğu patojen bakteri, virulans faktörlerin ifadesi için çevreyi algılama sistemini kullanır. Örneğin; *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi tarafından düzenlenen gen ifadesi, bu bakterinin antimikrobiyallere karşı toleransına ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. Laboratuvar şartlarında, çevreyi algılama sistemi, sinyal moleküllerinin alınımını etkili bir şekilde engelleyen, yeni bir sınıf antimikrobiyal ilaç geliştirmek için yeni bir hedefdir. Hem doğal hem de sentetik orijinli kimyasal kütüphanelerle, tanımlanmış olan birkaç çevreyi algılamayı engelleyici bileşenin, hayvanların akciğerlerinde meydana gelmiş olan infeksiyonu yok ettiği ispat edilmiştir. Buna ilaveten, bakteriyel çevreyi algılama sinyal moleküllerini inaktive eden birkaç enzim tanımlanmıştır. Bu inaktivasyonun birkaç modelde, bitki patojenlerinin çevreyi algılama kaynaklı virulansı bloke ettiği de bulunmuştur (Rasmussen ve Givskov 2006b).

Çevreyi algılama sisteminde engelleyiciler, bitki ve mantar gibi kaynaklardan izole edilebilir. Hem bitkiler hem de mantarlar milyonlarca yıldan beri çevreyi algılama sistemini kullanan bakterilerle işbirliği içindedirler. Bu mantar ve bitkilerin, çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşenleri üreterek, bu bakterilerin hastalık oluşturmalarını, kolonize olmalarını ve bulaşmalarını azalttıkları görülmüştür (Rasmussen ve Givskov 2006a).

#### 2.4.2.1. Doğal ve sentetik inhibitörler

Doğal bileşiklerin quorum sensing inhibitör etkisini gösterebilmek için bitkiler ve mantarlar üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Birçok bitkide (sarımsak, havuç, soya fasulyesi, bezelye, vanilya ekstresi, nilüfer çiçeği, domates) QS inhibitör etkisi belirlenmiştir. Çeşitli araştırmalarla balın antiQS aktivitesi olduğu belirlenmiştir (Truchado ve ark. 2009a, Truchado ve ark. 2009b,). Bazı *Penicillium* türleri tarafından üretilen patulin ve penisillik asidin quorum sensing üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Rasmussen ve ark. 2005).

Martinelli ve ark. (2004), bir seri furanon bileşenleri ile yaptıkları çalışma sonucunda, furanon 12'nin N-açıl-homoserin lakton aktivitesini stimüle ettiğini ve viyolasin üretimini azalttığını bulmuşlardır. *D. pulchra*'dan elde edilen halojenlenmiş furanonlar, etkili bir N-açıl-homoserin lakton antagonisti olarak tanımlanmıştır.

Rasmussen ve ark. (2006a), burçak, havuç, soya fasulyesi, nilüfer, domates, bezelye tohumları, biber ve sarımsağın da çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşikler ürettiğini bulmuşlardır. Ayrıntılı incelendiğinde sarımsak ekstraktının 3 farklı çevreyi algılama engelleyicisinin olduğu saptanmıştır. Bunlardan birisi siklik disülfür bileşenidir. Bu çevreyi algılama engelleyicisi LuxR temelli güçlü bir antagonist olarak kullanılacağını ileri sürmüşlerdir.

Boşgelmez-Tınaz ve ark. (2006), *Scorzonera sandrasica* bitkisinin *C. violaceum* 026, *C. violaceum* 12472 ve *E. carotovora*'da çevreyi algılama ile düzenlenen aktiviteleri engellediğini saptamışlardır. *S. sandrasica*'dan elde edilen bileşenlerin *E. carotovora*'da, çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen, karbapenem antibiyotiği üretimini engelleyebildiğini göstermiştir. Böylelikle bitki hastalıklarına sebep olan bu fitopatojenlerin kontrol altında tutulmasına olanak sağlanabileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Singh ve ark. (2008), akasya (*Acacia nilotica*) bitkisinin yeşil kabuklarının anti quorum sensing ve antioksidan özelliğini çalışmışlardır. Bu ekstraktların fenolik değerlerini ve miktarlarını HPLC ve MS gibi yöntemlerle belirlemişlerdir.

Girennavar ve ark. (2008), yaptıkları çalışma ile greyfurt suyundan elde ettikleri ve kanın pıhtılaşmasını önleyen furokumarin denen madde ile *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*'da biyofilm oluşumunu engellemişlerdir.

Truchado ve ark. (2009), farklı floradan ve coğrafik bölgeden 15 çeşit balın *C. violaceum* CECT 494 suşuna etkisini araştırmışlardır. Bal konsantrasyonlarının azalmasına bağlı olarak anti quorum sensing etkisinin azaldığını en düşük konsantrasyonda bile etkili olduğunu göstermişlerdir. Kestane ve ıhlamur ağacından elde edilen balın yüksek oranda inhibitör aktivitesi gösterdiğini, biberiye ve portakal balının daha düşük inhibe edici etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Bodini ve ark. (2009), *Agrobacterium tumefaciens*, *C. violaceum* ve *P. putida* suşlarında sarımsağın QS mekanizmasını inhibe ettiğini ortaya çıkarmışlardır. Fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğunu belirtmişlerdir. Sarımsak ekstraktlarının QS reseptörleri LuxR, AhyR, TraR karşı antagonist etkisi olduğunu açıklamışlardır.

Szabo ve ark. (2010), disk difüzyon yöntemiyle portakal, ardıç, gül, lavanta, geranium (turnagagası), okaliptus, citrus (narenciye) yağlarının *C. violaceum* 026 suşunda quorum sensing mekanizmasına etkisini incelemişlerdir. Test sonucunda gül, geranium, lavantanın önemli bir quorum sensing inhibitörü olduğunu; okaliptus ve sitrus yağlarının pigment üretimini azalttığını; papatya, portakal, ardıç yağlarının etkisiz olduğunu göstermişlerdir.

Sentetik kimyasal kütüphanelerin yapısı yan zincirdeki karbon sayılarının değiştirilmesi ile türetilen AHL moleküllerinden oluşmaktadır. Düz veya düz olamayan karbon atom sayıları QSI aktivitesine sahip değildir. Buna karşın, bileşiklerin çoğu yarışmalı antagonisit olarak sınımlanmaktadır (Schaefer ve ark. 1996). Antagonisit AHL analoglarının diğer grubu yan zincirdeki en dıştaki karbon atomları üzerine siklik ya da asiklik alkil

substituent taşımaktadır. Aynı zamanda, yan zincirdeki C-3 atomunun sülfür ile değiştirilmesiyle hem LuxR hem de LasR kontrolündeki QS reporterlerin ekspresyonunu bloke edecek analoglar da yaratılabilmektedir (Persson ve ark. 2005). QSI bileşikleri yan zincirin sonundaki (3oxoC6HSL/LuxR kontrolündeki sisteminde en azından) aril substituentlerin yer değiştirilmesiyle de elde edilmektedir. Eğer substituentlerin boyutu fenil grubunun ötesinde artırılırsa, antagonistik etkilerini kaybetmektedirler. Çünkü siklik alkiller ve aril substituentler minimaldir. Aril bileşikler LuxR protein içindeki aromatik amino asitler ile etkileşime girebilmekte, normal aktivitelerini önlemektedir (Reverchon ve ark. 2002). Aril AHL'lerin QS etkisi yan zincirin C-1 karbonil grubu ile bir sülfonil grubun yer değiştirmesi ile daha da artırılabilir (Castang ve ark. 2004).

Çeşitli QSI molekülleri tanımlanmıştır. Bunların arasında 4-nitro-piridin-N-oksidi (4-NPO), indol, p-benzoquinon, 2,4,5-tribromoimidazol, indol ve 3-nitrobenzen sulfonamid gibi moleküller bulunmaktadır. 4-NPO 'nun oldukça etkili olduğu gözlemlenmiştir. DNA microarray tabanlı transkriptomik çalışmalar bu bileşiğin *P. aeruginosa*'daki genlerin ekspresyonunu %37 oranında azalttığı bulunmuştur (Rasmussen ve ark. 2005).

Ayrıca sentetik bir furonon olan C-30'un *P. aeruginosa*'daki çevreyi algılamayı AHL sinyali ile yarışa girerek inhibe ettiği fare modelinde akciğerlerde bakterinin persistansına engel olduğu gösterilmiştir (Hentzer ve Givskov 2003).

#### **2.4.2.2. Quorum quenching enzimleri**

##### **2.4.2.2.1. AHL laktonaz**

N-açil-L-homoserin lakton (AHL laktonaz) metallo- $\beta$ -laktamaz süperfamilyasının bir üyesidir. Bu familyadaki enzimlerin birçok fonksiyonunun olduğu bulunmuştur. Nitrit oksidaz, oksijen redüktaz, C-O, C-N, C-S, S-O, P-O gibi bağların parçalanması gibi görevleri bulunmaktadır. Bu proteinlerin çoğu anti-kanser ilaçların detoksifikasyonu, mRNA prosesing ve antibakteriyal rezistans mekanizmalarının anlaşılması açısından önemlidir. Bu enzimlerin aktif bölgesindeki metal merkezler farklıdır. Sekans

benzerlikleri sınırlı olmasına rağmen bu enzim glioksilaz II ve RNaz Z proteinleri ile benzer yapısal özelliklere sahiptir. Yapılan deneysel çalışmalarda bu enzimin katalitik bölgesinde iki çinko iyonunun bulunduğu görülmüştür. Gram negatif bakterilerdeki QS iki komponentten oluşmaktadır. AHL sentaz oluşturan LuxI proteini ve AHL reseptörü ve transkripsiyonel regülatör olarak fonksiyon gösteren LuxR proteinleri. LuxR ve luxI proteinlerin yapısal karakterleri analiz edilmiştir. Son zamanlarda bir *Bacillus* türünden elde edilen AHL laktonaz enziminin AHL'nin homoserin lakton halkasındaki ester bağlarını hidrolize etmektedir. Bu sadece gram negatif bakterilerdeki QS engellenebilmektedir (Thomas ve ark. 2005). Bu enzimdeki korunmuş sekans motifi  $^{104}\text{HXHXDH}^{109} \sim \text{H}^{169}$ , glioksilaz-II ve arilsülfataz enzim familyası,  $\beta$ -laktamaz, ve RNaz Z gibi enzimleri içeren çeşitli metallohidrolazların  $\text{Zn}^{+2}$  bağlanma motifleri ile benzerlik göstermektedir. AHL birçok ökaryotik hormonlarla benzer yapısal özellik göstermektedir (Dong ve ark. 2000).

#### **2.4.2.2.2. AHL açılaz**

*Variovorax paradoxus*, *P. aeruginosa* PAO1 ve *Streptomyces sp.*'nin de içinde bulunduğu çeşitli bakteri türlerinin AHL-açılaz enzimine sahip olduğu bulunmuştur. Bu enzim AHL'deki amid bağının hidrolizi, yağ asitleri ve homoserin laktone karşılık olarak üretilmesiyle ahl moleküllerini degrade etmektedir. Şu ana kadar üç AHL açılaz enzimi tanımlanmıştır. Bunlar: *Ralstonia sp.* XJ12B'deki (Lin ve ark. 2003), *P. aeruginosa* PAO1'deki PvdQ (Huang ve ark. 2003) ve *Streptomyces sp.*'deki AhlM (Park ve ark. 2003)'dir. Bu enzimler a subünit, spacer sekans ve b subüniti izleyen bir sinyal peptidinin içerildiği Ntn hidrolazın bilinen karakterlerini paylaşmaktadır. Buna karşın bu enzimler arasında dikkate değer farklılıklar da bulunmaktadır. AiiD AHL uzun zincirleri ve daha az etkinlikte de olsa kısa zincirleri parçalamaktadır (Lin ve ark. 2003). PvdQ, sekiz karbondan daha kısa AHL açıl zincirlerini parçalayamamaktadırlar (Huang ve ark. 2003). Benzer şekilde AhlM yalnızca sekiz karbondan daha kısa AHL'leri parçalayabilme aktivitesine sahiptir (Park ve ark. 2005). Ayrıca AiiD penisilin G and amfisilini parçalayamamaktadır (Lin ve ark. 2003). Bu üç AHL açılaz enzimi *Pseudomonas diminuta*'da bulunan sefalosporin açılaz (CAD) ile benzer yapıya sahiptir (Lin ve ark. 2003, Park ve ark. 2005).

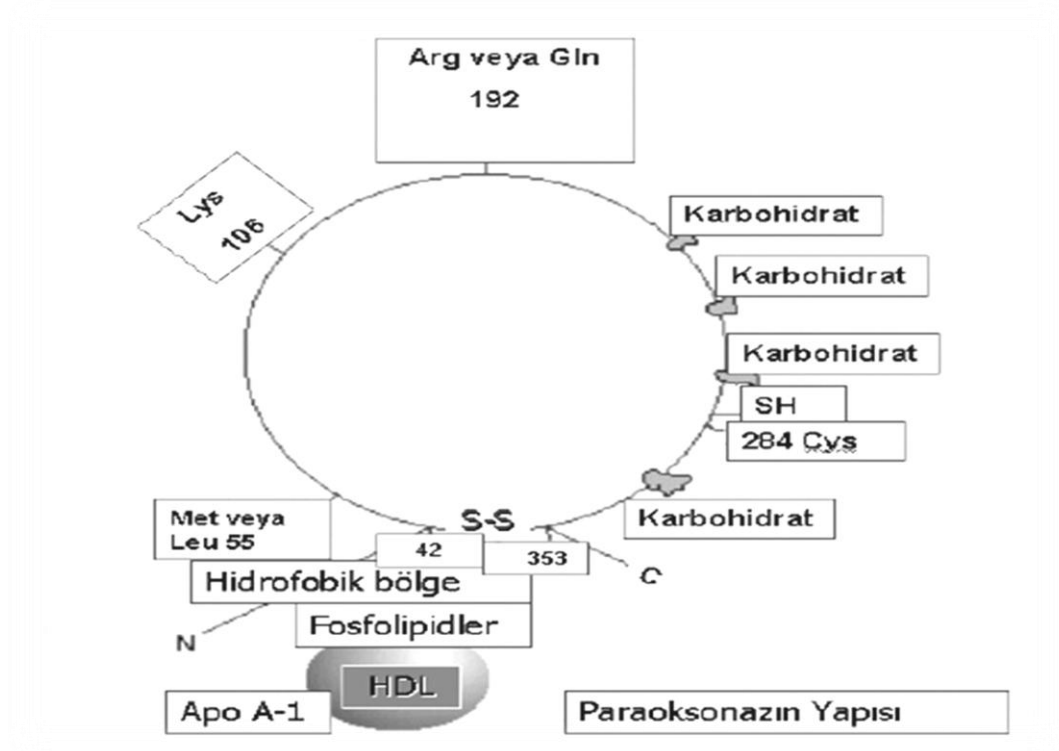
### 2.4.2.2.3. Paraoksonaz

Paraoksonaz (PON), hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (arildialkil fosfataz; organofosfat hidrolaz; paraokson hidrolaz; E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır (Gan ve ark. 1991).

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan PON proteinleri, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir. Memelilerde, en azından insanlarda ve farelerde, aynı kromozom üzerinde birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON1, 2, 3) bulunmaktadır (Durrington ve ark. 2001). 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 (Mackness ve ark. 1998, Ali ve ark. 2003, Lu ve ark. 2006). Farelerde 6. kromozom üzerinde yerleşen PON genlerinin, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde lokalize oldukları bildirilmektedir (Hegele 1999).

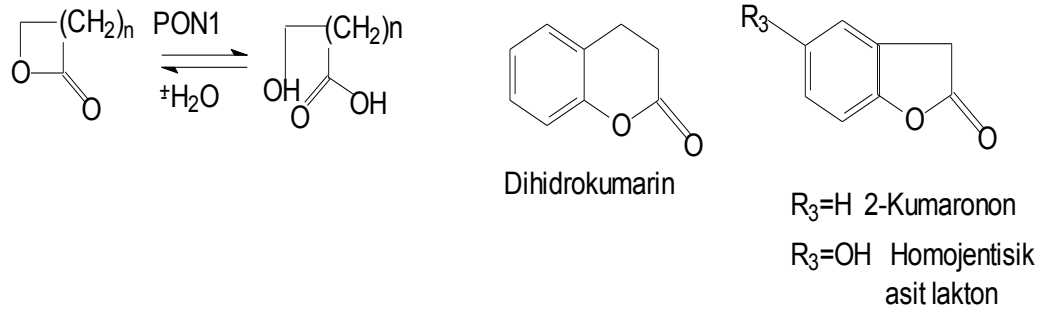
Özellikle insan serum paraoksonaz enzimi (PON1); karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan  $Ca^{+2}$  bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43-45 kDa molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır (Mackness ve ark. 1998, Aviram ve ark. 1999).

Paraoksonaz enziminin yapısı Şekil 2.12'de özetlenmiştir.



**Şekil 2.12.** hPON1 enziminin yapısı (Aviram 1999)

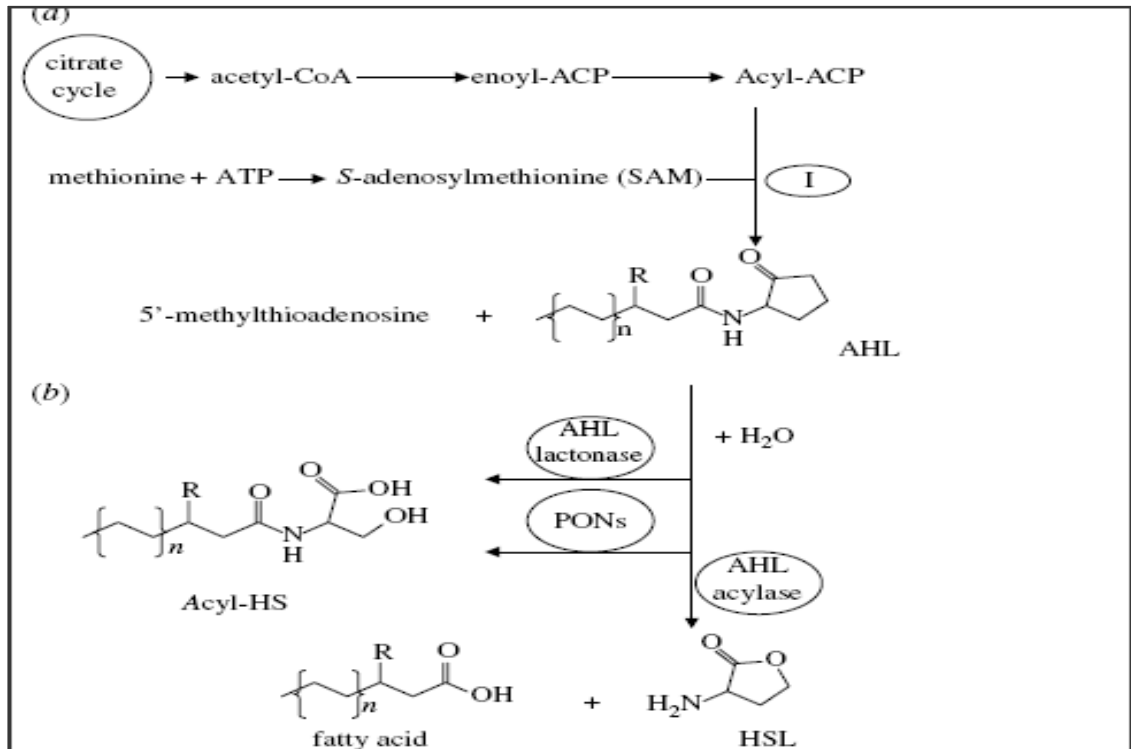
Serum paraoksonaz enziminin, aromatik karboksilik asid esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, soman gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile göstermiştir (Mackness ve ark. 1998, La Du ve ark. 1999, Aviram ve ark. 2000). Son yıllarda PON1 enziminin ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir (Draganov ve ark. 2000). 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 hidrolizlenmemektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir (Şekil 2.13) (Kearny ve ark. 1993, Biggadike ve ark. 2000, Billecke ve ark. 2000).



**Şekil 2.13.** Lakton hidrolizi (Draganov ve La Du 2004).

AHL inaktivasyonu ile ilgili çalışmalar daha önceleri insan epitelyum hücrelerinde incelenmiştir (Chun ve ark. 2004). Daha sonraları test edilen insan, fare, tavşan, at, koyun ve sığır gibi memeli türlerindeki serumlarda oldukça korunmuş olduğu bulunmuştur (Yang ve ark. 2005). PON'lar (PON1, PON2 ve PON3) ilaç metabolizması ve organofosfat detoksifikasyonu gibi önemli aktivitelere sahiptir. Bunların quorum quenching enzim aktivitesi bu son zamanlarda birbirinden bağımsız olarak çalışan üç laboratuvar tarafından tanımlanmıştır. Saflaştırılmış PON2'nin çeşitli test edilmiş AHL komponentlerini hidrolize edebildiği gösterilmiştir (Draganov ve ark. 2005). Farelerde eksprese edilen PON1, PON2 ve PON3'ün hızlı bir şekilde AHL degradasyon aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Yang ve ark. 2005). Aynı zamanda *P. aeruginosa*'nın 3oxoC12HSL sinyal molekülüne karşı olan insan serumunda bulunan purifiye edilmiş hPON1 enziminin hidrolitik aktivitesi de bulunduğu anlaşılmıştır (Ozer ve ark. 2005). PON enzimleri 3oxoC12HSL gibi uzun zincirli AHL moleküllerine karşı aktivitesi kısa zincirli olanlara oranla daha fazladır. AHL laktonaz da olduğu gibi PON enzimleri AHL sinyallerindeki homoserin lakton halkasını parçalamaktadır (Şekil 2.14).





**Şekil 2.14.** PON enzimlerinin genel mekanizması a) Protein açıl-ACP ve SAM substratları kullanılarak AHL biyosentezini katalizlemektedir. b) AHL laktonaz, PON ve AHL açılaz enzimlerinin aktiviteleri sonucunda AHL moleküllerinin parçalanması gösterilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışma için kullanılan kimyasallar Sepharose 4-B afinite jeli, L-tirozin, naftilamin, CNBr, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, akrilamid, N, N, N',N'- tetra metil etilendiamin (TEMED), N,N- metilen bisakrilamid, β- merkaptoetanol, SDS, glisin, coomassie brillant blue G-250, coomassie brillant blue R-250, trisHCl, sodyum hidrokisit, trihidroksi metil aminometan (Tris), gliserol (Sigma), kristal viyole (Sigma), tripton, yeast extract, agar, NaCl, nutrient broth, skim milk, paraokson, aseton, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, bakır sülfat, NaK tartarat, folin fenol, elastin kongo kırmızısı (Elastin Congo Red), kloroform, metanol, hidroklorik asit (HCl), glukoz, etanol, asetik asit, tripton, magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>), potasyum sülfat, CTAB şeklindedir.

##### 3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

- **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0); 14,2 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 ml distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirilmiş ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- **Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** 1M NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0) ve 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14,2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 ml distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 14,2 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 8.0'e getirilmiş ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:**
  - Fenol ayıracı:** Folin-fenol ve distile sudan bire bir oranda alınarak hazırlanmıştır.
  - Ayıraç A:** % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M NaOH'da çözülmüştür.
  - Ayıraç B:** %1 NaK tartarat distile suda çözülmüştür.
  - Ayıraç C:** % 0.5'lik CuSO<sub>4</sub> distile suda çözülmüştür.

