

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ BİTKİ EKSTRAKLARININ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA'DA ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Eylem YURT GÖZE

Danışman: Doç.Dr.Gülgün TINAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA-2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
TEŞEKKÜR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Gram Negatif Bakterilerde Çevreyi Algılama Mekanizması.....	5
2.1.1.Çevreyi Algılama Sistemini Kullanan Organizma Grupları.....	6
2.1.1.1. <i>Vibrio fischeri</i> 'de Çevreyi Algılama.....	6
2.1.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'te Çevreyi Algılama.....	8
2.1.1.3. <i>Chromobacterium violaceum</i> 'da Çevreyi Algılama.....	9
2.1.1.4. <i>Escherichia coli</i> 'de Çevreyi Algılama.....	10
2.1.1.5. <i>Erwinia carotovora</i> 'da Çevreyi Algılama.....	11
2.1.1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Çevreyi Algılama.....	13
2.2. Çevreyi Algılama Mekanizmasının Düzenlediği Fenotipler.....	18
2.3. Çevreyi Algılama Sistemi Moleküllerindeki Çeşitlilik.....	21
2.4. Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri.....	22
2.4.1. Doğal Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri.....	26
2.5. Çevreyi Algılama Engelleyicilerinin Tedavideki Yeri.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Materyaller.....	34
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	34
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	35
3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşları.....	36
3.1.4. Besiyerleri ve Çözeltiler.....	36
3.2. Yöntemler.....	37
3.2.1. Bakteri Suşlarının Üretimi ve Saklanması.....	37

	Sayfa
3.2.2. Besiyerlerinin ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3.2.2.1. Katı ve Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması.....	38
3.2.2.2.Yumuşak Agarın Hazırlanması.....	38
3.2.3. Bitkilerin Toplandığı Alanlar, Bitkilerin Özellikleri ve Yetiştirme Şartları	38
3.2.4. Bitki Ekstraksiyonu için Gerekli Malzemeler ve Hazırlanması.....	45
3.2.5. Bitki Örneklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MİK).....	46
3.2.6. AHL Moleküllerinin Tespiti.....	47
3.2.6.1. Ramnolipid Üretimi Testi.....	47
3.2.6.2. Kayma Testi.....	47
3.2.6.3. Elastaz Testi.....	48
3.2.6.4 .Proteaz Testi.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	50
4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Belirlenen Bitkiler.....	50
4.2. İndikatör Suşlarda N-butanol-L-homoserin lakton (BHL) ve N 3(okzododekanol)-L-homoserin lakton (OdHL) Sinyal Moleküllerinin Üretimi.....	52
4.3. İndikatör Suşlarda İnhibisyon Gösteren Bitki Ekstraktları ve Kuyucuk Testi Bulguları.....	53
4.4. <i>P. aeruginosa</i> 'da Ramnolipid Üretimi ve Bulgular.....	55
4.5. <i>P. aeruginosa</i> 'da Kayma (Swarming) Testi ve Bulgular.....	56
4.6. <i>P. aeruginosa</i> 'da Elastaz Üretimi ve Bulgular.....	58
4.7. <i>P. aeruginosa</i> 'da Proteaz Zon Çapları Bulguları.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
6. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	70

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ BİTKİ EKSTRAKLARININ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Eylem YURT GÖZE

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Jüri: Doç.Dr.Gülgün TINAZ (Danışman)

Doç.Dr.Ayşegül KUBİLAY

Yrd.Doç.Dr.Gülşen ULUKÖY

Patojen bakteriler konağı enfekte etmek ve hastalık oluşturmak için bir seri virülens faktörü üretirler. Birçok farklı Gram pozitif ve Gram negatif patojenin, virülens faktörlerinin üretimini koordine etmek için küçük, difüze olabilen N-açıl homoserin lakton (AHL) türevi sinyal molekülleri üretmek suretiyle birbirleriyle haberleştikleri bilinmektedir. Çevreyi algılama (quorum sensing QS) olarak adlandırılan bu olayın biyoluminesans, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli fizyolojik işlemlerin regülasyonunda kullanıldığı keşfedilmiştir. Günümüzde biyoteknolojik çalışmalar, AHL antagonistlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Tıpta bu tip moleküllerin kullanımı, hücreler arası haberleşmenin bloke edilerek virülensin azaltılması ve dolayısıyla enfeksiyonların kontrolüne fırsat verecek yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülmektedir.

Gram negatif bakterilerde çevreyi algılama sistemini bloke ettiği bilinen, kırmızı bir deniz alginden (*Delisea pulchra*) izole edilen halojenlenmiş furanonlardır. Furanonların bu özelliklerinin keşfi, yüksek yapılı bitkilerin de çevreyi algılama sistemini bloke edebileceği olasılığını gündeme getirmiştir. Furanonlardan başka birkaç karasal bitkinin daha bakterilerin çevreyi algılama sistemini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, Türkiye’de (Alanya ve Isparta bölgesinde) yetişen ve tıbbi öneme sahip 13 aromatik bitki toplanarak, farklı bakteri türlerinde QS’le düzenlenen davranışları inhibe edip etmediği araştırıldı. Çeşitli çözücüler kullanılarak elde edilen 39 bitki ekstraktının, *C. violaceum* CV026 ve *Beechams ESS* indikatör suşları kullanılarak, 10 bitkinin AHL sinyal molekülü üretimi üzerine bir etkisinin olmadığı, 3 bitkinin (kekik bitkisinin kloroform ve etil asetat ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı) AHL üretimi üzerine etkisinin olduğu saptandı. Bu bitki ekstraktlarının çok önemli bir insan patojeni olan *P. aeruginosa*’da *las* ve *rhl* sistemlerinin etkisinde olan elastaz aktivitesi, kayma, ramnolipid üretimi ve proteaz aktivitesi gibi davranışları engelleyebildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *P. aeruginosa*, Çevreyi Algılama, N-Açıl- Homoserin lakton, Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri.