**Ayıraç D:** 48 ml A ayıracından, 1ml B ayıracından, 1ml C ayıracından konulup hazırlanmıştır.

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

- **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeğin 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 getirilmiş ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- **Substrat çözeltisi:** 2 mM paraokson çözeltisi; 10,8 µl paraokson, 1 ml asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1 ml bazal aktivite tamponu eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanılmıştır.
- **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 getirilmiş. 0,0555 g (0.5 mmol) CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Besiyerleri ve kullanılan çözeltiler Millipore saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı zamanda besiyerleri için otoklavda 121°C'de 15 dk'da sterilizasyon işlemi uygulanmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Besiyerleri ve çözeltiler

Besiyerleri ve çözeltiler	gram/ litre
Luria- Bertani (LB)	10 g Tripton 5 g Yeast extract 5 g NaCl 15 g Agar
Kayma testi için besiyeri	8 g Nutrient broth 5 g Agar 5 g Glikoz
Titreme testi için besiyeri	10 g Tripton 5 g Yeast extract

	5 g NaCl 10 g Agar
Yüzme testi için besiyeri	10 g Tripton 3 g Agar 5 g NaCl
Alkali proteaz testi için besiyeri	LB Agar 2 g Skim milk
M9 glutamat minimal medium agar/ broth	48 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 22 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8.5 mM NaCl 18,7 mM NH <sub>4</sub> Cl 2 mM MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 15 g Agar % 0.02 CTAB % 0.2 Glikoz % 0.0005 Metilen mavisi % 0.05 Glutamat
Piyosyanin Sıvı besiyeri (PB)	20 g Pepton 1,4 g MgCl <sub>2</sub> 10 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Elastin Kongo Red (ECR) tamponu	100 mM Tris, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7.5, 20 mg Elastin kongo kırmızısı
Biyofilm çözeltisi	% 1 'lik kristal viyole
SDS PAGE için numune tamponu	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8) 2,5 ml % 10'luk SDS 4 ml Gliserol 2 ml β-merkaptoetanol 1 ml Bromfenol mavisi 0,01 g

	Distile su	0,5 ml
SDS PAGE için tank tamponu	Tris-HCl	3 g
	Glisin	14,4 g
	SDS	1 g
SDS PAGE için renk açma çözeltisi	% 7.5 Asetik asit	
	% 5 Metanol	
	% 87.5 ml Distile su	
SDS PAGE için renklendirme çözeltisi	0,66 g Coomassie brilliant blue G-250	
	120 ml Metanol	

**Serum Fizyolojik Hazırlanışı:** 4 g NaCl, 1 L distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Daha sonra falkon tüplere paylaştırılarak 20 dk 121°C'de steril edilmiştir. İnokulum süspansiyonunun hazırlanışı işleminde kullanılmıştır.

**İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı:** Antibakteriyal aktivitede bakteri süspansiyonları serum fizyolojik ile MacFarland 0.5 standardına göre hazırlanmıştır. Aynı zamanda spektrofotometre ile 600 nm'de 0.5 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edilmiştir. Katı kültürden inokulum hazırlanırken Middlebrook 7H9'da süspansiyon edilen örnek vortekslendikten sonra katı parçacıkların çökmesi beklenerek üstte kalan süpernatant kısmı steril tüpe aktarılmıştır. MacFarland 0.5 oluncaya dek gözle ayarlama yapılmıştır. Daha sonra 1 ml alınıp 4 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak inokulum süspansiyonu hazırlanmıştır.

*P. aeruginosa* suşları olan *P. aeruginosa* ATCC35032, *P. aeruginosa* ATCC27853, *P. aeruginosa* ATCC15692 ve *S. aureus* ATCC 25904 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. *P. aeruginosa* suşları, LB besiyerinde 37°C'de üretilmiştir ve -80°C'de ve % 20 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir (Ausubel ve ark. 1988).

### 3.1.3. Kullanılan alet ve cihazlar

Bu çalışmada aşağıda isimlendirilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buz Makinesi	: Fiocetti Scotsman otomatik buz makinesi
Çalkalayıcı	: Biolab 1575-2B çalkalayıcı
Elektrofez Tankı	: Hofer, HSI
Etüv	: Elektromag
Hassas Terazi	: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
İnkubatör	: Nuare CO <sub>2</sub> -Water Jacket Incubator
Kromatografi Kolonu	: Sigma (1 cm çap ve 20 cm uzunluk)
Laminar flow	: Telstar Bio IIA
Magnetik Karıştırıcı-Isıtıcı	: ARE Magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Masa Santrifüjü	: Hettich Zentrifugen EBA 12 R
Otomatik Pipetler	: Eppendorf, Medisis
Pastör Fırını	: Memert
pH-metre	: Orion-model 920 A
Soğutmalı Santrifüj	: Sigma Laborzentrifügen 3K 15/10706 / 10707
UV-Spektrofotometresi	: CARY 1E, UV- Visible Spectrophotometer- VARIAN
UV-Spektrofotometresi (plaka okuyucu)	: Biotek Power Wave XS
Vorteks	: Fisons Whirli Mixer

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. İnsan serum paraoksonaz 1 (hPON1) enziminin saflaştırılması

#### 3.2.1.1. Kan serumunun ayrılması

Kan numuneleri, santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4 °C'de ve 10–15 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aynı gün deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

#### 3.2.1.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu literatürden bakılarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi (Sinan ve ark. 2006) aşağıda verilen formülle belirlenmiştir;

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

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

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

Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli olarak Sepharose-4B-L tirozin1-Naftilamin jeli kullanılmıştır. 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 dengelenmiştir. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi 5 ml çökelek tampon ile çözüldükten sonra 1M amonyum sülfat doygunluğuna getirilmiştir. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edilmiştir. 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 uygulanmıştır. Kolondan toplanan yıkama ve elüsyon çözeltisi 1,5 ml halinde tüplere alınmıştır. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edilmiştir. 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 yapılmıştır (Gan ve ark. 1991, Sinan ve ark. 2006, Aybey 2010). Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizilmiştir.

#### **3.2.1.4. Enzim aktivite tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. 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 paraokson) + koenzim (2 mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de 1 dk'da 37°C'de absorbansta meydana gelen değişme okunmuştur. Bu şekilde paraoksonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edilmiştir. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlenmiştir. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edilmiştir (Gan ve ark. 1991).

#### **3.2.2. Lowry yöntemiyle protein tayini**

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntem alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturmasına dayanır. 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 ayıraç bu aminoasitlere daha yüksek hassasiyet gösterir. Bu yöntemde 4 farklı çözelti kullanılır.

Protein tayini işleminde şu yol izlenmiştir: 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µl alınmıştır. Her tüpe 2 ml D ayıracından eklenmiştir. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her tüpe 0,2 ml folin-fenol çözeltisinden eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırılmış ve



30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 600 nm’de köre karşı absorbands değerleri okunmuştur. Okunan absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlanmıştır (Lowry ve ark. 1951).

Protein miktarını ölçmek için hazırlanan enzim çözeltilerinde 0,1 ml 2 ayrı tüpe konulmuştur. Üzerlerine 2 ml D ayırıcından eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüpe 0,2 ml folin-fenol bileşiği eklenip vorteksle karıştırılmıştır. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 600 nm’de absorbandsları okunmuştur. Ölçümlerin ortalama absorbandsına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

### **3.2.3. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü**

PON1 enziminin saflık kontrolü, yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektrofrezisi ile Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılmıştır (Laemelli 1970).

### **3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa* suşunun seçimi ve üreme eğrisi**

*P. aeruginosa* ATCC35032, *P. aeruginosa* ATCC27853 ve *P. aeruginosa* ATCC9027 suşlarının üreme eğrileri belirlenmek üzere, hazırlanan ön kültürler (ÖK)’den 1:8 oranında olacak şekilde alınıp steril besiyerine ilave edilmiştir (3 ml ÖK / 25 ml LB besiyeri). Ekimin yapıldığı anda ( $t_0$ ) ortam iyice karıştırılmış ve 1 ml alınarak UV Spektrometre’de OD<sub>600</sub> değeri ölçülmüştür. İlk ölçümden itibaren besiyeri 130 rpm’de 30°C’de üremeye bırakılmıştır. Bir saat aralıklarla besiyerinden 1 ml numune alınmış ve OD<sub>600</sub> değerleri belirlenmiştir. Deney sonucunda elde edilen veriler yardımıyla, Excel programında bakterilerin üreme eğrileri çıkarılmıştır. Oluşan grafiklerden yararlanarak her bir suşun durağan faz süreleri belirlenmiştir.

### **3.2.5. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının üremesine hPON1 enziminin etkisi**

*P. aeruginosa* üremesi üzerindeki etkinin incelenmesi amacıyla her bir bakteri suşunun durağan faz sürelerindeki kültürlerinden Macfarland 0.5 indeksine göre inokulum süspansiyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontrol grup olarak plakalardaki her üç kuyucukta bir bakteri örneği olacak şekilde 20 µl mikroorganizma, 150 µl distile su ve

50 µl nutrient broth besiyeri ilave edilmiştir. Aynı koşullar altında mikroorganizma bulundurmayan negatif grup oluşturulmuştur. Diğer her bir kuyucuğa da 50 µl LB besiyeri, 150 µl beş farklı konsantrasyonda (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) filtre edilerek hazırlanmış steril saf insan serum hPON1 enzimi ve son olarak da her bir enzim içeren kuyucuğa 20 µl mikroorganizma ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyonun ardından plakalardaki her bir suş için hPON1 konsantrasyonlarının üremeye etkisi 600 nm'de OD değerlerine bakılarak kantitatif olarak gösterilmiştir.

### **3.3. hPON1 Enziminin Virülans Faktörlerine Etkisi**

#### **3.3.1. Ekzoproteazlara etkisi**

##### **3.3.1.1. Alkali proteaz testi**

*P. aeruginosa* suşu, 24 saat LB besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Ön kültürden LB agara ardından tek koloni şeklinde % 2 yağsız süt tozu (skim milk) içeren LB agar petrilerinin ortasına, beş farklı konsantrasyonda (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) 100'er µl hPON1 enzimi ilave edilmiş ve 37°C'de 16-18 saat inkubasyona bırakılmıştır (Dong ve Zhang 2005). *P. aeruginosa* suşunun proteolitik aktivitesi bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. hPON1 enziminin etkisi de bu zon çaplarına bağlı değerlendirilmiştir. İnkubasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında enzim içermeyen *P. aeruginosa* içeren proteaz besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Proteolitik aktiviteye hPON1 enziminin etkisi azalan zon çaplarıyla gösterilmiştir (Dong ve Zhang 2005). Alkali proteaz testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

##### **3.3.1.2. Stafilolitik Las A proteaz testi**

Stafilolitik Las A proteaz aktivitesi için stafilokok hücreleri hazırlanmıştır. Bunun için *S. aureus* ATCC 25904 0,02 M tris-HCl içinde süspansiyon haline getirilmiştir. 10-15 dk benmaride kaynatılmıştır. Hücre süspansiyonu aynı tampon ile optik dansitesi 595 nm'de 0,8 olacak şekilde dilüe edilmiştir. 0,1 ml 24 saatlik *Pseudomonas* suşunun süpernatantından 1,9 ml stafilokok süspansiyonu ile karıştırılmış ve karışım hızlıca 650

nm’de spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir ve bu işlemler ilk 30 dk içinde gerçekleştirilmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi 1 dk’da OD<sub>650</sub> değerinde azalmayla tespit edilmiştir (Wretlind ve ark. 1977). Aynı işlemler farklı konsantrasyonlarda (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) 0,1 ml hPON1 içeren örneklere uygulanmıştır.

### 3.3.1.3. Elastaz testi

hPON1 enzimi varlığında elastaz aktivitesi için *P. aeruginosa* suşuna Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman ve ark. 1980). *P. aeruginosa* suşu 5 farklı konsantrasyonda (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) 100’er µl hPON1 enzimi içeren ön kültürlerle beraber LB’de 37°C’de 14 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin süpernatantlarından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu ilave edilmiş ve 37°C’de 3 saat çalkalarak inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrasında çözülmemiş ECR, 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatantların OD<sub>495</sub> değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Kör olarak ECR tamponu kullanılmıştır. Elde edilen değerler kültürlerin OD<sub>600</sub> değerlerine bölünerek elastaz aktivitesi gösterilmiştir. Elastaz testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

### 3.3.1.4. Piyosiyanın testi

*Pseudomonas* suşu LB besiyerinde 37°C’de 24 saat üretilmiştir ve 600 nm’ de OD 0.02 olacak şekilde ayarlanıp 5 farklı konsantrasyonda (0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5 mg/ml) 100’er µl hPON1 enzimi içeren piyosiyanın broth (PB) besiyerine ekilmiş ve 37°C’de çalkalanarak 120 saat inkubasyona bırakılmıştır (Prithiviraj ve ark. 2005). Bakteri biyokütlesi 24, 48 ve 72 ve 120. saatlerde OD<sub>600</sub> ölçülüp kaydedilmiştir. Ayrıca bu zaman dilimlerinde aşağıdaki işlemler uygulanarak bakterinin ürettiği piyosiyanın miktarı da OD<sub>520</sub>’de ölçülüp kaydedilmiştir. Essar ve ark. (1990)’larına göre, PB ortamında üretilen *P. aeruginosa* kültürleri, 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. 2 ml süpernatanta 1 ml kloroform ile ekstrakte edilmiş ve vortekslenerek organik fazın ayrılması sağlanmıştır. 1000 rpm’de 10 dk santrifüj işleminden sonra bu pigment besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak mavi renkte gözlenmiştir. Piyosiyanın içeren kısımlar, temiz

tüplere aktarılarak her bir tüp 1 ml 0.2 M HCl ile ekstrakte edilip vortekslenmiştir. 5000 rpm'de 4 dk santrifüjden sonra hafif pembemsi kısmın piyosiyanın miktarı OD<sub>520</sub>'de okunarak sonuçlar kayıt edilmiştir. Kültür süpernatantlarının her bir ml'sinde üretilen piyosiyanın µg'ı OD<sub>520</sub>(17.072)/OD<sub>600</sub> kullanılarak hesaplanmıştır (Essar ve ark. 1990). Ayrıca 120 saatlik en yüksek konsantrasyonda hPON1 enzimi içeren ve hPON1 enzimi içermeyen kültür örneklerine gram boyama sonrasında ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskobunda, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapılmıştır. Piyosiyanın testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

### 3.3.1.5. Ramnolipit testi

0,2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/L metilen mavisi içeren M9 glutamat minimal medium agar petripleri kullanılarak ramnolipit testi gerçekleştirilmiştir. *P. aeruginosa* suşunun 37°C'de 24 saat LB önkültürlerinden ve 5 farklı konsantrasyonda (0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5 mg/ml) hPON1 enziminden 100'er µl petriplerin ortasına damlatılıp yayılmıştır (Siegmund ve Wagner 1991). Ardından 37°C'de 48-72 saat inkube edilmiştir. İnkubasyon sonucunda yayılmış bakteri kolonisi etrafındaki koyu mavi zon ramnolipid aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Pinzon ve Ju 2009a). hPON1 enzim konsantrasyonuna bağlı koyu mavi zon çapında azalma kalitatif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 5 mg/ml hPON1 enzimi içeren ve içermeyen ramnolipid örnekleri gram boyama yapılarak ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskobunda, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapılmıştır.

Kantitatif bir test olarak, agarsız M9 glutamat minimal medium içeren tüplere *P. aeruginosa* suşunun 37°C'de 48 saat LB önkültürlerinden ve 5 farklı konsantrasyonda PON1 enziminden 100'er µl ilave edilmiş olup 37°C'de 1 saat 200 rpm'de çalkalanmış ve ardından örnekler 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pinzon ve Ju (2009b)'ya göre, eşit miktarda süpernatant kloroform ile ekstrakte edilmiş ve ramnolipidin besi ortamındaki CTAB ve metilen mavisi ile oluşturduğu kompleks OD<sub>638</sub>'de

spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Ramnolipid testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

Alternatif olarak ramnolipid üretimini gözlemlemek amacıyla yapılan diğer metod ise yağ üzerinde yayılma testidir. Bakteri süpernatantından 0,1 ml örnek alınarak yağ içeren petri ortasına bırakılmış ve yüzey aktif molekül varlığında yağ molekülleri kenarlara doğru uzaklaşarak ortada temiz bir zon oluşmasına neden olmuştur. Oluşan zonun çapı, süpernatanttaki biosüperfektan moleküllerin aktivitesi ile ilişkilidir (Morikawa ve ark. 2000). hPON1 enzimi içeren bakteri süpernatantlarında zon oluşumu beklenmemektedir.

### **3.4. hPON1 Enziminin Antibiyofilm Etkisi**

#### **3.4.1. Tüpte biyofilm oluşumu ve hPON1 enziminin etkisi**

Polistren 12x75 mm tüplere 0,5 ml LB broth konulmuştur. LB kültürde bir gece inkübe edilerek üretilmiş olan bakteri süşundan bir öze alınarak inokulasyon yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda ( $10^{-4}$ -10 mg/ml) hPON1 enziminden 1 ml her bir tüpe ilave edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Distile suyla 3 kez yıkandıktan sonra % 1'lik kristal viyole ile oda sıcaklığında 20 dk boyanmıştır. Tekrar distile suyla 3 kez yıkayıp 2 ml % 95 etanol konarak boyalı biyofilm eritilmiş ve görüntüleri alınmıştır (Ozer ve ark. 2005).

#### **3.4.2. Biyofilm oluşumu ve olgun biyofilmlere hPON1 enziminin etkisi**

*P. aeruginosa*, LB broth'a ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler vortekslenmiştir. Tüpten 10 µl örnek alınarak 990 µl LB broth ile karıştırılıp 1/100'lük bakteri dilüsyonu hazırlanmıştır ve tekrar vortekslenmiştir. 3 farklı doksanaltı gözlü U plate alınarak bir çukura 1/100'lük bakteri dilüsyonundan 100µl ve LB brothdan 100µl konulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) hPON1 enziminden 100 µl her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. 12, 24 ve 48 saat 37°C'de bekletilmiştir. Kuyucuklar pipetle boşaltılıp distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Çukurlara

1/100'lük kristal viyole ilave edilip 20 dakika beklenerek, biyofilm oluşturmuş hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Tekrar distile su ile 3 kez yıkayıp kuyucuklara 200 µl etanol eklenmiştir. 15 dakika beklenip bu sıvı ependorf tüplere alınmıştır (Ozer ve ark. 2005). Hacim distile su ile 1 ml'ye tamamlanmış ve spektrofotometrede 590 nm'de okutulmuştur.

Mikroskobik analiz için, biyofilmler 12 kuyulu plakalarda 24 saat büyütülmüş ve yukarıdaki yöntem uygulanmış ve mikroskobik incelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapılmıştır.

Olgun biyofilmlere hPON1 enziminin etkisini göstermek için, bahsedilen yöntemden farklı olarak, farklı konsantrasyonlardaki (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) hPON1 enzimi 48 saat inkubasyondan sonra ortamlara ilave edilmiştir. 30°C' de 1 saat 130 rpm'de çalkalanan örnekler biyofilm analiz testi uygulanmıştır. Spektrofotometrik ve mikroskobik analizleri yapılmıştır. İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapılmıştır. Tüm biyofilm testleri 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

### **3.4.3. EPS degradesyonu**

Ekzopolisakkarit ekstraksiyonu için Nithya ve arkadaşlarının metodu kullanılmıştır (Nithya ve ark. 2010). Biyofilm yapmış *P. aeruginosa* ön kültürleri 48 saat inkubasyondan sonra % 0.9 NaCl (0,3 ml) içinde süspanse edilmiştir. Süspanse EPS (0,1 ml), hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarıyla (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) muamele edilmiştir. Örnekler, hPON1 enziminin EPS'yi yıkması için 30°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak enzim içermeyen EPS örneği kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra EPS örnekleri için kantitatif protein ve karbohidrat tayini yapılmıştır. Karbohidrat içeriği glukoz standartı (1 mg/ml) kullanılarak OD<sub>490</sub> (Dubois 1956) ve protein içeriği sığır serum albumin (200 µg/ml) standartı kullanılarak OD<sub>660</sub>'da (Lowry ve ark. 1951) ölçülen değerlerden tespit edilmiştir.