2009, 70 sayfa

ABSTRACT
M.Sc. Thesis

**INVESTIGATION OF EFFECTS OF VARIOUS PLANT EXTRACTS ON
QUORUM SENSING SYSTEM IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Eylem YURT GOZE

**Suleyman Demirel University Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Thesis Committee: Assoc.Prof.Dr. Gülgün TINAZ (Supervisor)
Assoc.Prof.Dr. Ayşegül KUBİLAY
Asst.Prof.Dr. Gülşen ULUKÖY

To infect a host and cause disease bacteria produce an array of virulence determinants that contribute to pathogenesis. It is now known that many different Gram positive and Gram negative pathogens communicate via production of small, diffusible N- acyl homoserine lactone (AHL) derivative signalling molecules, to coordinate virulence determinant production. This event is quorum sensing. A variety of physiological process in a range of bacterial species is regulated by quorum sensing. Examples include bioluminescence, antibiotic biosynthesis, conjugation, the production of virulence determinants and biofilm differentiation in animal and plant pathogens. Biotechnological research is now focused on the development of AHL antagonists. In medicine, usage of such molecules represents a novel therapeutic approach offering the opportunity to attenuate virulence, and thus infection, by blocking cell-to-cell communication. To date, the only known anti-quorum sensing compounds are halogenated furanones isolated from the red alga *Delisea pulchra*. The discovery of these effects of furanones raised the possibility that higher plants might also block quorum sensing systems of bacteria. Besides furanones, a few terrestrial plants have also been shown to have anti-quorum sensing activity. In this work, for their ability to inhibit QS-regulated behaviors in different bacterial species we tested 13 terrestrial plants which have medical and aromatic importance and which are grown in Turkey, (Alanya and Isparta region). Plant materials were dried and 39 plant extracts extracted using different solvents. It is found that 10 plants have no influence on the production of AHL signal molecule by using *C. violaceum* CV026 and *Beechams ESS* indicator strain. Chloroform extract and Ethyl acetate of extract of *Thymus sp*, Chloroform extract of *Lavandula sp*, Ethanol extract of *Salvia sp*, and are found that 3 plants have influence on the production of AHL signal molecule. It is proved that elastase activity which is under the influence of the systems of *las* and *rhl* in *P. aeruginosa* that is so important a human pathogen of these plant extracts, in other words, that is regulated by QS, elastase activity, swarming, production of rhamnolipid and protease activity and such these attitudes can be blocked by these extracts.

Key Words: *P. aeruginosa*, Quorum sensing, N-Acyl-Homoserine lactone, Quorum Sensing Inhibitors.

2009, 70 sayfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. 2 genin aktivasyonu ile meydana gelen hücreden hücreye sinyal mekanizması.....	5
Şekil 2.2. a) <i>Euprymna scolopes</i> (mürekkep balığı) b) <i>Euprymna scolopes</i> üzerindeki ışık organı.....	6
Şekil 2.3. <i>V. fischeri</i> 'de Çevreyi algılama.....	7
Şekil 2.4. <i>V. fischeri</i> 'de biyoluminesans.....	7
Şekil 2.5. <i>A. tumefaciens</i> 'teki Ti plazmidi tarafından bitki hücresi içine T-DNA'nın transferi A) <i>Agrobacterium</i> hücresi, B) <i>Agrobacterium</i> DNA'sı, C) Ti Plazmid, a) T-DNA, b) virülens geni, c) replikasyon merkezi, d) opin katabolizması, D) Bitki hücresi, E) Bitki mitokondrisi, F) Bitki kloroplastı, G) Bitki hücresi nükleusu.....	8
Şekil 2.6. <i>C. violaceum</i> 'un elektron mikroskop görüntüsü.....	9
Şekil 2.7. a) <i>E. coli</i> 'nin elektron mikroskop görüntüsü, b) <i>E. coli</i> 'nin büyümesi ve bölünmesi.....	10
Şekil 2.8. <i>E. carotovora subsp. Atroseptica</i>	11
Şekil 2.9. <i>E. carotovora</i> 'nın sebep olduğu hastalıklar.....	11
Şekil 2.10. <i>E. carotovora</i> 'da car gen takımı.....	12
Şekil 2.11. <i>P. aeruginosa</i> 'nın şematik görünümü.....	13
Şekil 2.12. Quorum sensing ve biyofilm oluşumu a) Biyofilm oluşum basamakları, b) <i>P. aeruginosa</i> 'da Confocal mikroskoptan alınmış bir resmi.....	14
Şekil 2.13. <i>P. aeruginosa</i> 'da çevreyi algılama sisteminin düzenlenmesi ile virülens faktörleri ve Kistik Fibrozis ile ilişkileri. ROS, reaktif oksijen türevleri; PMN, polimorfonükleer lökosit (nötrofil).....	17
Şekil 2.14. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Quorum Sensing sistemi aşamaları.....	17
Şekil 2.15. Bakterilerin kullandığı bazı N-açıl homoserin laktonlar.....	21
Şekil 2.16. <i>Delisea pulchra</i> 'dan izole edilen halojenlenmiş furononlar.....	23
Şekil 2.17. <i>P. aeruginosa</i> 'nın sinyal moleküllerinin ve analoglarının yapıları.....	23

Şekil 2.18. <i>P. aeruginosa</i> 'da çevreyi algılamayı engelleyen AHL analogları (H, L, M, N).....	24
Şekil 2.19. <i>E. coli</i> 'de biyofilm oluşumunu engelleyen QS inhibitörleri Z) Ursolik asit X) 7-hidroksiindol.....	24
Şekil 2.20. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunan QS engelleyiciler.....	26
Şekil 2.21. A) Birçok Gram Negatif bakteri tarafından sinyal molekülü olarak kullanılan açillenmiş homoserin laktonların basit yapısı. B) Mantar olan <i>P. coprobium</i> 'dan izole edilen bir QS engelleyici Patulin C) 30 bileşenli furanon D, <i>P. aeruginosa</i> 'da las sistemin doğal sinyal molekülü (3-oxo-C12 HSL) E) Las sistemin bir antagonisti olarak görev yapan 3-oxo-C12 HSL'nin bir analogu F) zayıf antagonistik etkisi olan AHL analogu G) Güçlü antagonistik etkisi olan AHL analogu.....	27
Şekil 2.22. Sarımsaktan elde edilen ve <i>P. aeruginosa</i> 'da çevreyi algılama sistemini engelleyen AHL analogları, T ve U: LuxR sistemine antagonist çalışan engelleyiciler V ve Y: LuxI sistemine antagonist çalışan engelleyiciler.....	28
Şekil 2.23. QS modelleri ve Sinyal engelleme mekanizmaları A) Gram Negatif LuxR tipi QS sisteminde LuxI proteini (I) AHL sinyallerinin sentezini katalizler. Bakteriyel hücrelerin çoğalmasıyla biriken AHL sinyalleri LuxR'ye bağlanarak sinyal vermeye başlar. LuxR-AHL kompleksi hedef genlerin ifadesini teşvik eder. B) LuxR tipi QS sistemlerine karşı sinyal engelleme mekanizmalarına örnekler.....	33
Şekil 3.1. Bitkilerin toplandığı yerleri gösteren harita.....	39
Şekil 3.2. Defne bitkisinin görüntüsü.....	39
Şekil 3.3. Acı yavşan bitkisinin görüntüsü.....	40
Şekil 3.4. Kırmızı soğan bitkisinin görüntüsü.....	40
Şekil 3.5. Adaçayı bitkisinin görüntüsü.....	41
Şekil 3.7. Nane bitkisinin görüntüsü.....	42
Şekil 3.8. Sarımsak bitkisinin görüntüsü.....	42
Şekil 3.9. Mersin bitkisinin görüntüsü.....	43
Şekil 3.10. a) Tesbih bitkisinin görüntüsü b) Tesbih tohumunun görüntüsü.....	43
Şekil 3.11. Lavanta bitkisinin görüntüsü.....	44