### **3.5.Hareketlilik Testleri**

#### **3.5.1.Kayma (swarming) testi**

Kayma testi için, test edilecek *P. aeruginosa* 24 saat LB besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Önkültürden bir öze kadar LB agara ekilmiştir ve bir koloni, 8 g nutrient broth, 5 g bakto agar ve % 0.5 glikoz içeren kayma besiyeri içeren petrilere steril kürdanlarla ve hPON1 enziminden farklı konsantrasyonlarda (0,003; 0,03; 0,3; 3; 30 mg/ml) 100 µl ilave edilmiştir. 37°C'de 16-18 saat inkubasyona bırakılmıştır (Rashind ve Kornberg 2000). Kayma hareketi, inokulasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında yalnızca *P. aeruginosa* içeren kayma besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar hareketli olan pozitif kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kayma testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

#### **3.5.2.Yüzme (swimming) testi**

Yüzme testi için, *P. aeruginosa* 37°C'de 24 saat LB besiyerinde üretilmiştir. Her bir koloniden % 1 tripton, % 0.3 agar ve % 0.5 NaCl içeren yüzme besiyeri içeren petrilere steril kürdanlarla ilave edilmiş ve üzerine hPON1 enziminden farklı konsantrasyonlarda (0,003; 0,03; 0,3; 3; 30 mg/ml) 100 µl ilave edilerek 25°C'de 16 saat inkubasyona bırakılmıştır (Deziel ve ark. 2001). Yüzme hareketi, inokulasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan bulanıklığın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında *P. aeruginosa* içeren yüzme besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yüzme testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

#### **3.5.3.Titreme (twitching) testi**

Titreme testi için, test edilecek *P. aeruginosa*'dan bir koloni ve 100 µl'lik farklı konsantrasyonlarda (0,003; 0,03; 0,3; 3; 30 mg/ml) hPON1 enzim örnekleri % 1 LB agar petrilere steril kürdanlarla ilave edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. Titreme hareketi, inokulasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan zikzakların çapının ölçülmesiyle test edilmiştir (Deziel ve ark. 2001). Test sırasında *P. aeruginosa* içeren titreme besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Titreme testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

## **4. BULGULAR**

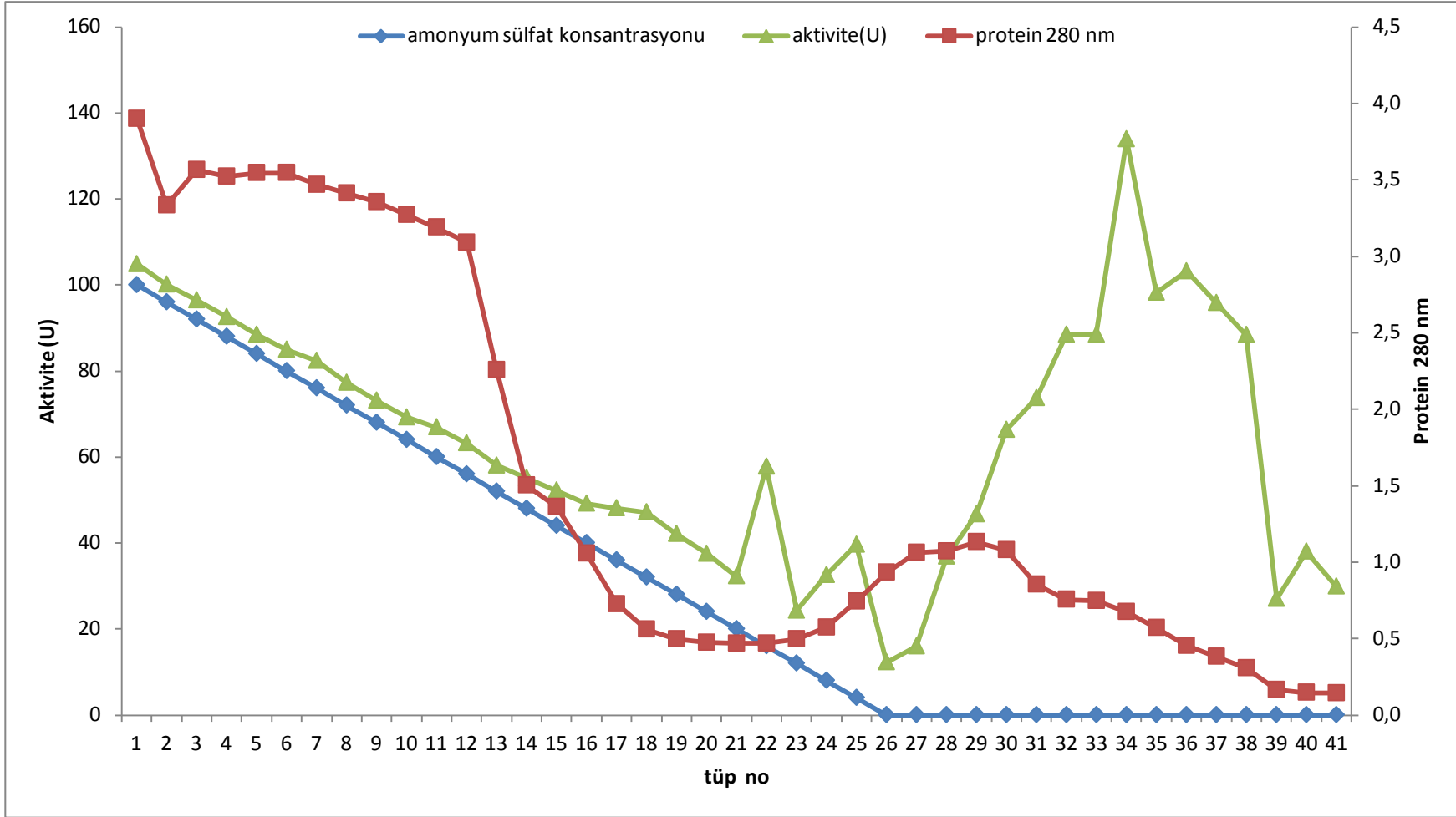
### **4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Her bir saflaştırma işleminde yaklaşık 50 ml serum kullanılmıştır. Paraoksonaz enzimi için uygun amonyum sülfat çöktürme aralığı % 60-80'dir (Sinan ve ark. 2006). Çökeleğin çözülmesiyle elde edilen numune hidrofobik kolona tatbik edilmiştir.

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

hPON1 enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Bunun için de laboratuvarında sentezlenen hidrofobik jel sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır. Yüksek aktiviteli enzim örnekleri için uygun tüpler seçilip enzim havuzu oluşturulmuştur. Kolondan alınan numunelerin, 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca kolona tatbik edilen ve birleştirilen elüatlar için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edilmiştir. hPON1 enzimi % 15,81 verimle 115,69 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1).





Şekil 4.1. Hidrofobik etkileşim kolonundan hPON1 enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm)

**Çizelge 4.1.** Saflaştırma basamakları

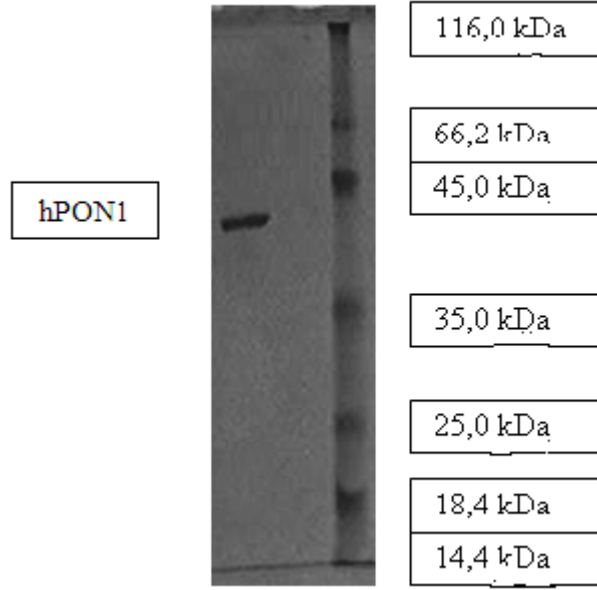
<b>Saflaştırma Basamağı</b>	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Aktivite (U/ml)</b>	<b>Toplam Aktivite (U/ml)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam Protein (mg/ml)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>Verim<sup>1)</sup> (%)</b>	<b>Saflık<sup>2)</sup> (kez)</b>
<b>Ham enzim</b>	50	88,46	4423,32	1714,84	85742,45	0,051	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	17	52,83	898,17	1701,58	28926,94	0,0311	20,3	0,6
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	3	233,21	699,63	39,018	117,054	5,97	15,81	115,69

1) Verim toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

2) Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

### 4.3. SDS PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezine enzim numunesi tatbik edilmiştir. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarılmıştır. hPON1 enziminin Şekil 4.2’de de görüldüğü gibi molekül ağırlığı 43 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).



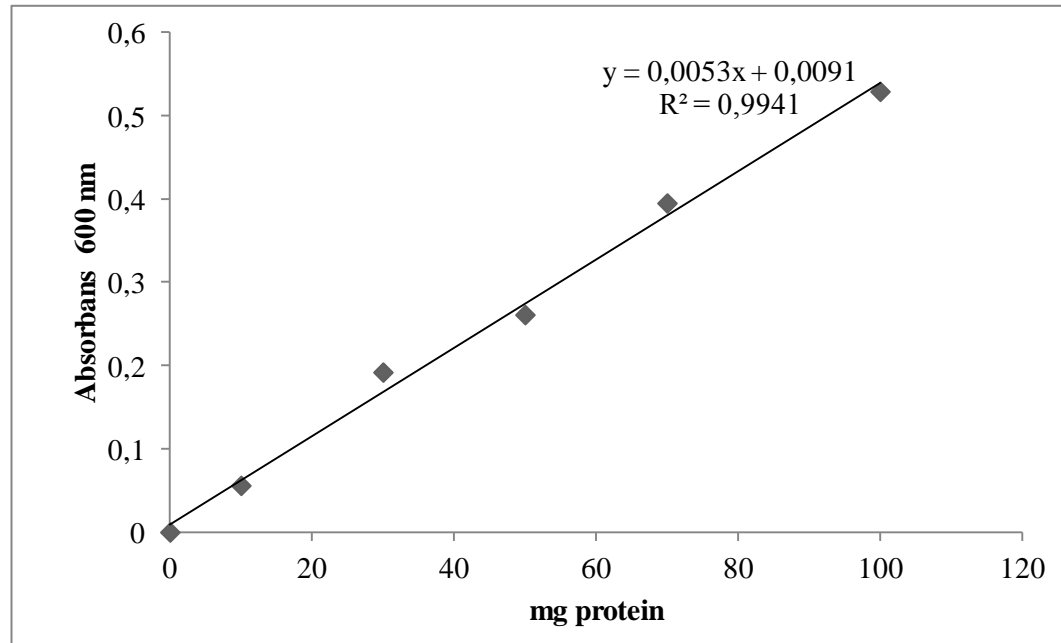
**Şekil 4.2.** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan PON1 enziminin SDS-PAGE görüntüsü. Molekül ağırlık standartları  $\beta$ -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66,2.kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa),  $\beta$ -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa)

### 4.4. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

hPON1 enziminin protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır. Standart çözeltilerdeki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Protein miktarları çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere ayrı ayrı saflaştırılan hPON1 enzim örnekleri için de hesaplanmış ve bu değerler üzerinden farklı konsantrasyonlarda hPON1 enzim örnekleri hazırlanmıştır (Çizelge 4.2). Şekilde görüldüğü gibi regresyon katsayısı 0.9941 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** Kullanılan hPON1 enzimlerinin protein miktarları

Saf hPON1 Enzim Örnekleri	Protein Miktarı (mg/ml)
1	5,17
2	39,018
3	11,17

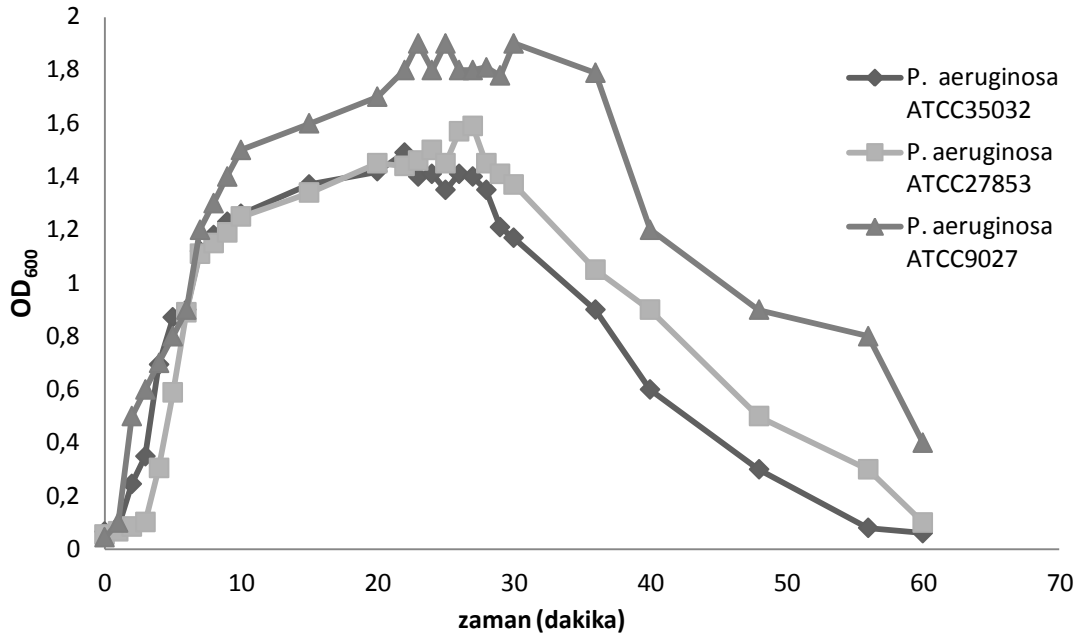


**Şekil 4.3.** Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

#### **4.5. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Üreme Eğrileri**

Hücre sayısındaki artışa paralel olarak ortamda QS sinyal molekülü ve bu mekanizmanın kontrolü altında sentezlenen moleküllerin (örneğin, virulans faktörlerinin, ekstraselüler proteinlerin) konsantrasyonları da giderek artar. Durağan faza geldiğinde ortamdaki hem sinyal molekülleri hem de bu moleküller sayesinde sentezlenen diğer moleküller en yüksek konsantrasyonda bulunur. Eğer durağan fazda olan bir kültür veya bu kültürden alınan süpernatant taze bir besiyerine eklenecek olursa, ortamda biriken QS sinyal moleküllerinin etkisi gözlemlenebilir. Bu sebeple, *P. aeruginosa* ATCC35032, *P. aeruginosa* ATCC27853 ve *P. aeruginosa* ATCC9027

suşlarının üreme eğrileri belirlenmiştir. Özellikle sinyal moleküllerinin maksimum düzeyde bulunduğu durağan faz başlangıç süreleri tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* ATCC35032, *P. aeruginosa* ATCC27853 ve *P. aeruginosa* ATCC9027 suşları için sırasıyla durağan faz süreleri 24, 30, 35 saat olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

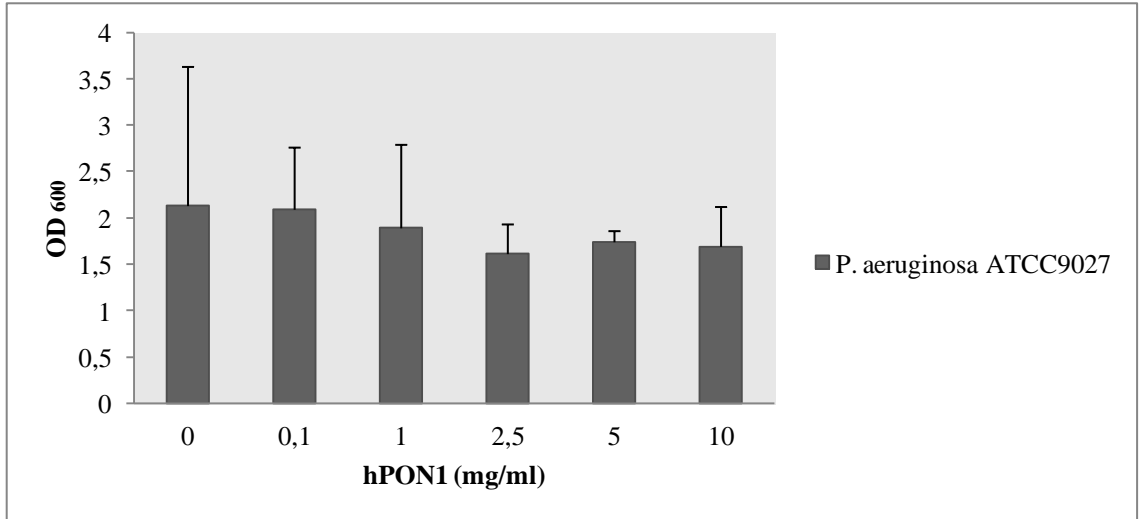
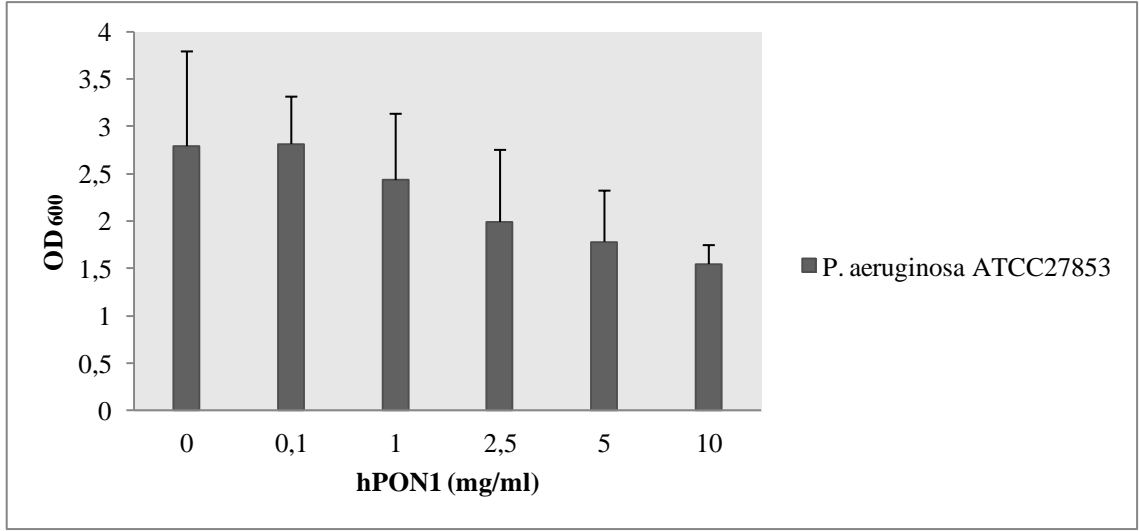
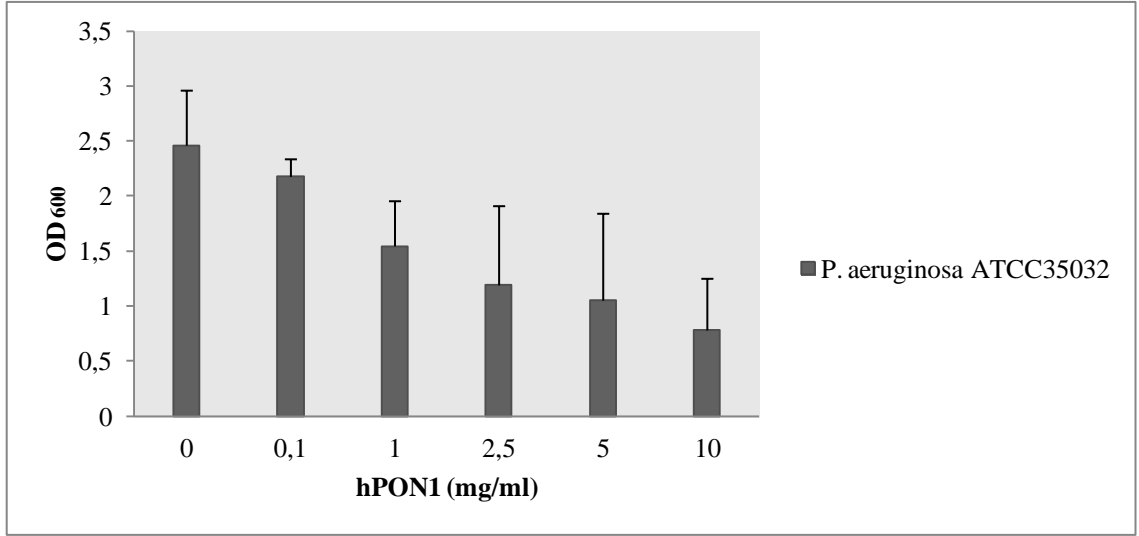


Şekil 4.4. *P. aeruginosa* suşlarına ait üreme eğrileri

#### 4.6. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Üremesine hPON1 Enziminin Etkisi

Kullanılan bakteri suşlarının üreme eğrileri çıkarıldıktan sonra her bir bakteri suşunun üremesine hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Burada amaç, hPON1 enziminin en etkili olduğu suşun belirlenip virulans faktörleri, biyofilm ve motilite çalışmalarında kullanmaktır. Diğer bakteri suşlarının üremesine de hPON1 enzimi etki etmekle beraber, enzimin en etkili olduğu suş *P. aeruginosa* ATCC35032 olarak belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ATCC35032 suşunda hPON1 enzimi, 2,5 mg/ml konsantrasyondan itibaren önemli ölçüde üremeyi azaltmıştır. hPON1 enzimi *P. aeruginosa* ATCC35032 suşuna karşı anti quorum sensing ajanı olarak etki göstermiştir. Kuyucuklardaki bakteri yoğunluğunun enzim konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı

spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5). hPON1 enziminin laktonaz aktivitesi ile kullanılan bakterilerin sinyal moleküllerine etki ederek bakteri yoğunluklarında azalmaya neden olduğu bulunmuştur.



**Şekil 4.5.** *P. aeruginosa* suşlarının üremesine hPON1 enziminin etkisi

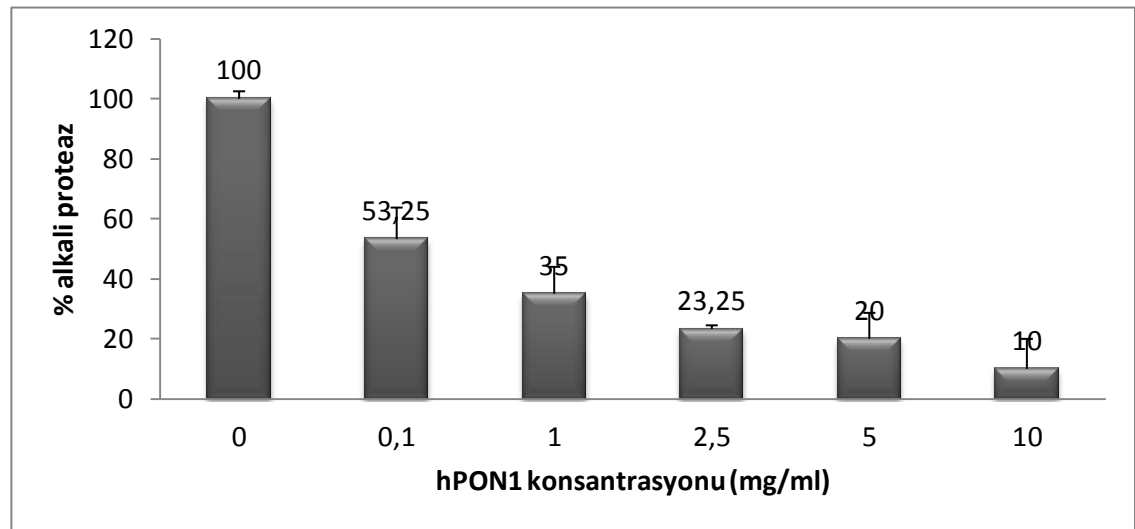
## 4.7. Virulans Faktörlerinin Üretimine hPON1 Enziminin Etkisi

### 4.7.1. Alkali proteaz aktivitesi

Alkali proteaz aktivitesi 3.3.1.1’de belirtildiği gibi oluşan zon çaplarına bağlı olarak değerlendirilmiştir. (Çizelge 4.3). hPON1 enziminin inhibisyon etkisi ile alkali proteaz aktivitesi azalmıştır. 0,1 mg/ml hPON1 enzimi konsantrasyonunda bile alkali proteaz aktivitesi zon çaplarında da görüldüğü gibi % 53,25 oranında azalmıştır (Şekil 4.6). Zon çaplarının artan hPON1 konsantrasyonuna bağlı olarak büyük oranda azalması, ortamda alkali proteaz enziminin yeterli miktarda olmadığı ve buna bağlı olarak daha küçük zon oluşması sonucunu çıkarmıştır. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’den de anlaşıldığı gibi hPON1 enzimi alkali proteaz üretimini artan konsantrasyonuna bağlı olarak önemli ölçüde azaltmıştır.

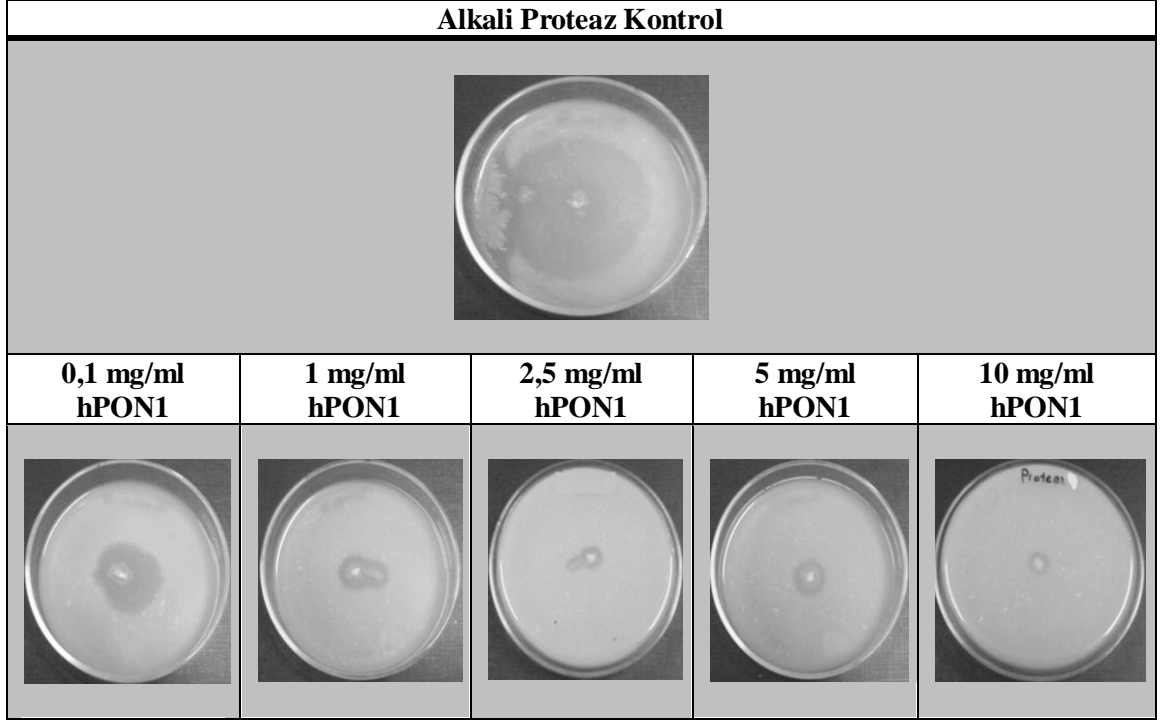
Çizelge 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* alkali proteaz aktivitesi zon çapları

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Alkali Proteaz Zon Çapları	
hPON1 konsantrasyonu (mg/ml)	mm
0 (Kontrol)	40 ± 1
0,1	21,3 ± 4,2
1	14 ± 3,6
2,5	9,3 ± 0,5
5	6 ± 2,6
10	1 ± 1



Şekil 4.6. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında alkali proteaz aktivitesi (0: Kontrol)

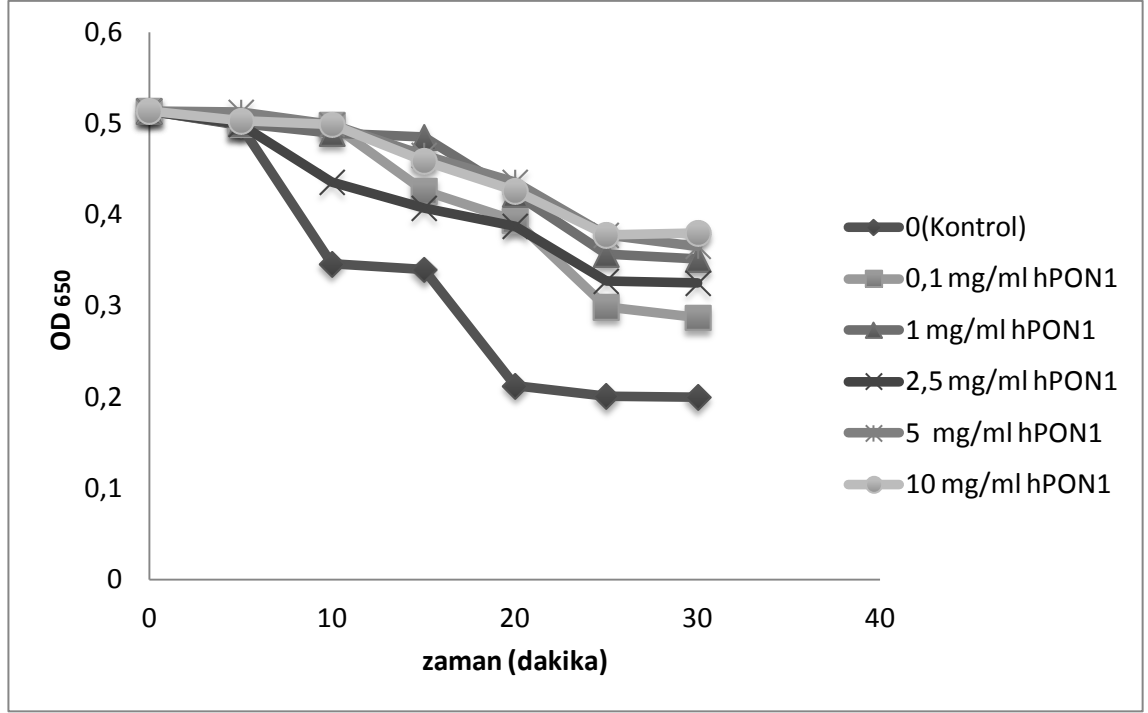




**Şekil 4.7.** Alkali proteaz aktivitesine hPON1 enziminin etkisi

#### 4.7.2. Stafilitik LasA proteaz aktivitesi

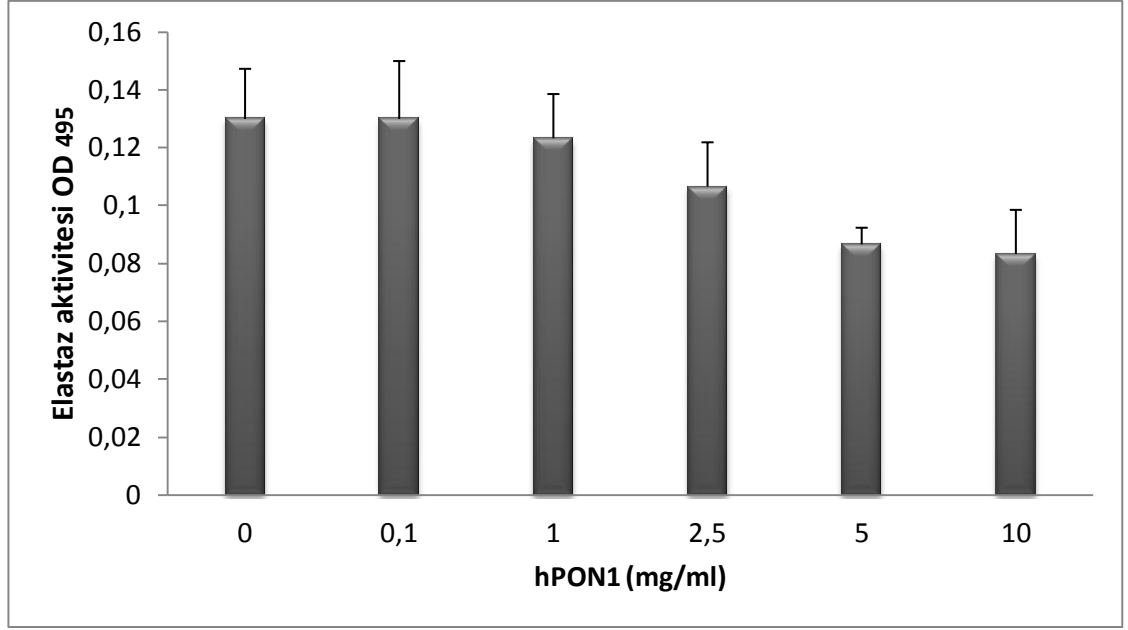
LasA proteazın stafilitik aktivitesi için *S. aureus* hücreleri lizise uğratılmıştır. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarını içeren *Pseudomonas* örneklerinin süpernatantları *S. aureus* hücreleri ile muamele edildiğinde ortamda az konsantrasyonda LasA proteaz olacağı düşünülerek lizis işleminin engellenmesi beklenmiştir. Fakat hPON1 enziminin stafilitik aktiviteye önemli ölçüde etkisi görülmemekle beraber lizis işleminde hPON1 enzimi içeren örneklerde azalma görülmüştür (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında Las A proteaz aktivitesi

#### 4.7.3. Elastaz aktivitesi

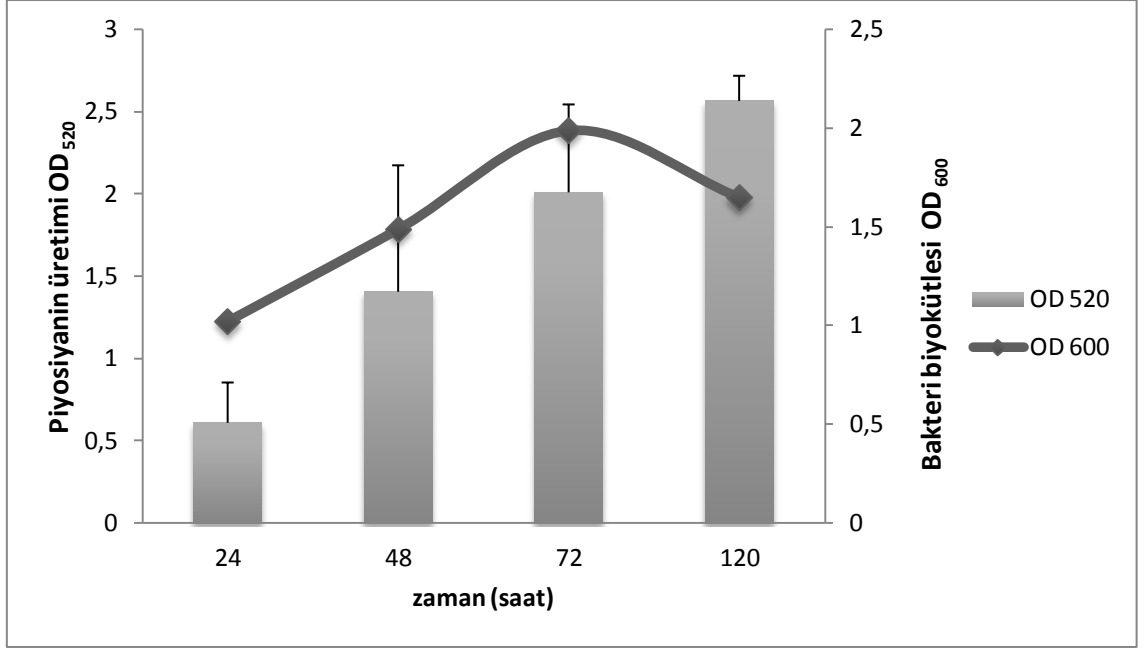
Elastaz aktivitesine hPON1 enziminin etkisi önemli ölçüde olmamakla birlikte 2,5 mg/ml enzim konsantrasyonundan itibaren aktivitede azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Elastaz ve LasA proteazın sinerjik çalıştığı bilinmektedir. LasA proteaz aktivitesine de enzimin önemli ölçüde etkisi olmaması elastaz aktivitesinde de benzer sonuçlarla karşılaşılabileceğini göstermiştir.



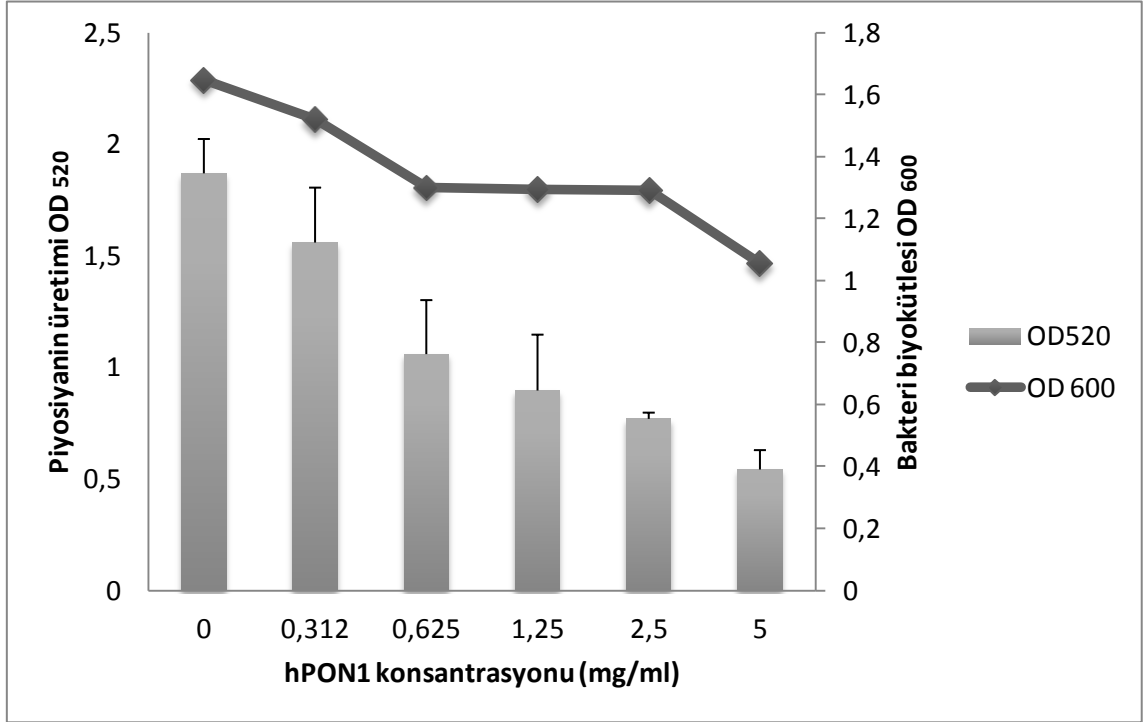
**Şekil 4.9.** hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında elastaz aktivitesi (0: Kontrol)

#### 4.7.4. Piyosiyanin üretimine hPON1 enziminin etkisi

37 °C'de 5 gün inkübe edilen *P. aeruginosa* suşlarının % 80'i piyosiyanin oluşturur. Oda sıcaklığında 3-4 gün bırakılarak agar kültürlerinde pigmentasyonda artış gözlenir. Buna dayanarak *Pseudomonas* suşunun 120 saatlik inkubasyonu ile oluşan piyosiyanin üretimi spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10). 72-120 saatlik kültürler kullanılarak hPON1 enziminin piyosiyanin üretimine etkisi OD<sub>520</sub> değerlerindeki azalmaya bağlı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). 1,25 mg/ml hPON1 konsantrasyonundan itibaren piyosiyanin miktarı önemli ölçüde azalma göstermiştir. 3.3.1.4'de belirtildiği gibi hPON1 enzimi içeren ve içermeyen örneklerin piyosiyanin konsantrasyonları (µg/ml) hesaplanmıştır. Kontrol grubu 19,37 µg/ml piyosiyanin içerirken, 5 mg/ml hPON1 enzimi muamele edilen örnekte piyosiyanin miktarı 8,78 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). hPON1 enziminin etkisiyle piyosiyanin üretimi ve ortamdaki bakteri biyokütlesi, artan enzim konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.11). Bu durumun bakteri konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür. Mikroskop görüntüleri de bu düşüncüyü doğrulamıştır (Şekil 4.12).



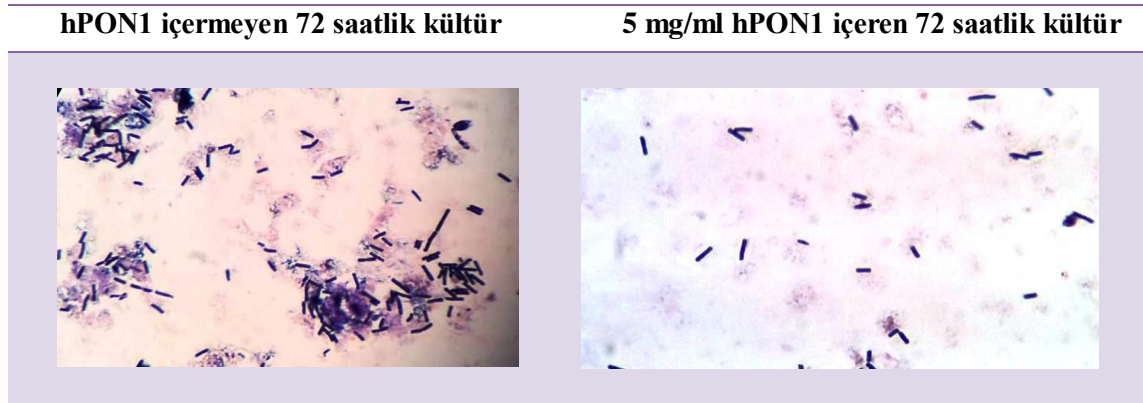
Şekil 4.10. *Pseudomonas* suşunda piyosiyenin üretimi



Şekil 4.11. hPON1 enziminin piyosiyenin üretimine etkisi (0: Kontrol)

**Çizelge 4.4.** hPON1 enzimi muamele edilmiş örneklerde piyosiyenin konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ :  $\text{OD}_{520}(17.072)/\text{OD}_{600}$ )

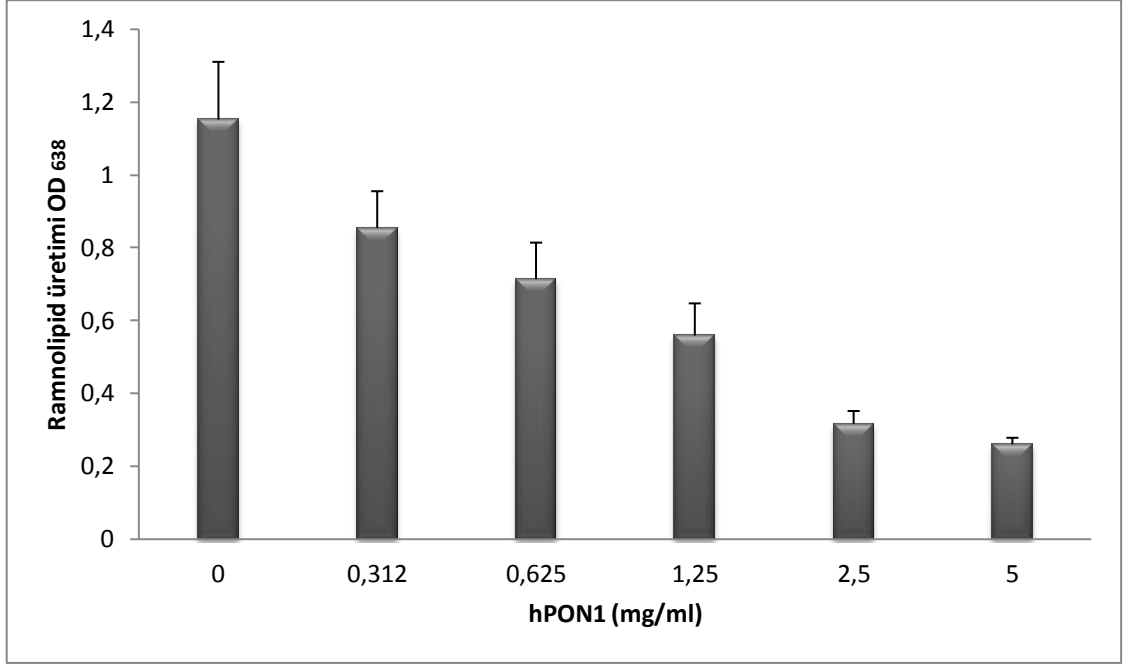
hPON1 konsantrasyonu (mg/ml)	Piyosiyenin konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ )
0 ( Kontrol )	19,37
0,312	17,53
0,625	13,93
1,25	11,84
2,5	10,17
5	8,78



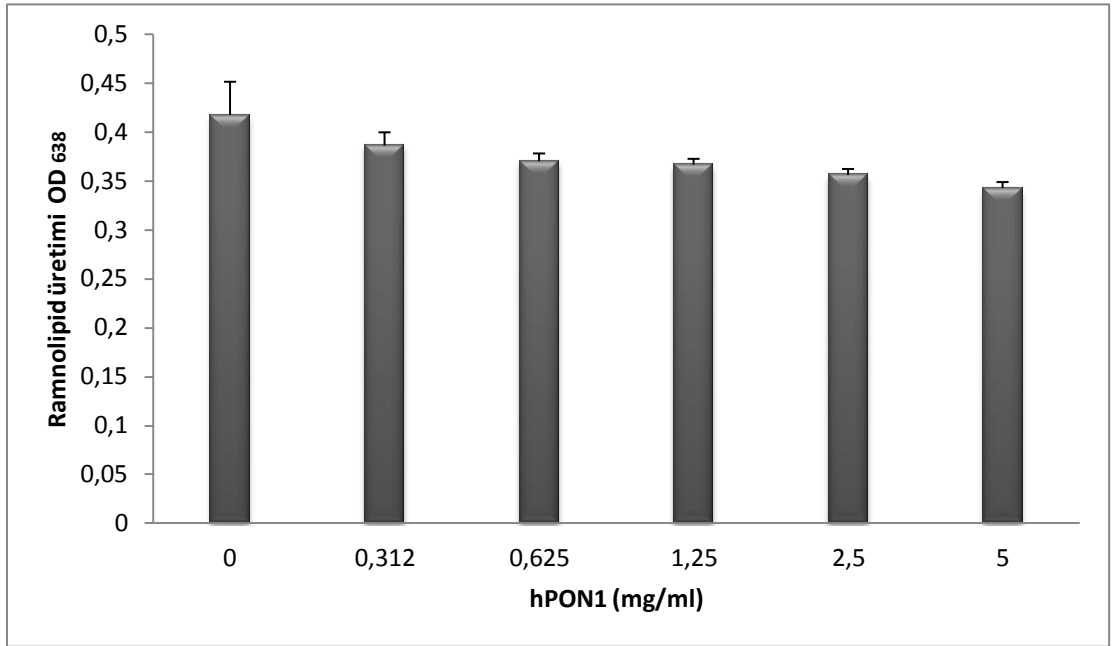
**Şekil 4.12.** Işık mikroskopunda piyosiyenin üretimi etkilenmiş bakteri hücrelerinin görünümü (100X)

#### 4.7.5. Ramnolipid üretimine hPON1 enziminin etkisi

hPON1 enziminin ramnolipid üretiminden sorumlu sinyal moleküllerini etkilediği düşünülerek, ramnolipid üretimine hPON1 enziminin etkisini belirlemek amacıyla ramnolipid üretim ortamına farklı konsantrasyonlarda hPON1 enzimi ilave edilerek 3.3.1.5'de belirtilen yöntem kullanılmıştır. hPON1 enziminin artan konsantrasyonuna bağlı ramnolipid üretimindeki azalma spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13). 1,25 mg/ml hPON1 konsantrasyonundan itibaren ramnolipid miktarında önemli ölçüde bir azalma görülmüştür. Ramnolipid üretmiş sıvı kültürlerde farklı konsantrasyonlarda hPON1 enzimi ilave edilerek enzimin ramnolipid moleküllerine etkisine bakılmıştır. Fakat literatürdeki yöntemle göre hPON1 enziminin ramnolipid molekülleri üzerine etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.14).