	Sayfa
Şekil 3.12. Siyah çay bitkisinin görüntüsü.....	44
Şekil 3.13. Yeşil çay bitkisinin görüntüsü.....	45
Şekil 4.1. Nane bitkisinin kloroform ekstraktı ile kuyucuk testi a) <i>Beechams</i> ESS’de b) <i>C. violaceum</i> CV026’da.....	52
Şekil 4.2. Siyahçay bitkisinin kloroform ekstraktı ile kuyucuk testi a) <i>Beechams</i> ESS’de b) <i>C. violaceum</i> CV026’da.....	52
Şekil 4.3. Kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının kuyucuk testi a) <i>Beechams</i> ESS’de b) <i>C. violaceum</i> CV026’da.....	53
Şekil 4.4. Adaçayı bitkisinin etanol ekstraktının kuyucuk testi a) <i>Beechams</i> ESS’de b) <i>C. violaceum</i> CV026’da.....	53
Şekil 4.5. Lavanta bitkisinin kloroform ekstraktının kuyucuk testi a) <i>Beechams</i> ESS’de b) <i>C. violaceum</i> CV026’da.....	54
Şekil 4.6. Kekik bitkisinin kloroform ekstraktının kuyucuk testi a) <i>Beechams</i> ESS’de b) <i>C. violaceum</i> CV026’da.....	54
Şekil 4.7. <i>P. aeruginosa</i> ’da a) lavanta ve kekik bitkisinin kloroform ekstraktının b) kekik bitkisinin etil asetat ve adaçayı bitkisinin etanol ekstraktlarının c) bitki ekstraktı eklenmemiş besiyerinde ramnolipid üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan test.....	55
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> ’da a) lavanta bitkisinin kloroform ekstraktının b) kekik bitkisinin kloroform ekstraktının c) kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının d) adaçayı bitkisinin etanol ekstraktının e) bitki ekstraktı olmayan besiyerinde kayma hareketi üzerine etkisinin testi.....	57
Şekil 4.9. <i>P. aeruginosa</i> ’da a) lavanta bitkisinin kloroform ekstraktının b) kekik bitkisinin kloroform ekstraktının c) kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının d) adaçayı bitkisinin etanol ekstraktının e) bitki ekstraktı olmayan besiyerinde protez üretimi üzerine etkisinin testi.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'da bulunan çevreyi algılama sistemleri ve bu sistemler tarafından kodlanan özellikler.....	16
Çizelge 2.2. Bakteriyel N-açıl homoserin laktonların ve düzenledikleri fenotiplerin bazı örnekleri.....	20
Çizelge 3.1. Kullanılan bakteri suşları, özellikleri ve kaynakları.....	36
Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan besiyeri ve çözeltilerin içerikleri.....	36
Çizelge 3.3. Bakteri suşlarının üremeleri için gerekli sıcaklık.....	37
Çizelge 4.1. <i>E. carotovora</i> , <i>C. violaceum</i> CV026 ve <i>Beechams ESS</i> suşlarında, bitki ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonlarının sonuçları.....	51
Çizelge 4.2. İndikatör suşlarda inhibisyon zonu gösteren bitki ekstraktlarının <i>P. aeruginosa</i> 'da MİK değerleri.....	52
Çizelge 4.3. <i>P. aeruginosa</i> 'da kayma testi sonuçları.....	57
Çizelge 4.4. <i>P. aeruginosa</i> 'da elastaz üretimi ve sonuçları.....	59
Çizelge 4.5. <i>P. aeruginosa</i> 'da proteaz zon çapları.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl.....	mikrolitre
mg.....	Miligram
nm.....	Nanometre
AHL.....	Açıl homoserin lakton
BHL.....	N-butanoyil-L-homoserin lakton
HHL.....	N-hekzanoyil-L-homoserin lakton
OdDHL.....	N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton
3-oxo-C12-HSL.....	N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton
C4-HSL.....	N-butanoyil-L-homoserin lakton
QS.....	Quorum Sensing
ECR.....	Elastin Kongo Red
CTAB	cetiltrimetilamonyumbromid
LB.....	Luria-Broth
OD.....	Optik dansite
PCR.....	Polimeraz zincir reaksiyonu
tris.....	Tris (hidroksimetil) amino metan
UV.....	Ultra viyole dalga boyu
QSI.....	Quorum Sensing İnhibitörleri
HPLC.....	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
MS.....	Kütle spektrofotometresi

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, değerli tecrübe ve destekleriyle bana yol gösteren Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Gülgün TINAZ'a saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar, gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım Sayın Hocam Yrd.Doç.Dr. Seyhan ULUSOY'a katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmasında kullanılan bazı bakteri suşlarını sağlayan Sayın Prof. Dr. Miguel CAMARA'ya, Dr. Steve DIGGLE'a, Dr. Thilo KOEHLER'e ve Beechams Pharmaceuticals'a teşekkürlerimi sunarım

Ayrıca, annem Semiha, babam Pekşen, kardeşlerim Özlem ve Eren'e, yeni ailemden annem Nesrin ve babam Salih Zeki ve hayatımı paylaştığım biricik eşim Engin'e gösterdikleri özveri ve desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinin imkanlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen Sayın Müdürümüz Doç.Dr. Gülgün TINAZ'a ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen laboratuvar personeli arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Eylem YURT GÖZE
ISPARTA, 2009

1. GİRİŞ

Bakteriler çevreleriyle ve birbirleriyle etkileşim yeteneğine sahip sosyal organizmalardır (Rasmussen ve Givskov, 2006). Bakteriler pH, osmolarite, besin azlığı, antibiyotik madde varlığı v.b. değişen mikroçevre koşullarına çeşitli mekanizmalar ile uyum sağlayabilirler. Bu uyum sağlamada oldukça önemli olan populasyon yoğunluğunu, sinyal molekülleri ile belirleyip değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler (Dong ve Zhang, 2005).