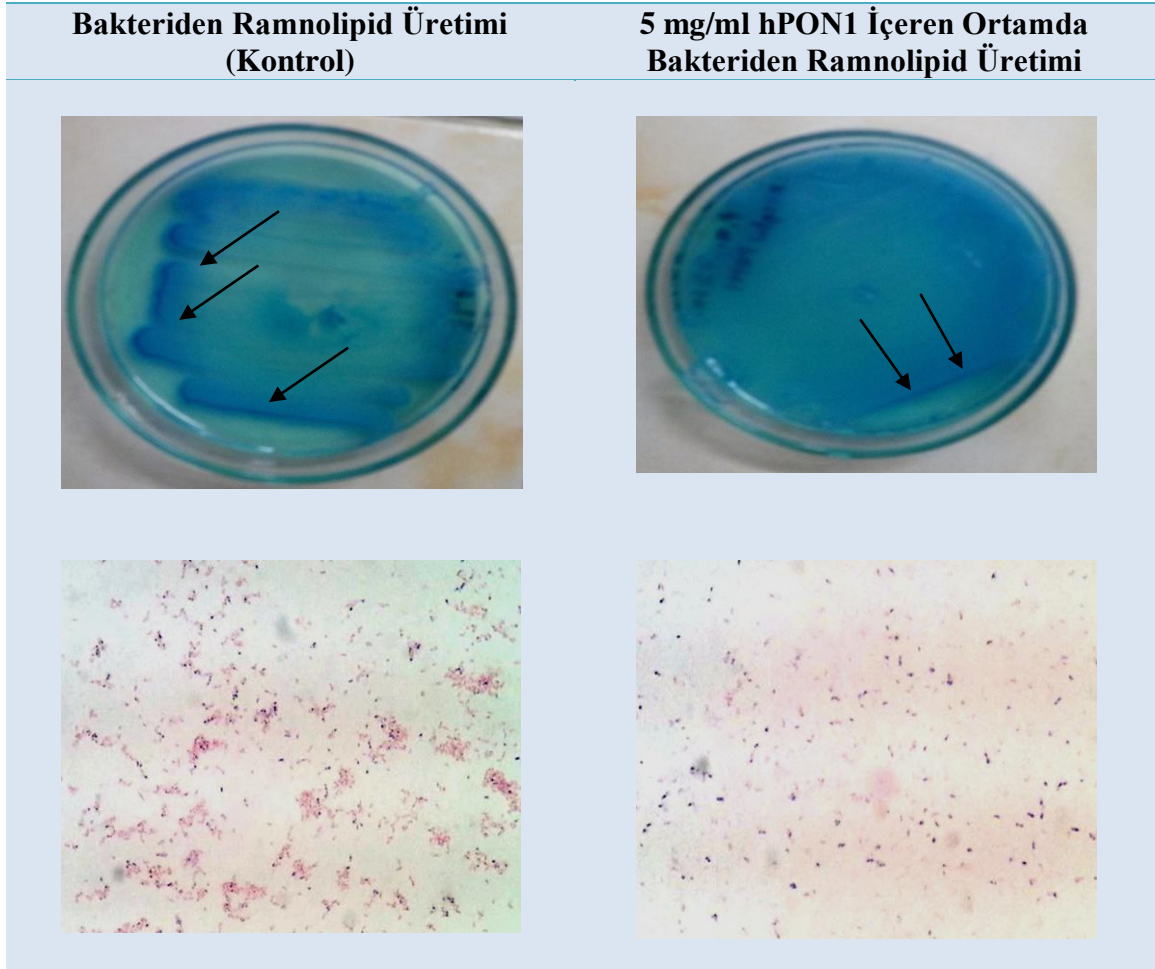


**Şekil 4.13.** Ramnolipid üretimine hPON1 enziminin etkisi (0: Kontrol)



**Şekil 4.14.** Ramnolipid moleküllerine hPON1 enziminin etkisi (0: Kontrol)

Ayrıca ramnolipid agar testi ile de hPON1 enzimine bağı ramnolipid oluşumu petrilerde gözlenen koyu mavi kısımlar ve bu kısımlara ait mikroskop görüntüleriyle de kalitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).

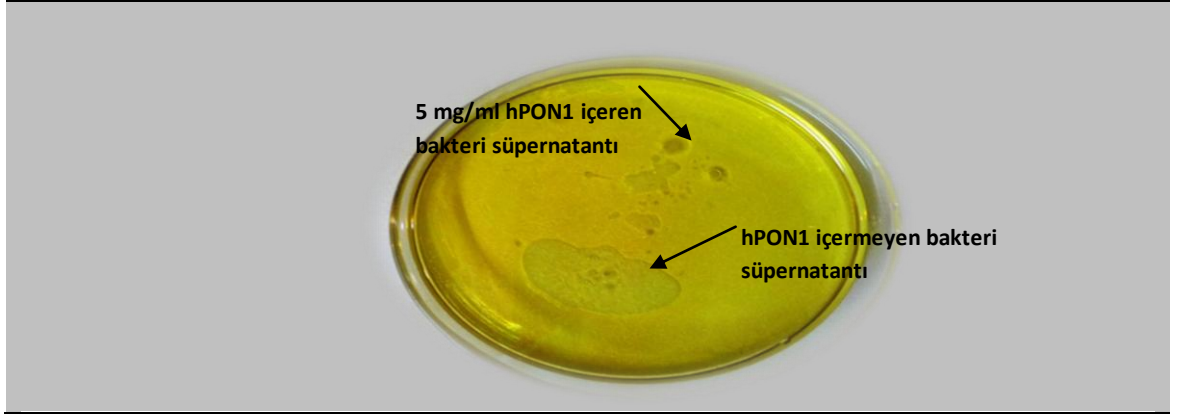


**Şekil 4.15.** Petride ve ışık mikroskopunda hPON1 yokluğunda ve varlığında ramnolipid üretiminin görünümü (100X)

Zon çaplarının örnekte bulunan ramnolipid aktivitesi ile ilişkili olduğu bilindiğinden, alternatif olarak örneklerdeki ramnolipid varlığı yağ üzerinde yayılma testi ile de tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bunun için 100 µl ramnolipid içeren ve içermeyen örnekler bir miktar yağ içeren petrilerin ortasına damlatılmış ve 30 saniyedeki yayılma zonları kaydedilmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Yağ üzerinde ramnolipid yayılma zonları

Ramnolipid yayılma zonları (mm)	
hPON1	Zon çapları(mm)
0 (Kontrol)	37,3 ± 6,43
0,312 mg/ml	36,3 ± 7,4
0,625 mg/ml	35,8 ± 3,2
1,25 mg/ml	27± 4,6
2,5 mg/ml	18 ± 3,6
5 mg/ml	15± 8,2



**Şekil 4.16.** Ramnolipid içeren ve içermeyen örneklerin yağ üzerinde yayılmaları

#### 4.8. hPON1 Enziminin Biyofilm ve EPS Yıkımına Etkisi

##### 4.8.1. Tüpte biyofilm

*P. aeruginosa* suşunun hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında tüp yüzeylerinde biyofilm tabakası oluşturması sağlanmıştır. Enzim konsantrasyonuna bağlı oluşan biyofilm tabakası kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Tüp yüzeylerinde 2,5 mg/ml hPON1 konsantrasyonundan itibaren biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.17).

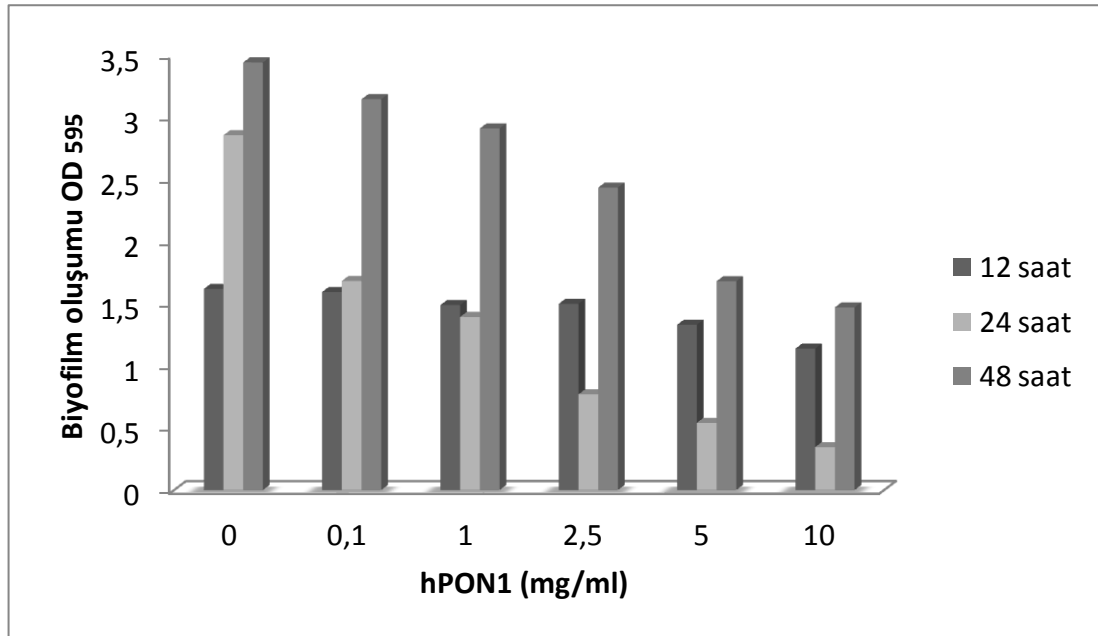


Pozitif grup	$1.10^{-4}$ mg/ml hPON1	$1.10^{-3}$ mg/ml hPON1	$1.10^{-2}$ mg/ml hPON1	$1.10^{-1}$ mg/ml hPON1	1 mg/ml hPON1	2,5 mg/ml hPON1	5 mg/ml hPON1	10 mg/ml hPON1	Negatif grup

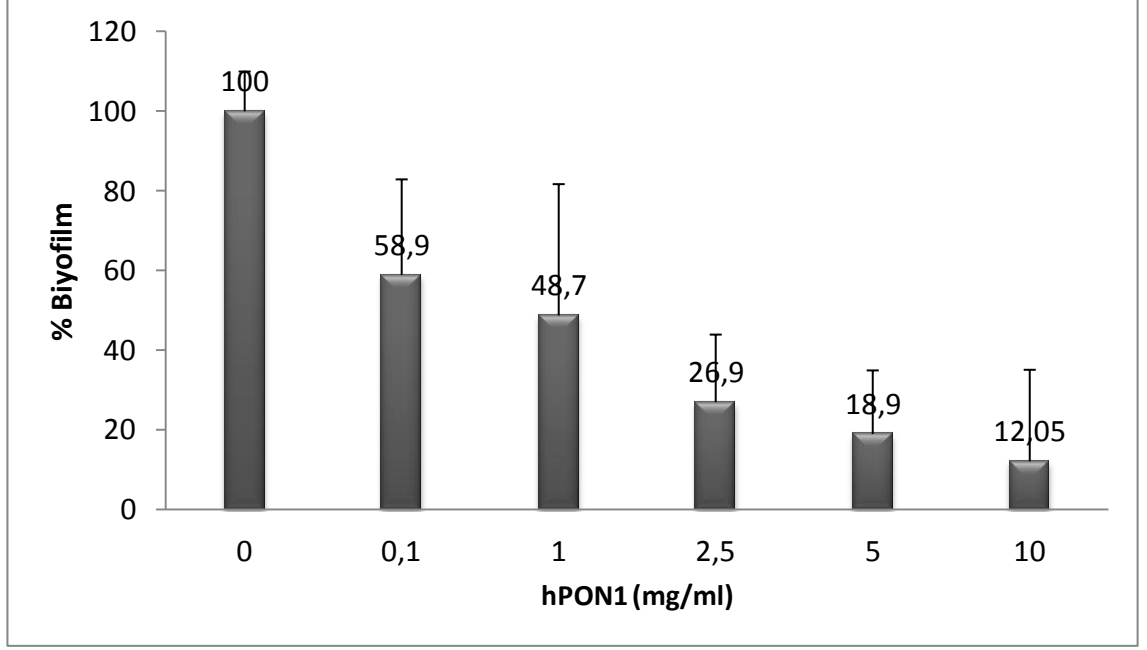
**Şekil 4.17.** Tüpte biyofilm yapan ve yapmayan kristal viyole ile boyanmış *P. aeruginosa* hücreleri

#### 4.8.2.U plakada biyofilm oluşumu ve olgun biyofilm

*P. aeruginosa* suşunun hPON1 enzimi varlığında 12, 24 ve 48 saatlik kültürlerinde biyofilm yapması sağlanmış ve biyofilm biyokütlesindeki hPON1 konsantrasyonuna bağlı azalma spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. hPON1 enziminin en etkili antibiyofilm etkisi 24 saatlik kültürlerde tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Buna bağlı olarak 24 saatlik kültürlerde enzime bağlı % biyofilm oluşumu belirlenmiş ve 1 mg/ml hPON1 enzimi % 48,7 oranında antibiyofilm etkisi göstermiştir (Şekil 4.19).

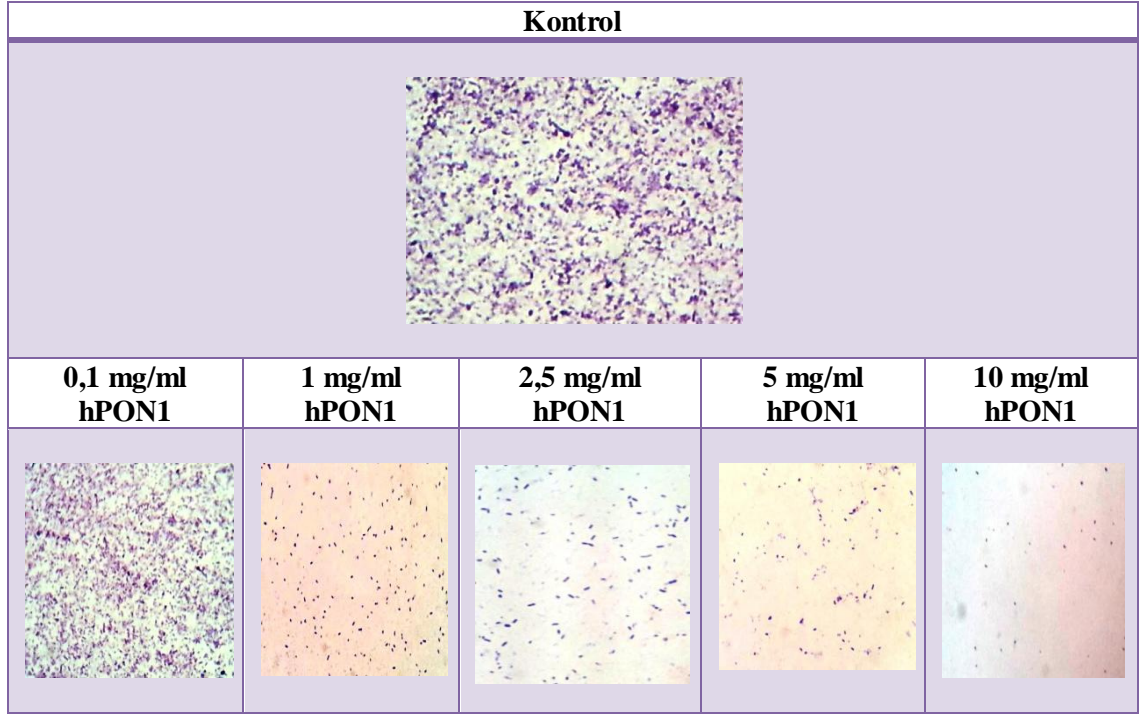


**Şekil 4.18.** Biyofilm oluşumuna farklı zaman dilimlerinde hPON1 enziminin etkisi (0: Kontrol)



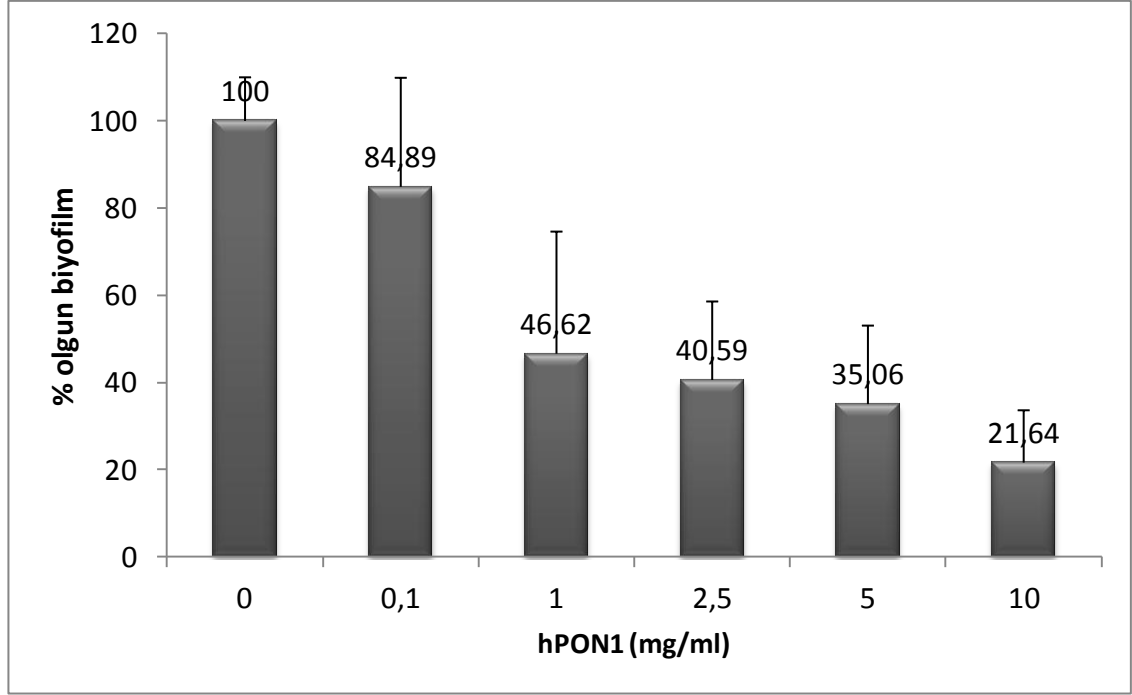
**Şekil 4.19.** 24 saatlik biyofilm oluşumuna hPON1 enziminin antibiyofilm etkisi (0: Kontrol)

Biyofilm oluşumunda hPON1 enziminin etkisi mikroskopik analizle de teyit edilmiştir. Mikroskop görüntülerinde hücre konsantrasyonundaki azalma biyofilm oluşumunun hPON1 enziminin etkisi ile azaldığını göstermektedir (Şekil 4.20).



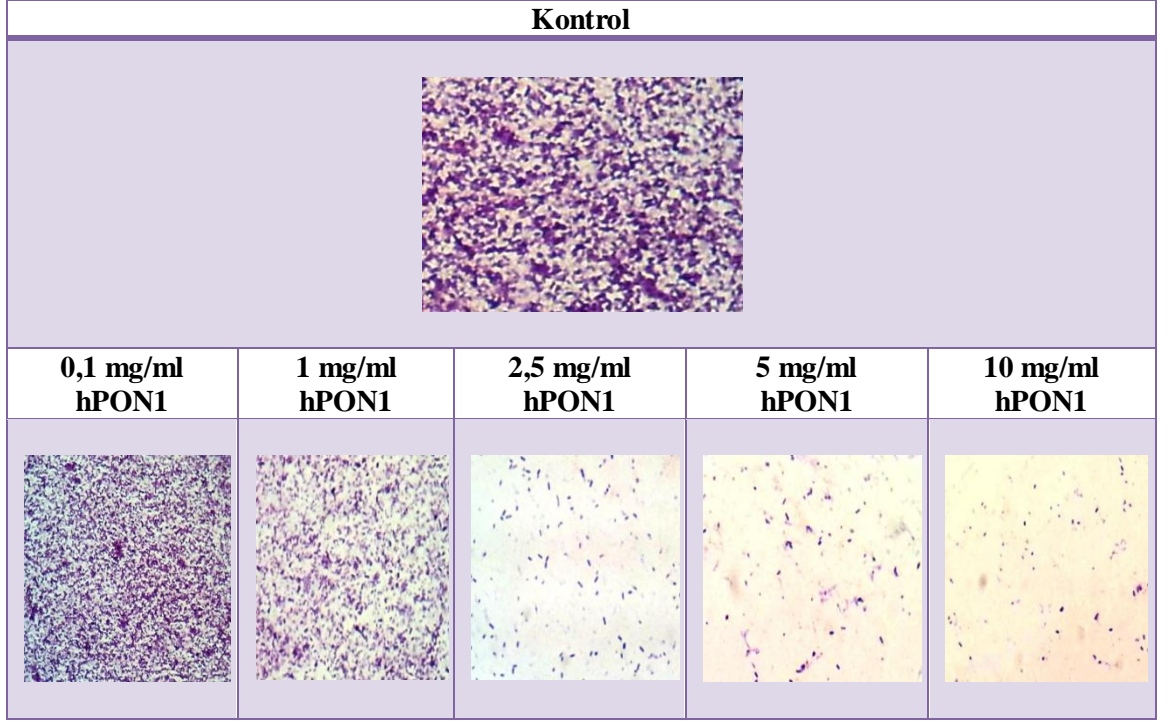
**Şekil 4.20.** hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında biyofilm oluşumunun ışık mikroskopunda görünümü (100X)

Biyofilm oluşumu, sinyallerle düzenlenen yüzeye tutunma, mikrokoloni oluşması, hücre dışı polisakkarit bileşenlerin üretilmesi, olgunlaşma ve diğer bölgelere yayılma şeklinde süreçlerden oluşur. Buna bağlı olarak *Pseudomonas* kültürlerinde olgun biyofilmler oluşturulduktan sonra ortama ilave edilen hPON1 enziminin antibiyofilm etkisi tespit edilmiştir. hPON1 enzimi olgun biyofilmlerde 1 mg/ml konsantrasyonda % 46,62 oranında biyofilm oluşumunu azaltarak önemli ölçüde etkili olmuştur (Şekil 4.21). Buna rağmen hPON1 enzimi bakterinin yüzeye tutunduğu aşama olan biyofilm oluşum aşamasında çok daha etkili olmuştur.



**Şekil 4.21.** Olgun biyofilmlere hPON1 enziminin antibiyofilm etkisi (0: Kontrol)

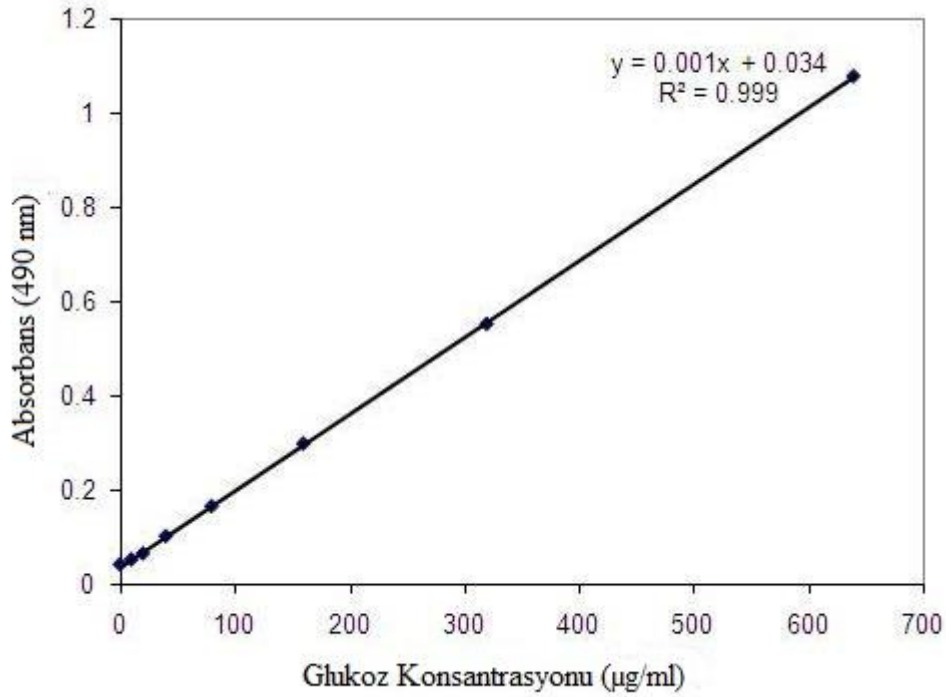
Olgun biyofilmlerde hPON1 enziminin antibiyofilm etkisi mikroskop görüntülerindeki azalan hücre yoğunluğuyla da teyit edilmiştir (Şekil 4.22). Artan enzim konsantrasyonuna bağlı olarak azalan hücre yoğunluğu dikkat çekmektedir.



**Şekil 4.22.** hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında olgun biyofilmlerin ışık mikroskopunda görünümü (100X)

#### 4.8.3. EPS yıkımı

Biyofilm, temel olarak mikroorganizma ve ekstrasellüler polimerik madde (EPS) oluşur. EPS biyofilmdeki tüm karbonun yaklaşık % 50-90'ını oluşturur ve biyofilmin ana matris kısmını oluşturduğu kabul edilir. Olgun biyofilm örneklerinden EPS ekstraksiyonu sağlanarak farklı konsantrasyonlarda (0,1; 1; 2,5; 5; 10 mg/ml) hPON1 enzimi ile muamele edilmiştir. Protein ve glukoz standartları kullanılarak hPON1 enzimi ile muamele edilmiş ve edilmemiş EPS örneklerindeki karbonhidrat ve protein içeriği hesaplanmıştır (Şekil 4.23). hPON1 enziminin EPS yıkımına sebep olduğu azalan karbonhidrat ve protein içeriği ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). EPS'nin büyük bir kısmı karbonhidrat olduğundan karbonhidrat içeriğindeki önemli azalma dikkat çekmektedir.



Şekil 4.23. Karbohidrat tayini için glukoz standardı

Çizelge 4.6. hPON1 enzimi içeren EPS örneklerinde protein ve karbohidrat miktarı

hPON1 konsantrasyonu (mg/ml)	EPS' deki protein miktarı ( µg/ml)	EPS 'deki karbohidrat içeriği (µg/ml)
<b>0 ( Kontrol )</b>	279,6 ± 0,056	1914 ± 0,121
<b>0,1</b>	280,1 ± 1,14	1703 ± 1,17
<b>1</b>	245,6 ± 5,77	1268 ± 7,11
<b>2,5</b>	195,7 ± 7,13	988,6 ± 4,12
<b>5</b>	189,9 ± 2,66	987,3 ± 2,9
<b>10</b>	163,37 ± 0,024	902 ± 0,083

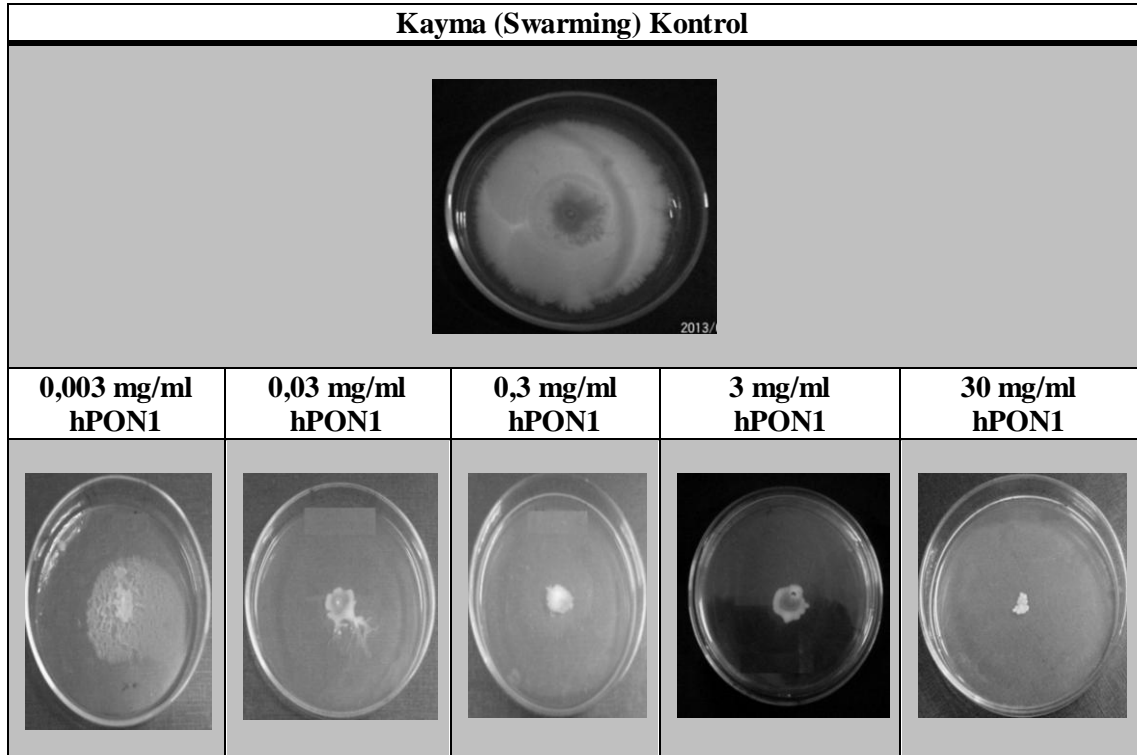
#### 4.9. *Pseudomonas aeruginosa* Hareketliliği Üzerine hPON1 Enziminin Etkisi

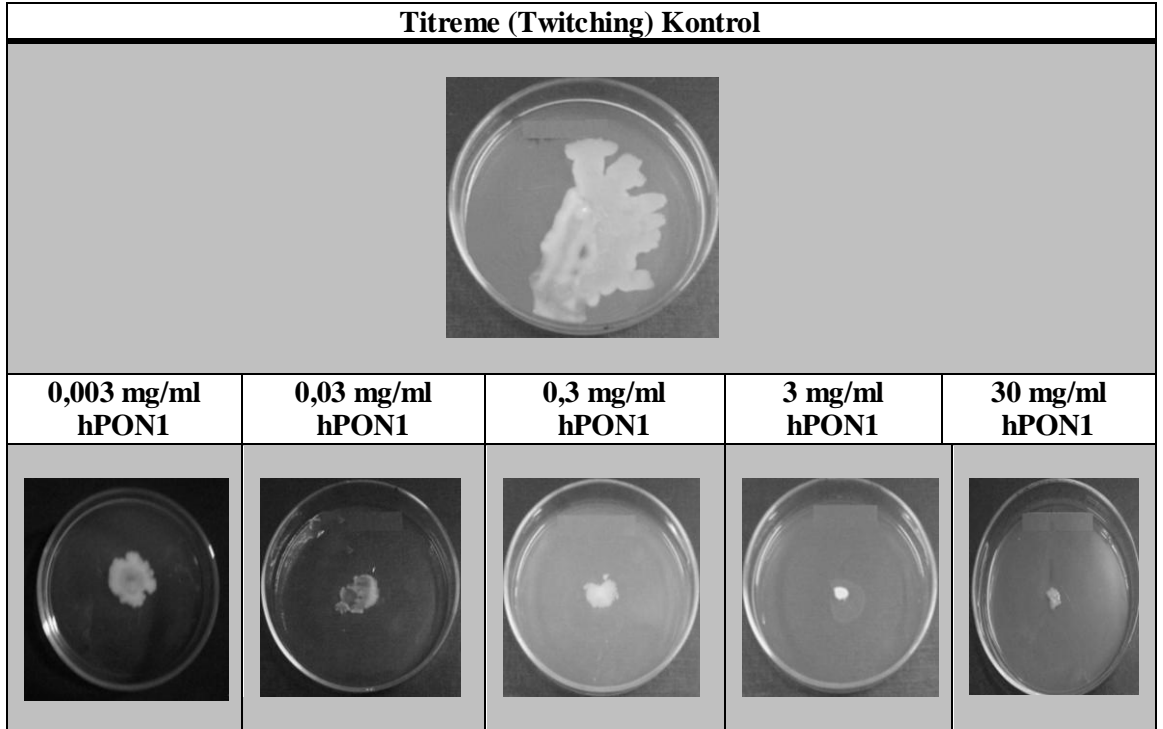
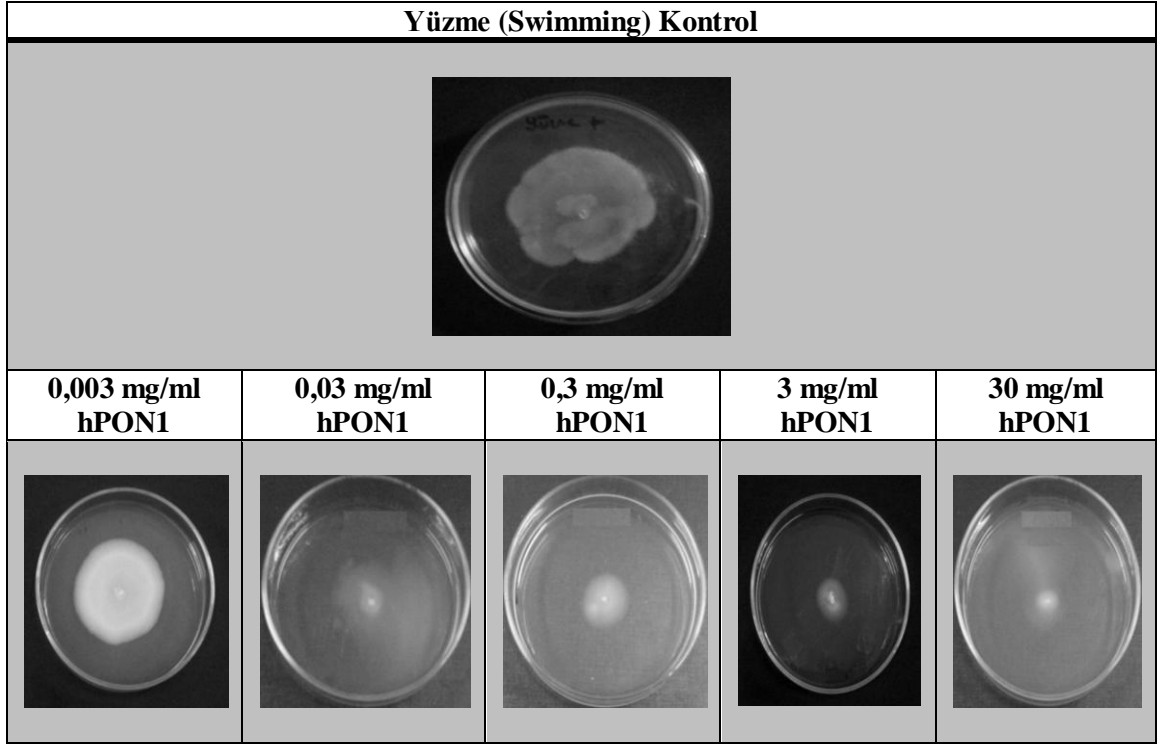
*Pseudomonas aeruginosa* hareketliliği, QS sisteminde yer alan AHL yapıdaki sinyal moleküllerine bağlıdır. Sinyal moleküllerinin hPON1 enziminin laktonaz aktivitesine bağlı hidroliz olabildiği bilinmektedir. Bu hidroliz etkisine bağlı olarak söz konusu hareket yeteneğinde hPON1 enzimi ile azalma beklenmektedir. hPON1 enziminin bakteri hareketliliğine etkisi azalan zon çapları ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). En önemli etki titreme ve kayma hareketleri üzerine olmakla beraber yüzme hareketinde de önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.24). % hareketliliğe bakıldığında 3

$\mu\text{g/ml}$  hPON1 enzimi varlığında bakteri % 16,5 titreme ve % 28,6 kayma hareketi sergileyebilmiştir. Yüzme hareketi ise 30  $\mu\text{g/ml}$  hPON1 enzimi ile % 36,6 şeklindedir (Şekil 4.25). Zon çaplarına bakıldığında hareketlilik üzerine enzim oldukça etkili bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

**Çizelge 4.7.** *P. aeruginosa* titreme, kayma ve yüzme davranışlarının zon çapları

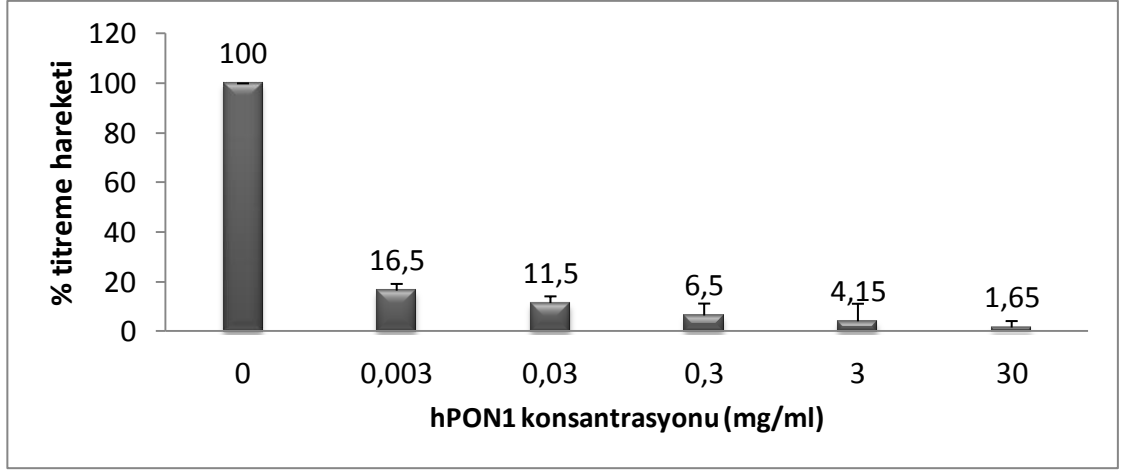
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Hareketlilik Zon Çapları			
hPON1 konsantrasyonu (mg/ml)	Titreme (mm)	Kayma (mm)	Yüzme (mm)
<b>0 (Kontrol)</b>	40 $\pm$ 0	30 $\pm$ 0	30 $\pm$ 0
<b>0,003</b>	6,7 $\pm$ 1,1	8,7 $\pm$ 1,5	21 $\pm$ 2,3
<b>0,03</b>	4,7 $\pm$ 1,1	5,7 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 2,6
<b>0,3</b>	2,7 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
<b>3</b>	1,7 $\pm$ 2,9	1,7 $\pm$ 1,5	5,3 $\pm$ 0,5
<b>30</b>	0,7 $\pm$ 1,1	1 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 1,7



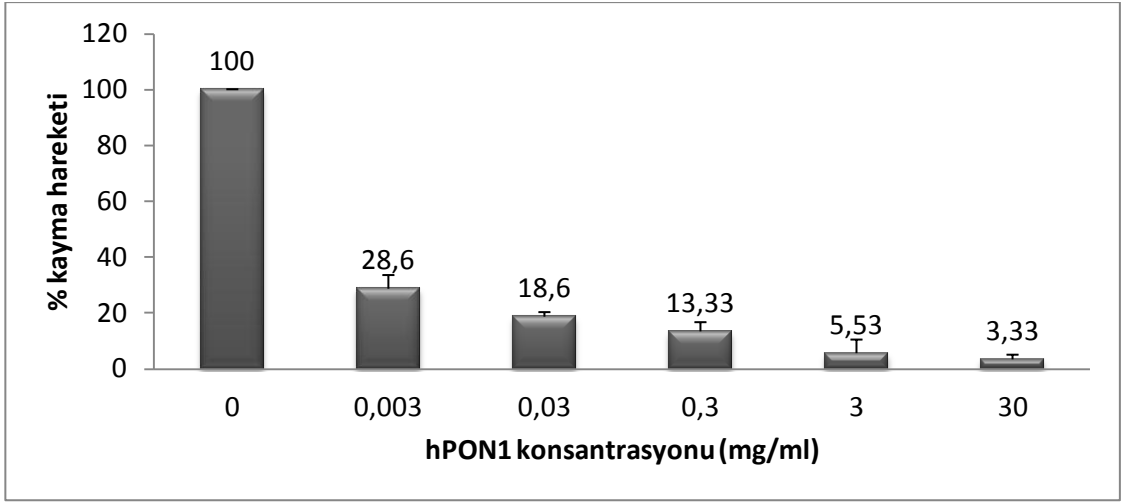


**Şekil 4.24.** Kayma, yüzme, titreme hareketlerine hPON1 enziminin etkisini gösteren petri görüntüleri

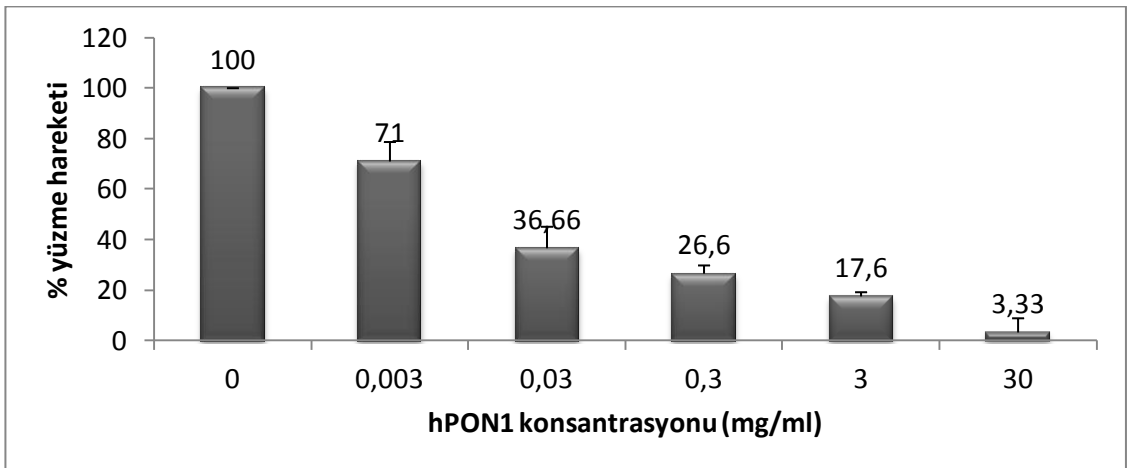




(a)



(b)



(c)

Şekil 4.25. hPON1 enziminin (a) titreme, (b) kayma ve (c) yüzme hareketine etkisi (0:Kontrol)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

QS sisteminin en fazla araştırıldığı bakterilerden biri *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*, virulansın quorum sensing ile nasıl düzenlendiğini gösteren çarpıcı bir örnektir. İnsanlarda önemli infeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa* birçok QS sistemine sahiptir. *P. aeruginosa*'da çeşitli virülans faktörlerinin üretiminin de sinyal iletim sistemi QS ile kontrol edildiği bilinmektedir (Grossi ve Dalla 2006, Matsukawa ve Greenberg 2004). Pek çok çalışmada *P. aeruginosa* patojenitesinde QS sisteminin katkısı tanımlanmıştır (Steindler ve ark. 2009, Tielen ve ark. 2011). *P. aeruginosa*'nın patojenitesi hücre yüzeyi ile ilişkili; kirpik, pili (fimbriya), lipopolisakkarit (endotoksin), alginat ve hücre dışına salgılanan proteazlar (elastaz, alkali proteaz), hemolizinler (ramnolipid ve fosfolipazlar), toksinler (ekzoenzim S ve ekzotoksin A) ve piyosyanin gibi virülans faktörlerine bağlıdır (Rumbaugh ve ark. 1999, Gupta ve ark. 2011, Wiener-Kronish ve Pittet 2011).

İnsanlarda farklı tipte pek çok infeksiyona neden olan *P. aeruginosa*'nın virülans mekanizması da sinyal moleküllerinin üretimi doğrultusunda QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle *P. aeruginosa* suşlarında bu sinyal moleküllerinin üretimi virülans faktörlerinin üretilmesi yani patojenitenin oluşturulması açısından önem taşımaktadır (Ulusoy 2007).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, bakteriler arası iletişim sisteminin bozulması durumunda bakterilerin koordineli davranamayacakları, konakta kolonize olma yeteneklerinin azalacağı ve bunun sonucunda başarılı bir infeksiyon süreci ortaya koyamayacaklarını göstermektedir. Günümüzde bakteriyel infeksiyonlar ile savaş için tercih edilen antibiyotik kullanımı gibi klasik yöntemler protein sentezi, DNA replikasyonu ve hücre duvarı sentezi gibi bakteriler için önemli işlemleri engelleyerek onları öldürerek yok etme temeline dayanmaktadır. Ancak bu yöntemler bir süre sonra antibiyotiklere karşı dirençli populasyonların ortaya çıkmasına, bu da kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalması, dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi, direncin yayılması ve ekonomik kayıplar ile sonuçlanmaktadır (Rasko ve Sperandio 2010). Bu durumda yapılacak olan antibiyotiklerle bakterileri öldürmek değil, QS sistemlerini bloke edip bakteriyel infeksiyonları tedavi etmek ve kontrol

altında tutmak olmalıdır. Bu amaçla şimdiye kadar yapılan bazı çalışmalarla *P. aeruginosa*'da ve diğer bazı önemli patojen bakterilerde QS sistemini bloke eden bazı maddeler tanımlanmıştır. Ancak bu maddelerin konağa karşı toksik olması veya konak tarafından tolere edilemeyecek konsantrasyonlarda etkili olmaları sebebiyle tedavide kullanılmaları mümkün değildir. Tanımlanmış QS sistemini engelleyici bileşenlerin çoğu insan kullanımına uygun değildir. Toksikite ve canlı içindeki etki testleri potansiyel adayları azaltmıştır. Örneğin; halojenlenmiş furanonlar son derece toksik ve reaktif olmaları sebebiyle endüstride, tıpta ve tarımda kullanılmaları mümkün değildir (Saraçlı 2006). Bu nedenle insan kullanımına uygun QS inhibitörleri geliştirilmelidir. Bu şekilde QS inhibitörleri geliştirildiğinde bu moleküller üremeyi direk olarak etkilemeyecekleri için dirençli bakteri gelişimi önlenecek ve konakta mevcut faydalı bakterilerin de yok edilmesi engellenmiş olacaktır. Ayrıca bu moleküllerin mevcut antibiyotiklerle kullanılmasının da onların etkisini arttıracığı düşünülmektedir.

Araştırmalar bazı antimikrobiyal maddelerin anti QS ajanı olarak aktivite gösterebildiğini belirlemiştir. Bir çalışmada 12 farklı antimikrobiyal maddenin subinhibitör konsantrasyonlarında QS inhibitör etkisi araştırılmış ve QS sinyal molekülü üreten bir *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır. İncelenen antimikrobiyal maddelerin üçünde (azitromisin, seftazidim ve siprofloksasin) yüksek aktivite saptanmış ve bunların *P. aeruginosa* suşundaki QS ile regüle edilen virulans faktörleri üretimini de azalttığı belirlenmiştir (Skindersoe ve ark. 2008).

Paraoksonaz (PON) enzimlerinin *Burkholderia*, *Yersinia*, *Serratia* ve *Aeromonas* gibi birçok patojenik bakteri tarafından üretilen AHL yapıdaki sinyal moleküllerini hidrolizlediği bilinmektedir (Draganov ve ark. 2005, Cataldi ve ark. 2007, Stoltz ve ark. 2007, Aybey 2010). Ayrıca insan paraoksonazlarının laktonaz aktivitesi 30 farklı non-AHL tipi lakton üzerinde de gösterilmiştir (Teiber ve ark. 2003). AHL sinyal moleküllerini hidrolizleyebilmesi PON enzimlerinin AHL inaktivasyonunda öncül enzimler olabileceğini göstermektedir.