Sinyal molekülleri, bakteri tarafından içinde bulunduğu ortama salgılanır. Bakteriler sinyal moleküllerini salgılayabildikleri gibi, bu moleküllerin ortamdaki yoğunluğunu ölçebilen bir mekanizmaya da sahiptir. Bu mekanizmaya Çevreyi Algılama (Quorum Sensing) adı verilir. Çünkü bakteriler ortamdaki sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçerek aslında çevrelerindeki hücre yoğunluğu hakkında bilgi edinmiş olurlar (Sperandio vd., 2002; Otto, 2004; Bassler ve Losick, 2006; [http.1](http://1)).

Birçok patojen bakteri konağın özelliklerini kullanarak, konağın hem içinde hem de dışında yaşama yeteneğine sahiptir. Bu farklı ortamlarda yaşaması virülens faktörlere sahip olmayı ve bu faktörleri etkili bir şekilde düzenlemeyi gerektirir. Dört farklı düzenleme mekanizması tanımlanmıştır. Bunlar, DNA Değişiklikleri, Transkripsiyonal Düzenleme, Posttranskripsiyonal Düzenleme ve Çevreyi Algılamadır. Bu mekanizmalardan özellikle çevreyi algılama sistemi, çok iyi araştırılmakta olup hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde gözlemlendiği çalışmalarla ortaya konmuştur (Kayser vd., 2005).

Gram negatif bakterilerde çevreyi algılama sistemi, açıl homoserin laktonlar şeklinde, sinyal moleküllerinin varlığına ve üretimine bağlıdır (Rasmussen ve Givskov, 2006; Steindler ve Venturi, 2007).

Sinyal moleküllerine, üretildikleri hücrenin metabolizmasını düzenlemeleri nedeni ile otouyarıcı da denilmektedir. Sinyal molekülleri ile mikroorganizma genetik düzenlemeler yapar, çevreye adaptasyon sağlar ve virülensini kontrol etmeyi başarır.

Böylece birçok mikroorganizma konakta uygun bir bölgede etkili bir çoğunluk oluşturuncaya kadar saptanmasını geciktirebilmekte, konak yanıtından kaçabilmektedir. Bazı çevreyi algılama sistemi molekülleri bir tür ya da suşa özgü iken bazı moleküller birden fazla bakteriden salınabilmekte, hatta aynı çevreyi algılama molekülünü kullandıkları için iki bakteri birbirlerinin virülens faktörlerinin sentezine yardımcı olabilmektedir (http 16).

Çevreyi Algılama, hücre populasyon yoğunluğuna bağlı olarak, bir sensör veya transkripsiyonal aktivatörle, sinyal molekülünün etkileşimiyle, bu genlerin ekspresyonu sonucu oluşan, bakteriler arasındaki iletişim mekanizmasıdır (Dowell vd., 2001).

Bu sistemde hücreden hücreye sinyal gönderme 2 genin aktivasyonu ile mümkündür. *I* geni, sinyal molekülünün sentezinden sorumludur. Sinyal molekülü (çoğu zaman bir N-açıl homoserin lakton) hücre duvarından dışarıya doğru kolayca hareket edebilir. *R* geni çeşitli virülens genlerin transkripsiyonu için uyarıcıyla birlikte kombine olan transkripsiyonal regülatör proteini kodlar (Kayser vd., 2005).

Çevreyi algılama sistemi ilk olarak, bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*'de biyoışımaya olayıyla tanımlanmıştır. Bu bakteri biyoışımaya olayı için çevreyi algılama sistemini kullanmıştır (Waters ve Bassler, 2005).

Vibrio fischeri'de *luxI* geninin transkripsiyonu ile AHL'nin üretimi başlamakta ve düşük populasyon yoğunluğunda *luxI* bazal düzeyde ifade edilmektedir. Böylece bu üretilen AHL'ler çevrelerine yayılırlar. LuxR olarak adlandırılan aktivatör proteinler AHL'leri fark ederler ve AHL eşik konsantrasyona gelerek sinyal molekülü aktif hale gelir ve luxR ile bir kompleks oluşturur. Aktive olan reseptör-sinyal kompleksi diğer LuxR-AHL kompleksleriyle dimer veya multimerler oluştururlar. Bu dimer ve multimerler, çevreyi algılamayı düzenleyici hedef genlerin ifadesini sağlar (Rasmussen ve Givskov, 2006).

Kısacası Çevreyi algılama; bakterilerin yeterli çoğunluğa veya en az popülasyon birimine ulaştığı zaman, düşük moleküler ağırlığa sahip olan sinyal moleküllerini algılamaları için imkan veren birikme olayı şeklinde tanımlanır (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

Hastalık yapan bakterilerin bu haberleşme sistemini bozacak ya da yok edecek yolların bulunması insanlarda hastalıklara karşı önemli bir koz olacaktır. Bu şekilde tasarlanacak yeni ilaçlar, örneğin bakterilerin salgıladığı sinyal moleküllerini hedef alacak ve böylece bakterilerin etkinliği minimize edilebilecektir. Bu sayede bakterilerin vücuda zarar vermesi engellenmiş olacaktır ([http 1](http://1)).

Günümüzde çoklu antibiyotik direnci gösteren mikroorganizma infeksiyonları klinikte ciddi tedavi sorunu yaratmaktadır. Buna karşın özellikle son yıllarda yeni antibiyotik geliştirilmesi ciddi biçimde azalmıştır. Geliştirilen antibiyotikler içinde de yeni bir antibakteriyel mekanizma ile etkinlik gösteren hemen hiç yeni bir molekül yoktur.

Halen kullanılan antibiyotiklere karşı oluşan yaygın direnç gelişimi ve çoğu kere gelişen direncin farklı sınıftan antibiyotiklere karşı da direnç gelişimini kolaylaştırması, yeni antibakteriyel hedeflerin bulunması ve bu hedeflere yönelik ilaç ve stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Günümüzde infeksiyon hastalıklarının tedavisinde patojenin virülansının azaltılarak etken-konak arasındaki etkileşimin ortadan kaldırılması umut veren tedavi yaklaşımlarından birisini oluşturmaktadır. Bakterinin konakta infeksiyon hastalığı oluşturmak amacıyla ürettiği çeşitli virülens faktörleri bu amaçla kullanılabilecek önemli hedef noktalarından birisidir. Bu faktörlerin çoğunun çeşitli bakteriler için özgül olması ve konak organizmada bulunmayışı tedavinin özgüllüğünü sağlayabilecektir.

Bakteri hücrelerinde virülens genlerinin ekspresyonunun engellenmesinin ve bu sayede bakteri virülensinin azaltılmasının infeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir strateji olabileceği kabul edilmektedir. Bu amaçla örneğin *Pseudomonas. aeruginosa*'da AHL sinyal moleküllerinin tahrip edilmesi veya sentezlerinin inhibisyonu veya LuxR/AHL kompleksinin oluşumunun blokajı ile

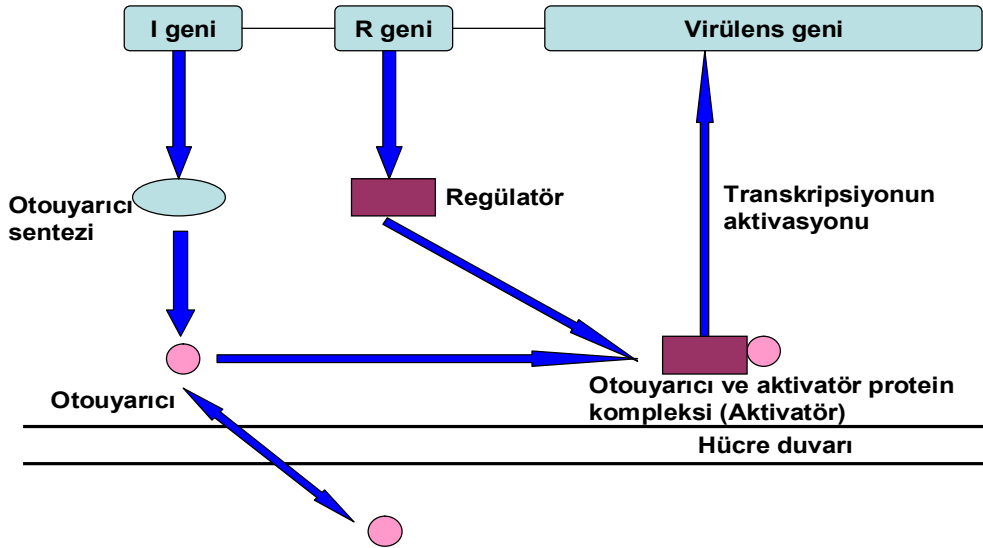
“quorum sensing” inhibisyonu yeni bir tedavi şekli oluşturabilecektir. Bu amaçla üzerinde çalışılan moleküllerden halojenlenmiş furanon türevleri en çok umut vaadedenler arasındadır. *Delisea pulchra* adı verilen bir deniz algi tarafından üretilen doğal maddeler olan halojenlenmiş furanonlar, bu yosunların bakteriler tarafından kolonize edilmesini önlemektedir. Bu tipte furanon türevlerinin çeşitli bakterilerde biyofilm üretimi dahil çeşitli AHL’ler aracılığı ile gelişen virülens faktörlerinin sentezini engelleyebildiği gösterilmiştir. Bu moleküllerin temel etki mekanizması LuxR proteininin degradasyonunu artırması olarak saptanmıştır. Ne yazık ki furanon türevleri insan ve diğer memelilerde toksik etki göstermektedir. Ancak temel etki mekanizmalarından hareketle toksik olmayan yeni türevlerin elde edilebilmesi için çalışmalar sürmektedir (Akova, 2005).

Biz de bu tez çalışması kapsamında, Türkiye’de (Alanya ve Isparta bölgesinde) yetişen ve tıbbi öneme sahip 13 aromatik bitkiyi toplayarak, farklı bakteri türlerinde QS’le düzenlenen davranışları inhibe edip etmediğini araştırdık. Çeşitli çözücüler kullanarak elde ettiğimiz 39 bitki ekstraktının, *C. violaceum* CV026 ve *Beechams ESS* indikatör suşları üzerindeki etkisini araştırdık. 10 bitkinin AHL sinyal molekülü üretimi üzerine bir etkisinin olmadığını, 3 bitkinin AHL üretimi üzerine etkisinin olduğu ortaya koyduk. Bu bitki ekstraktları şunlardır: Kekik bitkisinin kloroform ve etil asetat ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı Bu bitki ekstraktlarını çok önemli bir insan patojeni olan *P. aeruginosa*’da *las* ve *rhl* sistemlerinin etkisinde olan elastaz aktivitesi, kayma, ramnolipid üretimi ve proteaz aktivitesi gibi davranışları engelleyebildiğini tespit ettik.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Gram Negatif Bakterilerde Çevreyi Algılama Mekanizması

Bakterilerin izole olarak yaşamadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası haberleşme sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları giderek artan bir yaygınlıkla kabul edilmektedir. Bu tip hücreler arası haberleşmenin iyi karakterize edilmiş bir örneği, çevreyi algılamadır. Çevreyi algılama, bir bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izlemesine olanak veren otouyarıcı veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağlıdır (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

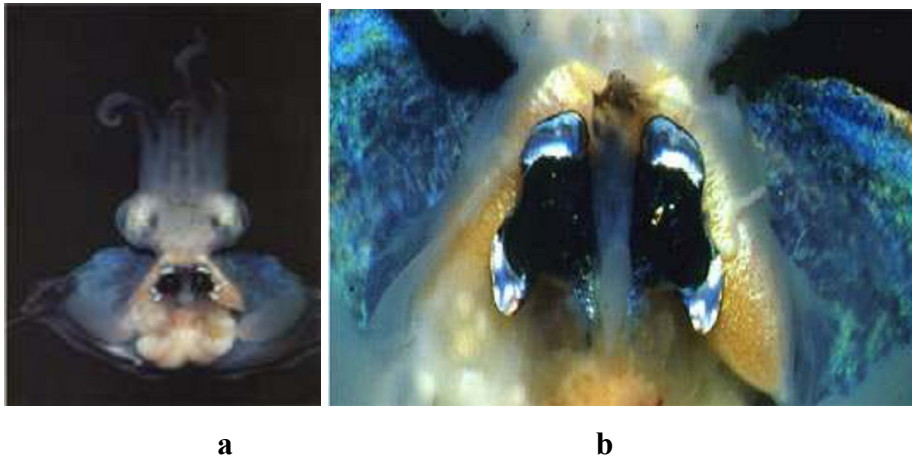


Şekil 2.1. 2 genin aktivasyonu ile meydana gelen hücreden hücreye sinyal mekanizması (Kayser vd., 2005)