Antibiyotik direnci çok fazla olan *P. aeruginosa*'nın, QS sistemi ile düzenlediği virulans faktörlerini, antibiyotikler yerine tıbbi açıdan oldukça önemli enzimlerden biri

olan PON1 enzimi ile kontrol altına almak yeni antimikrobiyal tedavi yöntemleri oluşturmak için umut verici bir yaklaşımdır. PON1 enzimi, özellikle patojen bakterilerden *P. aeruginosa* üremesine direk etki etmemesi, yalnızca sinyal moleküllerini hidroliz ederek virulans faktörleri, biyofilm ve patojenite de etkili motilite davranışlarını azaltarak kontrol altında tutmak suretiyle insan kullanımına uygun bir QS inhibitörü olarak görülmektedir (Greenberg ve ark. 2004, Stoltz ve ark. 2007).

Bu çalışmada da yeni bir antimikrobiyal olan hPON1 enziminin *P. aeruginosa* ATCC35032 suşunun virulans faktörleri ekzoproteazlar (alkali proteaz, elastaz, LasA proteaz), piyosiyenin, ramnolipid üretimine ve biyofilmler ile patojenitede önemli rol oynayan kayma, yüzme ve titreme hareketlerini üzerine etkisi araştırılmıştır.

hPON1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak 115,69 kat saflaştırılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi olarak laboratuvarında daha önce sentezlenen sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin jeli kullanılmıştır (Sinan ve ark. 2006, Aybey 2010). Kullanılan saflaştırma yöntemi iki aşamalı olup literatürde bilinen pek çok yöntemle göre daha kısa sürede gerçekleşmekte ve yüksek derecede saflık sağlamaktadır (Furlong ve ark. 1991, Gan ve ark. 1991). Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen hPON1 enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. hPON1 enziminin minimum molekül ağırlığını Gan ve ark. (1991) 43 kDa olarak belirlemişlerdir. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir (Furlong ve ark. 1991, Mackness ve ark. 1998, Aviram ve ark. 1999).

Bakteriler durağan faza geldiğinde ortamdaki hem sinyal moleküllerinin hem de bu moleküller sayesinde sentezlenen diğer moleküllerin en yüksek konsantrasyonda bulunduğu bilinmektedir (Avcı 2008). Buna bağlı olarak durağan fazda olan bir kültür veya bu kültürden alınan süpernatant taze bir besiyerine eklenecek olursa, ortamda biriken QS sinyal moleküllerinin etkisinin gözlemlenebileceği düşünülmektedir (Avcı 2008). Çalışmada *P. aeruginosa* ATCC35032, *P. aeruginosa* ATCC27853 ve *P. aeruginosa* ATCC9027 suşları kullanılmış ve her birinin üreme eğrilerinden durağan faz süreleri tespit edilmiştir. En kısa sürede durağan faza (24. saat) ulaşan suş *P.*

*aeruginosa* ATCC35032 olarak belirlenmiştir. Durağan faz süresi bakteriyel kültüründe bulunan sinyal molekülü konsantrasyonu hakkında bilgi verdiğinden söz konusu suşun çalışmanın diğer aşamalarında kullanılması yapılan çalışmaları da hızlandırmıştır.

hPON1 enziminin sinyal moleküllerini hidrolizleyerek *P. aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM2318, *Escherichia coli* ATCC11230 ve *Staphylococcus aureus* ATCC6538P gibi çeşitli patojenlerin üreme yoğunluklarını azalttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Aybey 2010). Bu çalışmada ise hPON1 enziminin *Pseudomonas* suşlarının üremelerine etkisi araştırılarak en etkili suş yine *P. aeruginosa* ATCC35032 belirlenmiş ve devam eden çalışmalarda yararlanılmak üzere aktif olarak kullanılmıştır.

Bakteriler sahip olduğu çok sayıdaki enzimleri ve toksinleri ile konağın farklı dokularında etkili olurlar. *P. aeruginosa* da birçok sayıda hücre dışı proteaz enzimi üretmektedir. Proteazlar doku harabiyeti oluşturduklarından, aynı zamanda bakterinin dokular arasında yayılımını kolaylaştırır, immunoglobulinler ve komplemanın proteolizine de neden olur (Gürler 2008). Alkali proteaz akut infeksiyon sürecinde ve *P. aeruginosa*'nın neden olduğu doku hasarında önemli rol oynamaktadır (Delden ve Iglewski 1998). Dolayısıyla alkali proteaz gibi hücre dışı proteazların üretimlerini kontrol altına almak ya da aktivitelerini etkilemek patojenitenin engellenmesi açısından önemli olacaktır. Yapılan çalışmada besiyortamında oluşan berrak zon çapları alkali proteaz aktivitesinin bir göstergesidir. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında alkali proteazın üretimi engellenmiş ve aktivitesinde önemli ölçüde düşüş gözlenmiştir.

Diğer iki ekzoproteaz olan LasA proteaz ve elastaz üretimine ise hPON1 enziminin etkisine bakılmış ve önemli bir etki ile karşılaşılmamıştır. Bunun sebebinin LasA proteaz ve elastazın birer ekstraselüler enzim olması ve iki enzimin sinerjistik çalışmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Grande ve ark. 2007). *P. aeruginosa*'nın elastaz üretimi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerden biri *P. aeruginosa*'nın büyüme hızıdır. Elastazın büyük kısmı hücre büyümesinde geç logaritmik fazda veya hücre yoğunluğu arttığı zaman olmaktadır. Logaritmik fazda hızlı hücre büyümesi olur. Bu fazda üreme hızı sabit olup, bakterinin antibiyotik etkisine duyarlılığı en yüksek, hücre boyutları en küçüktür (Jaffar ve ark. 1995). Bu bilgilere dayanılarak geç logaritmik fazda sinyal molekülü konsantrasyonu ile beraber elastaz

enzimi de maksimum düzeyde olacağından *P. aeruginosa*'nın geç logaritmik fazdaki önkültürleri deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Böylece hPON1 enziminin sinyal moleküllerini hidrolizlemek yoluyla elastaz üretimini kısmen de olsa azalttığı yapılan çalışmayla tespit edilmiştir.

Elastaz, LasA proteaz ve alkali proteaz enzimlerinin üretimi QS sisteminin kontrolü altındadır. *P. aeruginosa*'da QS sisteminin virulans faktörleri ile ilgili genleri regüle ettiği in vitro koşullarda belirtilmiştir. Las sistemi elastaz, alkali proteaz, LasA proteaz, biyofilm, katalaz gibi proteinlerin oluşumunu, Rhl sistemi ise elastaz, Las A proteaz proteinlerinin oluşumunu kontrol etmektedir (Karatuna ve Yağcı 2008). Alkali proteaz için *P. aeruginosa* yalnızca Las sistemini kullanırken, elastaz ve LasA proteaz için hem Las hem de Rhl sistemlerini kullanmaktadır. Bunun da hPON1 enziminin alkali proteaz üretimine karşı oldukça etkili olurken, diğer iki proteaza karşı daha az etkili olmasının sebebi olabileceği düşünülmektedir.

Piyosiyanın mavi renkli bir fenazin türevidir. *P. aeruginosa* için karakteristiktir. Asidifikasyonla rengi sarıya dönebilir, alkali ortamlarda ise renksizleşebilir. Suda ve kloroformda erir. Sıvı besiyerlerinden yapılmış bakteri kültürlerine eşit miktarda kloroform eklenir ve çalkalanırsa bu pigment besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak koyu mavi renkte gözlenir. 37 °C'de 5 gün inkübe edilen *P. aeruginosa* suşlarının % 80'i piyosiyonin oluşturduğu ve oda sıcaklığında 3-4 gün bırakıldığında agar kültürlerinde pigmentasyonda artış gözlenmiştir (Wilson ve Miles 196, Aydın 2001). Piyosiyanın üretimi çalışmalarında literatürde belirtilen 24-48 saat yerine (Prithiviraj ve ark. 2005), 120 saatlik uzun periyodlar kullanılmıştır (Dergez ve ark. 2014). Bu bilgilere dayanarak *P. aeruginosa* suşu piyosiyanın besiyerinde hPON1 enziminin farklı konsantrasyonları ile 120 saate kadar üretilmiş ve kültürlerin piyosiyanın ürettiği besiyerinde oluşan mavi-yeşil renk oluşumu ile belirlenmiştir. 72-120. saatlerdeki kültürlerin ürettiği piyosiyanın konsantrasyonları spektrofotometrik olarak tespit edilmiş ve hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerlerindeki piyosiyanın miktarının artan enzim konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Essar ve ark. (1990) *P. aeruginosa* PAO1 ve bu suşun mutantlarında piyosiyanın üretimini spektrofotometrik olarak belirlemişlerdir. Kültürlerin piyosiyanın miktarını mililitrede mikrogram olarak bildirmişler ve buna göre bu suşların piyosiyanın miktarını *P. aeruginosa* PAO1 6,30 µg/ml, *P. aeruginosa* PADE E1 5,44 µg/ml, *P. aeruginosa* PADE A47 2,13 µg/ml, *P. aeruginosa* PADE A48 1,45 µg/ml ve *P. aeruginosa* PADE A47E1 0,02 µg/ml olarak bulmuşlardır. Bu araştırma ile karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* ATCC35032 19,37 µg/mL piyosiyanın miktarı ile çok daha önemli düzeyde piyosiyanın üretmiş ve bu piyosiyanın miktarı hPON1 enziminin 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5 mg/ml şeklindeki artan konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır.

Piyosiyanın birçok bakteri türüne karşı antibiyotik özellik göstererek *P. aeruginosa*'nın bulunduğu ortamda rekabet şansını artırır ve *Pseudomonas spp.* tarafından diğer bakterilere karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılır (Hassan ve Fridovich 1980). Yapılan araştırmalar piyosiyanınin ölüme sebep olan bir virulans faktörü olduğunu ve salisilik asidin piyosiyanın üretimini inhibe ettiğini göstermektedir (Prithiviraj ve ark. 2005). Aynı zamanda birçok makrolid antibiyotiklerinin (eritromisin, klatromisin ve azitromisin) piyosiyanın sentezine etkileri araştırılmış ve yalnızca azitromisinin piyosiyanın sentezini baskıladığı tespit edilmiştir (Molinara ve ark. 1993). Salisilik asit ve türevlerinin *P. aeruginosa* tarafından üretilen piyosiyanine etkisi düşük konsantrasyonlarda (0.1-1 mM) olmakla beraber, bu etki 24 saat için geçerlidir (Prithiviraj ve ark. 2005, Bandara ve ark. 2006). Dergez ve ark. (2014) yaptığı çalışmayla aspirin ve sodyum salisilatın piyosiyanın üretiminde önemli ölçüde azalmaya sebep olduğu sonucuna varmışlardır ve bu etki 72 saat için geçerlidir. Salisilik asit *P. aeruginosa*'nın uzun süre hayatta kalmasına imkan vermiştir. Bu yüzden yüksek konsantrasyonlarda salisilik asit kullanımı ile piyosiyanın inhibisyonu mümkün olmuştur. Bu bilgilere dayanarak piyosiyanın üretimine hPON1 enzimi de salisilik asit çalışmalarına benzer şekilde 1,25 mg/ml gibi yüksek konsantrasyonlardan itibaren önemli etki göstermiştir.

Ramnlipid molekülleri biyofilm oluşumunda etkili olan ve bakterilerin bulunduğu ortamda daha uzun süre yaşamlarını sürdürmelerini sağlayan önemli biyosürefektan

moleküllerdir. QS sistemi, besin kaynaklarının kısıtlı olduğu durumlarda ramnolipid üretimini uyararak, besin kaynaklarının bulunduğu ortamlara doğru bakterinin hareketine imkan sağlamaktadır (Ulusoy 2007). *Pseudomonas* spp. suşlarının biyosümfektan (ramnolipid) üretimi üzerine yapılan çalışmalar, ramnolipid sentezinin ikincil metabolizma ile ilişkili olduğunu ve ikincil metabolitlerin sentezinin üremenin durgunluk fazına erişmesi ile arttığını göstermektedir. Ramnolipid moleküllerinin yoğun olduğu uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra yüksek ramnolipid sentezine üretimin 24, 90 ve 120 saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır (Syldatk ve Wagner 1987, Mercade ve ark. 1993). Bu çalışmada ramnolipid üretim zamanı olarak 48-72 saat tercih edilmiş ve hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarında üretilen ramnolipid moleküllerinin besiortamında bulunan CTAB ve metilen mavisiyle kompleks oluşturması esasına göre artan hPON1 konsantrasyonunda azalan ramnolipid-CTAB-metilen mavisi kompleksi dikkat çekmiştir.

*P. aeruginosa* ham yağların çoğunluğunun doğrudan veya ortama ramnolipid ilavesiyle dolaylı olarak biyodegradasyonunu sağlarlar (Beal ve Betts 2000). Bu özellikten faydalanarak Morikawa ve ark. (2000)'nin kullandığı yöntemle benzer şekilde bitkisel yağ üzerine ramnolipid içeren bakteri süpernatantı damlatılmış ve yayılma zonu ramnolipid aktivitesi olarak kabul edilmiştir. hPON1 enziminin farklı konsantrasyonlarını içeren bakteri süpernatantlarının ramnolipid aktivitesinin, hPON1 içermeyen süpernatantın ramnolipid aktivitesine göre daha düşük olduğu, azalan zon çaplarıyla belirlenmiştir. Bu da hPON1 içeren süpernatantlarda daha az miktarda ramnolipid oluştuğunu göstermektedir.

Biyofilm bakterileri antibiyotiklerin etkilerine çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları ve mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir (Donlan ve Costerton 2002). Davides ve ark. (1998), AHL gibi sinyal moleküllerinin biyofilm oluşumunda ve ortama yapışmasında etkili olduğunu ve yeni tedavi yöntemlerinin bu molekülleri engellemeye yönelik olması gerektiğini bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan yeni çalışmalarla biyofilmlerin



parçalanması için enzimlerin de kullanılabilirdiği 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 (Greenberg ve ark. 2004). Biyofilmlerin antibiyotiklere direnç göstermesine karşı hPON1 enziminin en önemli özelliği, biyofilm oluşumunda ve olgun biyofilmlerde ortamda bulunan AHL yapıdaki sinyal moleküllerini hidrolizlemesiyle biyofilm oluşumunu azaltmasıdır.

Yapılan çalışmalarda Prithiviraj ve ark. (2005)'na göre salisilik asit *Arabidopsis* köklerinde *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu ve bakterilerin yüzeye tutunmalarını azaltabilmiştir. Ayrıca anaerobik biyofilmlerde biyofilm oluşumunu engelleyememesine rağmen aerobik biyofilmlerde biyofilm oluşumunu tamamen inhibe edebilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalar da salisilik asidin biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. (Dergez ve ark. 2014). Çalışmada, laktonaz aktivitesiyle AHL yapıdaki sinyal moleküllerinin hidrolizini sağlayan hPON1 enzimi *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu salisilik asit gibi inhibe edemese de önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca olgun biyofilm biyokütlesinde önemli azalmalara sebep olarak olgun biyofilmlere de etki edebilmiştir.

Goto ve ark. (1999) yapay idrar modeli kullanarak teflon katater üzerinde 24 saatte oluşturulan *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkilerine bakmışlardır. Çalışma sonucunda, 24 saat sonunda katater üzerinde oluşan biyofilm yapısı tarama elektron mikroskobu ile tespit edilmiş ve bu yapının 5 gün boyunca değişmeden kaldığı gösterilmiştir. 48 saat uygulanan antibiyotik tedavisi sonucunda birçok antibiyotiğin yaşayan canlı hücre sayısını önemli ölçüde indirmiş ya da tüm bakteriler öldürmüştür. Literatüre benzer şekilde 24 saatlik biyofilmler ve 48 saatlik olgun biyofilmler oluşturulmuştur. hPON1 enziminin biyofilm oluşumu ve olgun biyofilmlere etkisi incelendiğinde, 24 saat sonundaki % biyofilm değerlerinde önemli bir azalma görülmüştür. Ayrıca mikroskop görüntülerindeki artan hPON1 konsantrasyonuna bağlı azalan biyofilm yapmış hücre yoğunluğuyla da enzimin antibiyofilm etkisi desteklenmiştir.

Başlangıç, yapışma ve sonrasında gelen basamaklarda *Pseudomonas*lar, EPS olarak adlandırılan hücre dışı mukoid madde salgırlar. EPS, polisakkaritlerin yanında çeşitli protein ve nükleik asitlerden oluşmakla beraber, türler ve cinsler arasında farklılıklar gözlenebilmektedir (Sauer ve ark. 2002). Alginat, EPS polisakkaritlerinin majör komponentidir ve biyofilm oluşturan suşlarda alginat aşırı üretiminin bakteriye sağladığı avantajlar konusunda kesin bilgiler olmamakla beraber ortak görüş; alginatın bakteri adezyonunu kolaylaştırdığı, inflamasyon alanında bakteriyi serbest radikallerden ve makrofajlardan koruduğu yönündedir. Nivens ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmada benzer şekilde biyofilm oluşturmak için alginatın mutlak gerekli olmayıp, biyofilm mimarisinde özellikle O-asetillemiş formunun etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu literatür bilgisine dayanarak çalışmada hPON1 enzimi EPS'nin protein içeriğinden ziyade karbohidrat içeriğinde önemli azalmaya neden olmuştur. Belki de hPON1 enzimi, alginat moleküllerini etkilemek yoluyla bunu başarabilmiştir.

Quorum sensing ve virulans faktörleri ile ilgili yapılan çalışmada, çalışma kapsamına alınan *P. aeruginosa* suşu, kayma, yüzme ve titreme hareketlerine hPON1 enziminin etkisi yönünden araştırılmış ve yapılan deneylerde tüm hareket tiplerine hPON1 enziminin önemli ölçüde etki ettiği azalan zon çaplarına göre belirlenmiştir. *P. aeruginosa* sıvı besi ortamlarındaki hareketi olan yüzme hareketini kirpiği ile sağlar. Ayrıca şeker gibi ilgi duyduğu moleküllere kemotaksi hareketini de kirpiği ile gerçekleştirir. İnsanlarda ciddi infeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa*, infeksiyonun erken safhalarında konak dokuya ulaşma ve kolonizasyon için kirpiğini kullanır (Wiener-Kronish ve Pittet 2011). Yüzme hareketi ile AHL molekülleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (Parsek ve Greenberg 2005). Kirpik yardımıyla gerçekleşen yüzme hareketine hPON1 enziminin etkisi 30 mg/ml en yüksek düzeyde olmuştur. hPON1 enziminin artan konsantrasyonuna bağlı olarak da yüzme hareketi olarak gösterilen zon çapı azalmıştır.

Glessner ve ark. (1999) titreme hareketi ve QS sistemleri ile ilişkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* PAO1 suşunu kullanmışlar ve bu suşun *lasI* ve *rhII* genlerini inhibe ederek mutant suşlar oluşturmuşlardır. *P. aeruginosa* PAO1 suşunda koloninin etrafında zon oluşumuyla titreme hareketi gözlemlenirken, *rhII* geni

mutasyona uğratılmış suşta zon oluşmamış, *lasI* geni mutasyona uğratılmış suşta ise, zon çapında azalma belirlenmiştir. Hem *lasI* hem de *rhlI* genleri mutasyona uğratılmış suşta ise zon oluşumu gözlemlenmemiş, fakat her iki geni mutasyona uğratılmış bu suşun bulunduğu besiyeri ortamına Las ve Rhl sistemleri tarafından üretilen sentetik 3oxoC12HSL ve C4HSL ilave edildiğinde zon ile titreme hareketinin oluştuğu belirlenmiştir. Bu bilgilere dayanarak hPON1 enzimi 0,003 mg/ml konsantrasyonda bile, *P. aeruginosa* suşunun titreme hareketini bu hareketin oluşumundan sorumlu AHL yapıdaki sinyal moleküllerini hidrolizleyerek önemli ölçüde azaltmıştır. Hatta 30 mg/ml hPON1 enzim konsantrasyonunda *P. aeruginosa* suşu titreme hareketini neredeyse gerçekleştirememiştir.

Kayma hareketi; yarı katı, visköz yüzeylerde bakteri populasyonlarının hızlı hareketi ya da sosyal hareket olarak nitelendirilir (Deziel ve ark. 2001). Kayma hareketinin gerçekleşmesinde de ortamda, bakteriler tarafından salgılanan faktörler ve sinyal moleküllerinin artışı rol oynar. Doğal olarak kayma hareketinin meydana gelmesinde bakterinin sahip olduğu kirpik rol oynamaktadır. *P. aeruginosa* da sahip olduğu kirpiği ile kayma hareketini sağlar. *P. aeruginosa* 'da kayma hareketi QS sistemi aracılığı ile AHL molekülleri tarafından kontrol edilmektedir. Kayma populasyonu bir aktif zon olarak tanımlanabilir. Bu yüksek hücre yoğunluğu; besin, sinyal molekülleri ve bakteriler tarafından salgılanan faktörlerin konsantrasyonuna bağlı olarak kayma hareketini destekler. Tanımlanan aktif zon asimetrik bir görüntüdedir. Yani hücre yoğunluğu olduğu kadar sinyal moleküllerinin konsantrasyonu da zon içinde eşit şekilde dağılmamıştır (Netotea ve ark. 2009). hPON1 enzimi *P. aeruginosa* suşu kayma hareketine 3 µg/ml gibi en düşük konsantrasyonda oldukça etkili olmuş ve 30 mg/ml konsantrasyonda kayma hareketini neredeyse tamamen engellemiştir.

Gelecekteki araştırmalar QS mekanizmasında kilit rol oynayan ve patogenezin düzenlenmesinde etkili olan sinyal moleküllerinin baskılanması ya da üretimlerinin engellenmesine odaklanmaktadır. Bu sebeple tasarlanacak ve taranacak yeni antibakteriyel maddelerin bakterinin üremesine izin vererek sinyal moleküllerinin baskılanması ya da bu maddeler ile antibakteriyellerin birlikte kullanılması ile etkili olacağı düşünülmektedir. Ayrıca yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı olarak insan

serum hPON1 enziminde olduğu gibi, QS inhibisyonunun bakteri hücresinde virulans genlerinin ekspresyonunun engellenmesinin ve bu sayede bakteri virulans faktörlerinin üretimi ve etkisinin azaltılmasının infeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir strateji olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma verilerinin, özellikle tıbbi alanda bakteriyel hastalıklarla savaşta kullanılabilir yeni stratejilerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. AntiQS ajanı olarak hPON1 enzimi, laktonaz aktivitesi ile bakteriyi öldürmek yerine, QS sistemini bloke edip birçok virulans faktörünün de üretimini azaltmaktadır. Böylece patojen bakterilerin antibiyotiklere direnç gelişimi engellenmiş olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Akova, M. 2005.** Bakteriler arası iletişimin engellenmesi: Umut vadeden yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı. *ANKEM*, 19: 126-128.
- Allison, D.G. 2003.** The biyofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150.
- Ali, A.B., Zhang, Q., Lim, Y.K., Fang, D., Retnam, L., Lim, S.K. 2003.** Expression of major HDL-associated antioxidant PON1 is gender and regulated during inflammation. *Free Rad. Bio. & Med.*, 34: 824-829.
- Altun, H.U., Şener, B. 2008.** Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 39: 82-88.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R. 2009.** Intercellular communication in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol*, 35: 69-80.
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., Finlay, B.B. 2010.** Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol.*, 156: 2271-2282.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moor, D., Seidman, J., Smith, J. Stauhle, K., 1988.** Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley Intersciences.
- Aviram, M. 1999.** Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease?. *Mol. Med. Tod.*, 5: 381-386.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Scott, B., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.I., Newton, R.S., La Du, B. 1999.** Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. & Med.*, 26: 892-904.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M. 2000.** Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*, 101: 2510-17.
- Avcı, M.K. 2008.** *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* ' a ait quorum sensing sinyal moleküllerinin *Lactococcus lactis* 'in nisin üretimi üzerine etkisi (Quorum sensing cross talk analizi).Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Tezi, Gebze.
- Aybey, A. 2010.** Yeni bir antimikrobiyal tedavi yaklaşımı olarak insan serum paraoksonaz 1 enziminin kullanılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir.
- Aydın, F. 2001.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması.