2.1.1.Çevreyi Algılama Sistemini Kullanan Organizma Grupları

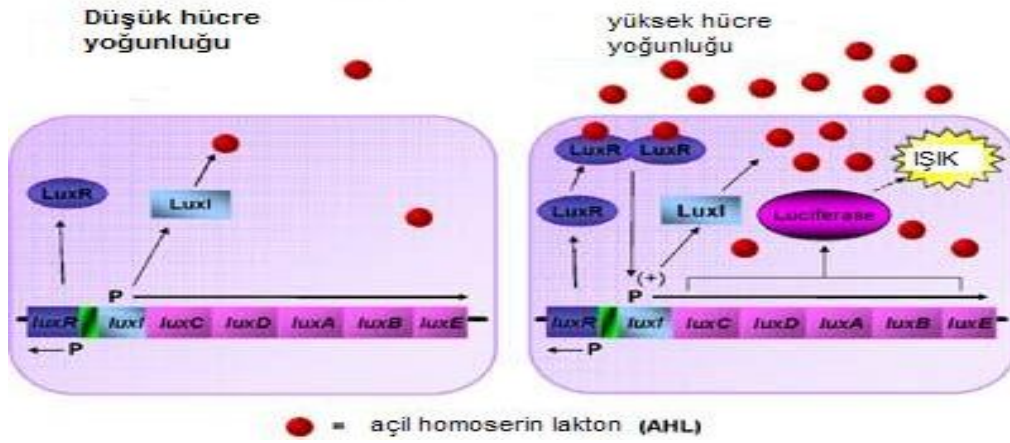
2.1.1.1. *Vibrio fischeri*'de Çevreyi Algılama

Bakterilerin birbirleri ile haberleşebildikleri ilk olarak Fuqua ve arkadaşları tarafından *V. fischeri* ile yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu bakteri normalde deniz suyunun mililitresinde 100'den az sayıda bulunan ve ışımaya yapmayan bakteridir. Ancak bakteriler bazı deniz balıklarının ışık organlarında yerleştğinde ve yüksek yoğunluğa ulaştıklarında çevreye ışık saçabilmektedirler ve bu olaya biyoluminesans denir (Daniels vd., 2003). Bu bakterinin çevreyi algılama sistemi, üzerinde çok iyi çalışılmış model bir sistemdir. *V. fischeri*, deniz suyunda cansız bir organizma gibi, mürekkep balığı, kalamar, gibi deniz canlılarının ışık yayan organlarında simbiyotik olarak yaşayan, fakültatif aerob olan, denizde biyolojik olarak ışık saçabilen bakterilerdir (Şekil 2.1)(Boşgelmez-Tınaz, 2003).



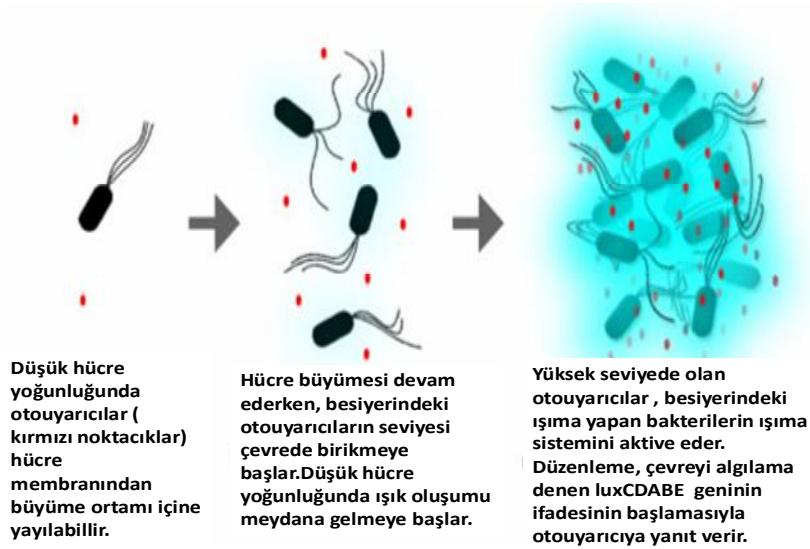
Şekil 2.2. a) *Euprymna scolopes* (mürekkep balığı) b) *Euprymna scolopes* üzerindeki ışık organı (http 2)

V. fischeri tarafından üretilen çevreyi algılama sistemi molekülü ilk kez 1981 yılında saflaştırılmış ve N-3-oxo-C₆ (3-oxohexanoyl)-homoserin lakton (açıl-HSL) yapısında olduğu gösterilmiştir (Waters ve Bassler, 2005).



Şekil 2.3. *V. fischeri*'de çevreyi algılama (http 3)

V. fischeri'de biyoluminesans gen kümesi 8 genden oluşur. (*lux A-E*, *lux G*, *lux I*, *lux R*) (Şekil 2.2). Operonun sağ tarafı, ışık üretimi ve otouyarıcı için gerekli genleri içerir. *lux I* geninin ürünü, N-L homoserin laktonun sentezi için gerekli olan otouyarıcı sentez proteinidir. Operonun sol tarafı *Lux R*, bir transkripsiyonal aktivatörden oluşur.



Şekil 2.4. *V. fischeri*'de biyoluminesans (http 4)

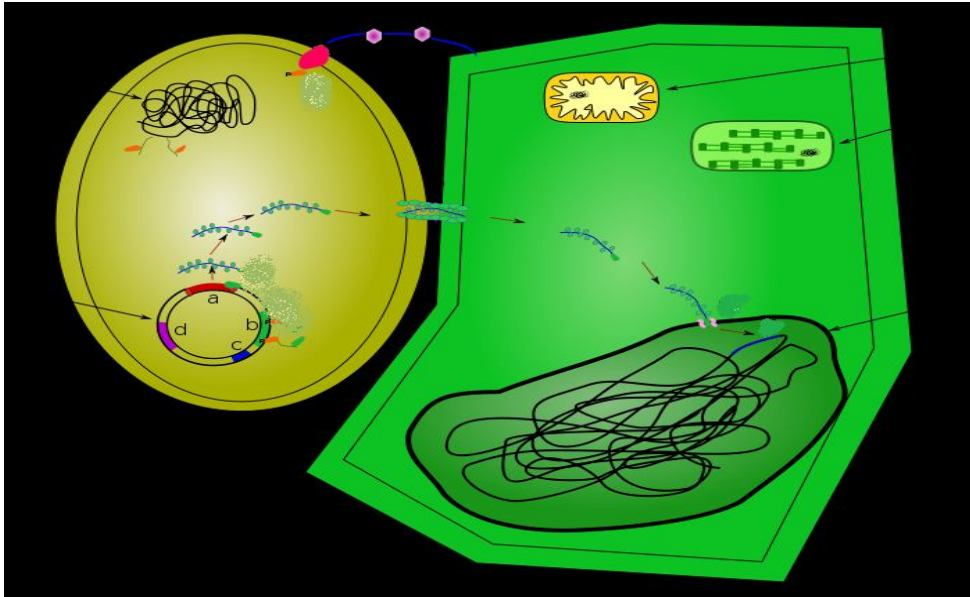
Düşük hücre yoğunluğunda *luxI* tarafından kodlanan OHHL, yeterli çoğunluğa ulaşana kadar yavaş yavaş birikir. *LuxR*/OHHL kompleksi daha sonra *luxICDABEG* operonunun transkripsiyonunu güçlü bir şekilde teşvik eder ve *lux* kutusu olarak

bilinen *luxI*'nin promotor bölgesinin akışyukarı kısmına bağlanır. Bu ışığın içeri salınmasına sebep olur ve daha fazla OHHL ve *luxI*'nin ifadesini sağlamak için öncülük eder (Şekil 2.3)(Boşgelmez-Tınaz, 2003).

2.1.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*'te Çevreyi Algılama

A. tumefaciens'teki Ti plazmid, bitki taç yapraklarında tümörlere neden olan bir plazmidtir (Waters ve Bassler, 2005).

Bu bakteri, konakçının nükleusuna transfer ettiği onkojenik DNA'sıyla, tümörlere neden olan bir Gram negatif toprak bakterisidir. *A. tumefaciens*'in asıl virülens sebebi Ti plazmid olarak bilinen büyük bir plazmidtir. Ti plazmitin T-DNA bölgesi bitki hücresinin nükleer genomu içine entegre olur. Ti plazmid üzerinde bulunan *tra* genleri LuxI ve LuxR homologu olan TraI ve TraR proteinleri ve sinyal molekülü olan N-3(okzokitonol)-L-homoserin lakton aracılığıyla aktive edilirler (Şekil 2.4)(Boşgelmez-Tınaz, 2003).



Şekil 2.5. *A. tumefaciens*'teki Ti plazmidini tarafından bitki hücresi içine T-DNA'nın transferi A) *Agrobacterium* hücresi, B) *Agrobacterium* DNA'sı, C) Ti Plazmid, a) T-DNA, b) virülens geni, c) replikasyon merkezi, d) opin katabolizması, D) Bitki hücresi, E) Bitki mitokondrisi, F) Bitki kloroplastı, G) Bitki hücresi nükleusu (http 5)

2.1.1.3. *Chromobacterium violaceum*'da Çevreyi Algılama

C. violaceum, genellikle toprak ve suda bulunan *P. aeruginosa* gibi fırsatçı, Gram negatif, patojen bir bakteridir (Gomi vd., 2006).



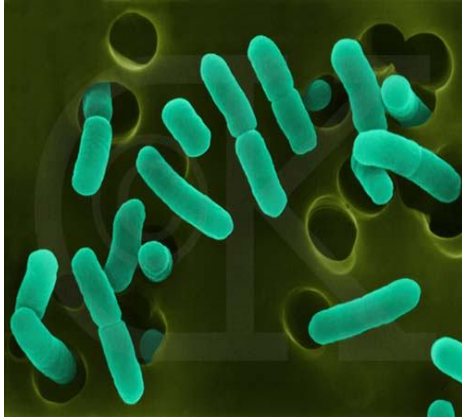
Şekil 2.6. *C. violaceum*'un elektron mikroskop görüntüsü ([http 6](http://6))

C. violaceum tropikal ve subtropikal bölgelerde bulunur. Otouyarıcı olarak N-hekzanol homoserin laktonu kullanarak çevreyi algılamanın bir sonucu olarak viyolasin pigmentini sentezler. Otouyarıcı olarak CviI tarafından üretilen HHL, belli bir değere ulaştığında bakteri içinde çoğalır ve çevresine salınır. Otouyarıcı daha sonra viyolasin gibi spesifik genlerin ifadesine katılır ve CviR denilen transkripsiyonal düzenleyiciye (protein) bağlanır. Böylece viyolasin pigmentinin üretiminden sorumlu olan gen ifade edilir ve mor pigment üretimi başlar (Şekil 2.5). Bu bakteri genomunun açılımı biyoteknolojik yöntemlerle çok iyi açıklanmıştır ve endüstriyel bakış açısı ve birçok farmakolojik yöntemle gösterilmiştir (Choo vd., 2005).

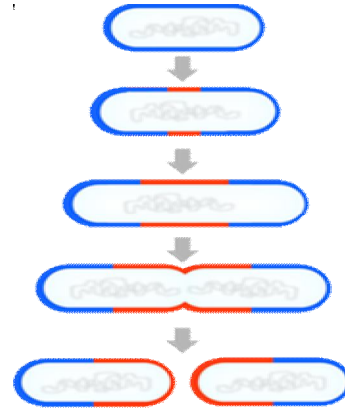
2.1.1.4. *Escherichia coli*'de Çevreyi Algılama

E. coli'nin doğada bulunduğu tek yer sıcak kanlı olarak bilinen memeli ve kanatlı hayvanların bağırsak sistemleri ve dolayısı ile bunların dışkılarıdır. Böylece bir gıda maddesinde, içme ya da kullanma suyunda *E. coli*'ye rastlanması o örneğe doğrudan ya da lağım suyu aracılığıyla dışkı bulaştığının göstergesidir ([http 7](http://7)).