A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.

**Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P.C., Steward, G.S.A.B., Williams, P. 1992.** N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.*, 288: 997-1004.

**Bandara, M.B.K., Zhu, H., Sankaridurg, P.R., Willcox, M.D.P. 2006.** Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47(10): 4453-4460.

**Beal, R., Betts, W.B. 2000.** Role of rhamnolipids biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 158-168.

**Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., Venturi, V. 2003.** Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.*, 180: 264-271.

**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., Weston, H.E. 2000.** Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid  $\beta$ -lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism. *J. Med. Chem.*, 43: 19.

**Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., La Du, B.N. 2000.** Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab. Dispos.*, 28: 1335-1342.

**Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Rasmussen, T.B. 2005.** Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiol.*, 151: 3873-3880.

**Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Kristiansen, S., Phipps, R., Nielsen, A.K., Jensen, P.O., Hoiby, N., Givskov, M. 2007.** Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS*, 115(8): 921-928.

**Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A., Soubes, M. 2005.** production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *J Appl Microbiol.*, 98: 456-463.

**Bodini, S.F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., Santori, F. 2009.** Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Let. Appl. Microbiol.*, 49: 551-555.

**Bosgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., Uğur, A., Ceylan, Ö. 2007.** Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Curr. Microbiol.*, 55(2): 114-118.

**Brint, J.M., Ohman, D.E. 1995.** Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas 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.*, 177 (24): 7155-7163.

**Britigan, B.E., Railsback, M.A., Cox, C.D. 1999.** The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor. implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect. Immun.*, 67 (3): 1207-1212.

**Buckling, A., Harrison, F., Vos, M., Brockhurst, M.A., Gardner, A., West, S.A., Griffin, A. 2007.** Siderophore-mediated cooperation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 62 (2): 135-141.

**Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P., Welch, M. 2002.** Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorumsensing signaling molecule. *J. Bacteriol.*, 184: 1163-1171.

**Castang, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., 7 other authors. 2004.** N-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 5145-5149.

**Camara, M., Williams, P., Hardman, A. 2002.** Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet. Infect. Dis.*, 2(11): 667-676.

**Cataldi, T.R., Bianco, G., Palazzo, L., Quaranta, V. 2007.** Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 361: 226-235.

**Coin, D., Louis, D., Bernillon, J., Guinand, M., Wallach, J. 1977.** LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: quantification by immunochemical methods. *FEMS Immunol. Med. Mic.*, 18: 175-184.

**Costerton, J.W. 1999.** Introduction to biofilm. *J Antimicrob. Agents*, 11(3-4): 217-221, discussion 237-239.

**Costerton, J.W., Donlan, R.M., 2002.** <http://cmr.asm.org/content/15/2/167/F4.expansion> (Erişim Tarihi: 23.11.2011).

**Coulthurst, S.J., Whitehead, N.A., Welch, M., Salmond, G.P.C. 2002.** Can boron get bacteria talking? *Trends Biochemical Sci.*, 27 (5): 217-219.

**Cowell, B.A., Twining, S.S., Hobden, J.A., Kwong, M.S., Fleiszig, S.M. 2003.** Mutation of lasA and lasB reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiol.*, 149 (8): 2291-2299.

**Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., Greenberg, E.P. 2004.** Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(10): 3587-3590.

**Darzins, A. 1993.** The *pilG* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator *cheY*. *J. Bacteriol.*, 175(18): 5934-5944.

**Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P. 1998.** The Involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280: 295-298.

**Deep, A., Chaudhary, U., Gupta, V. 2011.** Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *J. Lab. Physicians*, 3(1): 4-11.

**Delden, C.V., Iglewski, B.H. 1998.** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 4(4): 551-560.

**Delisa, M.P., Bentley, W.E. 2002.** Bacterial autoinduction: looking outside the cell for new metabolic engineering targets. *Microl. Cell. Fac.*, 1 (5): 1-9.

**Denning, G.M., Railsback, M.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D., Britigan, B.E. 1998a.** *Pseudomonas* pyocyanin alters calcium signalling in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 274: 893-900.

**Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., Britigan, B.E. 1998b.** *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66 (12): 5777-5784.

**Dergez, A., Füvesi, H., Koós, A., Sebestyén, P., Kesserű P. 2014.** Inhibition of exopolysaccharide biopolymer and pyocyanin virulence factors produced by *Pseudomonas aeruginosa* 1604 by salicylic compounds. *Chemical Engineering*, 58(1): 78-80.

**Deziel, E., Comeau, Y., Villemur, R. 2001.** Initiation of biofilm formation by *P. aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.*, 183(4): 1195–1204.

**Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemur, R. 2003.** *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *P. aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.*, 149: 2005–2013.

**Diggle, S.P., Gardner, A., West, S.A., Griffin, A.S. 2007.** Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal?. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 362: 1241-1249.



**Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H. 2000.** 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*, 97: 3526–3531.

**Dong, Y.H., Zhang, L.H. 2005.** Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol.*, 43: 101-109.

**Dong, Y.H., Wang, L., Zhang, L.H. 2007.** Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1204: 1201–1211.

**Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 (2): 167-193.

**Doyle, T.B., Hawkins, A.C., Mccarter, L.I. 2004.** The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 186 (19): 6341-6350.

**Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., La Du, B.N. 2000.** Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J. Biol. Chem.*, 275: 4435-4442.

**Draganov, D.I., La Du, B.N. 2004.** Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 369: 78–88.

**Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B.N. 2005.** Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.*, 46: 1239–1247.

**Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350–356.

**Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I. 2001.** Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 473-480.

**Eberhard, A. 1972.** Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.*, 109: 1101-1105.

**Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neelson, K.H., Oppenheimer, N.J. 1981.** Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.*, 20: 2444-2449.

**Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., Crawford, I.P. 1990.** Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol.*, 172: 884–900.

**Favre-Bonte, S., Chamot, E., Kohler, T., Romand, J.A., Van Delden, C. 2007.** Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas*

*aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. *BMC Microbiol.*, 7 (15): 33-42.

**Federle, M.J. Bassler, B. 2003.** Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.*, 112 (9): 1291-1299.

**Fuqua, C., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2001.** Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.*, 35: 439-468.

**Fuqua, C., Greenberg, E.P. 2002.** Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 685-695.

**Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C., Crabb, J.W. 1991.** Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochem.*, 30: 10133.

**Gan, N., Smolen, A., Eckerson, W., La Du, B.N. 1991.** Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab. Dispos.*, 19: 100-106.

**Gera, C., Srivastava, S. 2006.** Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. *Curr. Sci.*, 90(5): 666-676.

**Girenavar, B., Cepeda, M.L., Soni, K.A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Patil, B.S. 2008.** Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 125: 204-208.

**Glessner, A., Smith, R.S., Iglewski, B.H., Robinson, J.B. 1999.** Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing systems in control of twitching motility. *J. Bacteriol.*, 181(5): 1623-1629.

**Gonpot, P., Smith, R., Richter, A. 2000.** Diffusion limited biofilm growth. *Modelling Simulation Material Science Engineering*, 8: 707-726.

**Goto, T., Nakame, Y., Nishida, Ohi, Y. 1999.** Bacterial biofilms and catheter in experimental urinary tract infection. *Int. Jou. Anti. Agent*, 11: 227-231.

**Grande, K.K., Gustin, J.K., Kessler, E., Ohman, D.E. 2007.** Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in the formation of a stable mature protease. *J. Bacteriol.*, 189 (11): 3960-3968.

**Greenberg, E.P., Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J. 2004.** Enzymatic inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. Cell-cell communication in bacteria. *American Society for Microbiology Conferences*, 5: 1-18.

**Griffith, O.W. 1999.** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 922-935.

- Grossi, P., Dalla Gasperina, D. 2006.** Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in critically ill patients. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 4(4): 639-662.
- Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O., Fiechter, A. 1986.** Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 443-448.
- Gupta, R.K., Setia, S., Harjai, K. 2011.** Expression of quorum sensing and virulence factors are interlinked in *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro approach. *Am. J. Biomed. Sci.*, 3(2): 116-125.
- Gürler, B. 2008.** Tıbbi Mikrobiyoloji -3-. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Hamood, A.N., Griswold, J., Colmer, J. 1996.** Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 64: 3154-3160.
- Hassan, H.M., Fridovich, I. 1980.** Mechanism of antibiotic action of Pyocyanin. *J. Bacteriol.*, 141:156-163.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lymar, S.V., Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.H., McDermott, T.R., Ochsner, U.A. 2002.** Anaerobic metabolism and quorum sensing by *P. aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 1425-1443.
- Hegele, R.A. 1999.** Paraoxonase genes and disease. *Ann. Med.*, 31: 217-224.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B. 2003.** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.*, 22: 3803-3815.
- Huang, C.T., Xu, K.D., McFeters, G.A., Stewart, P.S. 1998.** Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1526-1531.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., Leadbetter, J.R. 2003.** Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5941-5949.
- Jaffar-Bandjee, M.C., Lazdunski, A., Bally, M., Carrere, J., Chazalotte, J.P., Galabert, C. 1995.** Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (4): 924-929.
- Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B. 2005.** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.*, 7(4): 459-471.
- Karatuna, O., Yağcı, A. 2008.** *P.aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38 (1): 42-51.

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

**Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C., Peche`Re J.C., 2000.** Swarming of *P. aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.*, 182: 5990–5996.

**La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M. 1999.** On the physical role(s) of the paraoxonases. *Chem. Biol. Inter.*, 119-120, 379-388.

**Laemelli, D.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, London, 227-680.

**Lang, S., Wullbrandt, D. 1999.** Rhamnose lipids-biosynthesis microbial production a application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 (1) : 22-32.

**Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., Mavrodi, D. 2004.** *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.*, 72 (7): 4275-4278.

**Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., Zhang, L.H. 2003.** Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.*, 47: 849-860.

**Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.*, 193: 265–275.

**Lu, H., Zhu, Z., Ze, Y., Qin, J. 2006.** Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *escherichia coli* and its characterization. *Protein Express. Purif.*, 46: 92-99.

**Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness. M.I. 1998.** Human serum paraoxonase. *Gen. Pharm.*, 3: 329-336.

**Maier, R.M., Soberon-Chavez, G. 2000.** *P. aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 625-633.

**March, J.C., Bentley, W.E. 2004.** Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15: 495-502.

**Martinelli, D., Grossman, G., Sequin, U., Brand, H., Bachofen R. 2004.** Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol.*, 4(25): 1-10.

- Matsukawa, M., Greenberg, E.P. 2004.** Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.*, 186(14): 4449-56.
- Mattick, J.S. 2002.** Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 289-314.
- Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., Thomashow, L.S. 2001.** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 183 (21): 6454-6465.
- Mcgrath, S., Wade, D.S., Pesci, E.C. 2004.** Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol. Lett.*, 230: 27-34.
- Mercadé, M. E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M. J., Andrés, C. de, Guinea, J. 1993.** Olive Oil Mill Effluent (OOME). New Substrate for Biosurfactant Production, *Bioresource Technol.*, 43: 1-6.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B., Defago, G., 2003.** Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45: 71–81.
- Molinari, G., Guzmán, C.A., Pesce, A., Schito, C. 1993.** Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors sub inhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31: 681- 688.
- Moraes, I.O., Benincasa, M., Alegre, R.M. 2002.** Production and characterization of rhamnolipids produced by a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz. J. Food Technol.*, 5: 145-149.
- Morihara, K., Tsuzuki, H. 1977.** Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients. *Infect. Immun.*, 15 (3): 679-685.
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T. 2000.** A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta/Mol. Cell Biol. Lipids*, 1488: 211–218.
- Murray, T.S., Egan, M., Kazmierczak, B.I. 2007.** *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr. Opin. Pediatr.*, 19 (1): 83-88.
- Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J.W. 1970.** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *J. Bacteriol.*, 104: 313-322.
- Netotea, S., Bertani, I., Steindler, L., Kerenyi, A., Venturi, V., Pongor, S. 2009.** A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an activation zone. *Biol. Direct*; 4(6): 1-16.

**Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B., 2008.** inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med. Res. Rev.*, 65-124.

**Nicas, T.I., Iglewski, B.H. 1985.** The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, 31: 387-392.

**Nithya, C., Begum, M. F., Pandian, S.K. 2010.** Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88: 341–358.

**Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., Franklin, M.J. 2001.** Role of alginate and its *O*-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.*, 183: 1047–1057.

**Ohman, D.E., Cryz, S.J., Iglewski, B.H. 1980.** Isolation and characterization of a *P.aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J. Bacteriol.*, 142: 836-842.

**Ozer, E.A., Pezzula, A., Shih, D.A., Chun, C., Furlong, C., Lusic, A.J., Greenberg, E.P., Zabner, J. 2005.** Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.*, 253: 29-37.

**Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K. 2003.** AhlD, an Nacylhomoserinelactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria. *Microbiol.*, 149: 1541–1550.

**Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Greenberg, E.P. 1999.** Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96: 4360–4365.

**Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2005.** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS Microbiol.*, 13(1): 27-33.

**Patel, R.M., Desai, A.J. 1997.** Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25: 91-94.

**Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P., Poole, K. 2007.** Influence of quorum-sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 189 (22): 8357-8360.

**Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skinderso, M. E., Givskov, M., Nielsen, J. 2005.** Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org. Biomol. Chem.*, 3: 253–262.

**Pinzon, N., Ju, L.K. 2009a.** Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnol. Lett.*, 31: 1583–1588.

**Pinzon, N.M., Ju, L.K. 2009b.** Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82: 975–981.

**Prithiviraj, B., Bais, H.P., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E.H., Dayakar, B.V., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M. 2005.** Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.*, 73(9): 5319-5328.

**Podbielski, A., Kreikemeyer, B. 2004.** Cell density-dependent regulation: basic principles and effect on the virulence of Gram-positive cocci. *Int. J. Infect. Dis.*, 8 (2): 81-95.

**Pollack, M. 1995.** *Pseudomonas aeruginosa, Principles and Practice of Infectious Diseases*, Ed.: Mandell G., Douglas, G., Bennett, J., 4 th ed. Churchill Livingstone Inc. New York, p1980.

**Poulsen, L.V. 1999.** Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss u-Technol*, 32 (6): 321-326.

**Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R. Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.T., Young, J.M. 2005.** Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 312: 417-423.

**Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., Miklos, S.M., Plotnikova, J., Tan, M.W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C.L., Topkins, R.G. 2000.** Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *PNAS*, 97(16): 8815-8821.

**Rashid, M.H., Kornberg, A., 2000.** Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4885- 4890.

**Rasko, D., Sperandio, V. 2010.** Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9: 117-128.

**Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, K te, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005.** Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.*, 187(5): 1799-1814.

**Rasmussen, T.B., Givskov, M., 2006a.** Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiol.*, 152: 895–904.

**Rasmussen, T.B., Givskov, M. 2006b.** Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Inter. J. Med. Microbiol.*, 296: 149-161.

**Reading, N.C., Sperandio, V. 2006.** Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 254: 1–11.

**Reverchon, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A., Cotte-Pattat, N. 2002.** New synthetic analogues of *N*-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 1153–1157.

**Ritchie, A.J., Yam, A.O., Tanabe, K.M., Rice, S.A., Cooley, M.A. 2003.** Modification of *in vivo* and *in vitro* T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.*, 71: 4421–4431.

**Ritchie, A.J., Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P., Cooley, M.A. 2005.** The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect. Immun.*, 73: 1648–1655.

**Rocha, M.V.P., Oliveira, A.H.S., Souza, M.C.M., Gonçalves, L.R.B. 2006.** Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World J. Microb. Biot.*, 22: 1295–1299.

**Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H., Hamood, A.N. 1999.** Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burnwound infections. *Infect. Immun.*, 67 (11): 5854–5862.

**Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N. 2000.** The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.*, 14: 1721–1731.

**Saraçlı, M.A. 2006.** Quorum sensing: mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. *Gülhane Tıp Dergisi*, 244–250.

**Sakuragi, Y., Kolter, R. 2007.** Quorum sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 189: 5383–5386.

**Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.*, 184 (4): 1140–1154.

**Schaber, J.A., Carty, N.I., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A., Hamood, A.N. 2004.** Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 53 (9): 841–853.

**Schauder, S., Bassler, B.L. 2001.** The languages of bacteria. *Genes & Development*, 15: 1468–1480.



**Schaeber, A.L., Hanzelka, B.L., Eberhard, A., Greenberg, E.P. 1996.** Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*: Probing autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.*, 178: 2897-2901.

**Seed, P.C., Passador, L., Iglewski, B.H. 1995.** Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.*, 177 (3): 654–659.

**Shirtliff, M.E., Mader, J.T., Camper, A.K. 2002.** Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.*, 9: 859-871.

**Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R. 2006.** The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.*, 62 (5): 1264-1277.

**Siegmund, I., Wagner, F. 1991.** New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *BioTechniques*, 5: 265-268.

**Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Sarma, B.K., Singh, H.B. 2009.** Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L. *Food Chem. Toxicol.*, 1-9.

**Sinan, S., Kockar, F., Arslan, O. 2006.** Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglycoside derived antibiotics. *Biochimie.*, 88(5): 565-574.

**Skindersoe, M.E., Alhede, M., Phipps, R., Yang, L., Jensen, P.O., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen T., Hoiby, N., Givskov, M. 2008.** Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(10): 3648-3663.

**Stein, G.E. 2005.** Antimicrobial resistance in the hospital setting: impact, trends, and infection control measures. *Pharmacotherapy*, 25: 44–54.

**Steindler, L., Venturi, V. 2007.** Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol. Lett.*, 266(1): 1-9.

**Steindler, L., Bertani, I., Sordi, L., Schwager, S., Eberl, L., Venturi, V. 2009.** LasI/R and RhlI/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. *App. Environ. Microbiol.*, 75(15): 5131-5140.

**Stewart, P.S. 2003.** Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.*, 185 (5): 1485-1491.

**Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J., Fuqua, C. 1998.** Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (9): 3486-90.

**Stoltz, D.A., Ozer, E.A., Ng, C.J., Yu, J.M., Reddy, S.T., Lulis, A.J., Bourquard, N., Parsek, M.R., Zabner, J., Shih, D.M. 2007.** Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 292: 852–860.

**Sugo, H., Smithy, K.M. 2003.** Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7(5): 586–591.

**Syldatk, C., Wagner, F. 1987.** Production of biosurfactants In Biosurfactants and Biotechnology. (ed.) N. Kosaric, W. L. Cairns and N. C. C. Gray, M. Dekker, *New York*, 89-120.

**Szabo, M.A., Varga, G.Z., Hohman, J., Zsuzsanna, S., Szegedi, E., Amaral, L., Molnar, J. 2010.** Inhibition of quorum sensing signals by essential oil. *Phytother. Res.*, 24: 782-786.

**Tateda, K., Matsumoto N., Furuya N., Nagashima T. 1996.** Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolids: exposure-dependent bactericidal activity and inhibition protein synthesis by erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 2271-2275.

**Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B. 2003.** Lactonase and lactonizing activities human serum paraoxonase(PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 887–896.

**Teiber, J.F., Horke, S., Haines, D.C., Chowdhary, P.K., Xiao, J., Kramer, G.L., Haley, R.W., Draganov, D.I. 2008.** Dominant role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.*, 2512-2519.

**Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S.A.B., Bycroft, B.W., Pritchard, D. 1998.** The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, has immunomodulatory activity, *Infect. Immun.*, 66: 36–42.

**Thomas, P.W., Stone, E.M., Costello, A.L., Tierney, D.L., Fast, W. 2005.** The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochem.*, 44: 7559–7569.

**Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Schobert, M., Wiehlmann, L., Jahn, D. 2011.** Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 301(4): 282-292.

**Todar, K. 2004.** *Pseudomonas*. “Todard’s Online Textbook of Bacteriology”. *Science Magazine*, 304: 1421-1425.

**Toutain, C.M., Zegans, M.E., O'toole, G.A. 2005.** Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 187 (2): 771-777.

**Truchado, P., Gil-Izquierdo, A., Tomas-Barberan, F., Allende, A. 2009.** Inhibition by chestnut honey N-acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 11186-11193.

**Truchado, P., Lopez-Galvez, F., Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Allende, A. 2009b.** Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.*, 115: 1337-1344.

**Ulusoy, S. 2007.** Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretimini Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Isparta.

**Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A. 2003.** Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plantpathogenic bacteria. *Microbiol.*, 149: 1981–1989.

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

**Vasil, M.I., Ochsner, U.A. 1999.** The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron. genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.*, 34 (3): 399-413.

**Venturi, V. 2006.** Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *Fems Microbiol. Rev.*, 30(2): 274-291.

**Wagner, D.I. 2005.** Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chem. Biochem.*, 6: 2195–2206.

**Wagner, V.E., Iglewski, B.H. 2008.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, 35: 124-134.

**Watnick, P., Kolter, R. 2000.** Biofilm city of microbes. *J. Bacteriol.*, 182: 2675-2679.

**Wiener-Kronish, J.P., Pittet, J.F. 2011.** Therapies against virulence products of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 32(2): 228-235.

**William, P. 2007.** Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiol.*, 153: 3923-3938.

- Wilson, S.G., Miles, A.A. 1964.** Principles of Bacteriology and Immunity. 636-643. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.
- Winzer, K., Hardie, K.R., Williams, P. 2002.** Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch!. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5: 216-222.
- Wretling, B., Sjoberg, L., Wadstrom, T. 1977.** Protease deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: pleiotropic changes in activity of other extracellular enzymes. *J. Gen. Microbiol.*, 103: 329-336.
- Wolfgang, M.C., Jyot, J., Goodman, A.L., Ramphal, R., Lory, S. 2004.** *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *PNAS*, 101(17): 6664-6668.
- Xavier, K.B., Bassler, B.L. 2003.** LuxS quorum sensing: more just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6: 191-197.
- Yang, F., Wang, L.U., Wang, J., Dong, Y.H., Hu, J.Y., Zhang, L.H. 2005.** Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mamalian species. *FEBS Lett.*, 579: 3713-3717.
- Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C. 2002.** N-acylhomoserinelactones undergo lactonolysis in a pH, temperature, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 70: 5635-5646.
- Zhang, L.H., Dong, Y.H. 2004.** Quorum sensing and signal interference: Diverse implications. *Mol. Microbiol.*, 53: 1563-1571.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aynur AYBEY  
Doğum Yeri ve Tarihi :Bursa /02.01.1985  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Yıldırım Nuri Erbak Lisesi/2003  
Lisans : Balıkesir Üniversitesi/2007  
Yüksek Lisans : Balıkesir Üniversitesi/2010  
İletişim : [aybeyaynur@gmail.com](mailto:aybeyaynur@gmail.com)

Yayımları :

**Erzengin, M., Basaran, I., Cakir, U., Aybey, A., Sinan, S. 2012.** In vitro inhibition effect of some dihydroxy coumarin compounds on purified human serum paraoxonase 1 (PON1). *Appl Biochem Biotechnol*, 168:1540–1548.