Bakteriler arasındaki iletişim, çeşitli bakteriler tarafından salgılanan ve sentezlenen farklı kimyasal sinyaller aracılığıyla olur. Bu sinyaller, ya çevreyi algılama sinyali denen hücre yoğunluğu ya da büyümenin sabit fazında *E. coli* tarafından üretilen indole gibi basit sinyallerdir (Jayaraman ve Wood, 2008).



a



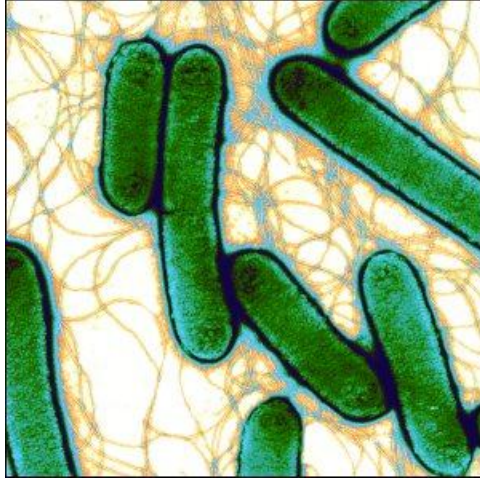
b

Şekil 2.7. a) *E. coli*'nin elektron mikroskop görüntüsü ([http 8](http://8)), b) *E. coli* 'nin büyümesi ve bölünmesi (orta kısmından yeni hücre duvarı yaparak büyür) ([http 9](http://9))

LuxR homologu olan SdiA, *E. coli*'de hücre bölünmesini düzenler. SdiA, *ftsQAZ* operonun pozitif olarak düzenler. Bu operon birkaç promotor tarafından eksprese edilir ve SdiA, aktif hücre büyümesi sırasında, *ftsQAZ*'nin ifadesinden sorumlu baskın promotoru aktive eder (Fuqua vd., 1994; Kanamaru vd., 2000).

2.1.1.5. *Erwinia carotovora*'da Çevreyi Algılama

E. carotovora, hassas bitkilerin vasküler dokularında lokalize olan ve virülens faktörler için gerekli olan hücre duvarını eritebilen enzimleri üreten, yumuşak çürüklüğe neden olan fırsatçı bir patojendir (Şekil 2.7). Enzim aktivitesi, büyüme eğrisinin son aşamasında uyarılır (Fuqua vd.,1994).



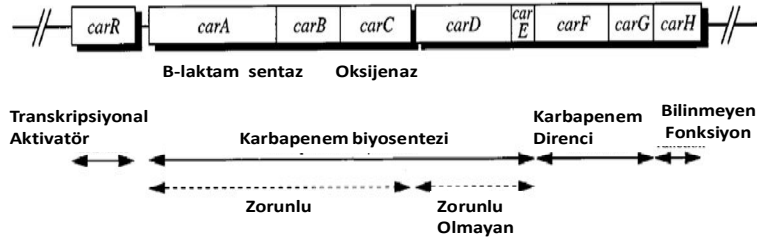
Şekil 2.8. *E. carotovora* subsp. *Atroseptica* (http 10)

Bu bakterinin patates, havuç, şalgam, kereviz, salatalık, soğan ve ananas gibi çok sayıda bitkide hastalıklara sebep olması yüzünden ekonomik önemi vardır (Şekil 2.8)(Boşgelmez-Tınaz, 2003).



Şekil 2.9. *E. carotovora*'nın sebep olduğu hastalıklar (http 11)

E. carotovora'da, ekstraselüler enzimlerin üretimi ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi gibi olaylar çevreyi algılama ile kontrol edilir. AHL olan 3-oxoC₆HL (3-oksoheksanol-L), *lux I* benzeri olan *car I* tarafından üretilir (Bodman vd., 2003).



Şekil 2.10. *E. carotovora*'da *car* gen takımı (McGowan vd., 1999)

E. carotovora'nın patojenlik etkisi, bitkinin parankima dokusunu yumuşatmada kullandığı, proteaz (Prts), selüloz, pektin liyaz, pektat liyaz içeren ekzoenzimleri fazla miktarda üretme yeteneğine bağlıdır.

E. carotovora'nın genetik olarak çalışılabilme kolaylığı ve bir β-laktam antibiyotiği olan karbapenemin ticari potansiyeli sebebiyle bu organizmada moleküler genetik çalışmaları başlamıştır. Bu yapılan çalışmaların birinde *E. carotovora*'da karbapenem antibiyotiğinin üretiminden sorumlu olan 8 genden oluşan bir operon bulunmuştur. Moleküler genetik analizler, bu operonun ilk 5 geni olan *car ABCDE* antibiyotik biyosentezi için gerekli olan yapısal genler olduğunu, *carF* ve *carG*'nin ise organizmanın bu antibiyotiğe direnç mekanizmasında rol oynadığı bulunmuştur. *carH* geninin fonksiyonu ise bilinmemektedir (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

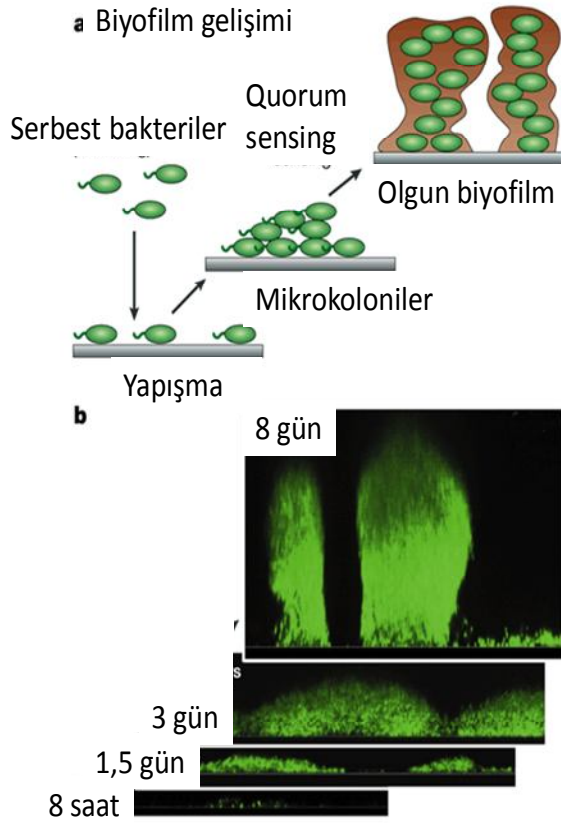
2.1.1.6. *Pseudomonas aeruginosa*'da Çevreyi Algılama

P. aeruginosa, bitkisel ve hayvansal dokularda, deniz kıyıları gibi habitatlarda yaşayabilen, Gram negatif ve çok yönlü bir toprak bakterisidir (Şekil 2.10). Kistik fibroz olan kişiler, kanser olan bireyler, yanık kişiler ve hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde yatan ve özel bakım gereken kişiler genellikle *P. aeruginosa* nedeniyle risk altındadır (<http> 12).



Şekil 2.11. *P. aeruginosa*'nın şematik görünümü (<http> 13)

Bu bakteri kulak iltihabı, göz iltihabı, gastrointestinal enfeksiyonlar, idrar yolu enfeksiyonları ve solunum yolları enfeksiyonlarına da sebep olan fırsatçı bir patojendir. *P. aeruginosa*, hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %10'unu oluşturan en yaygın dördüncü nosokomiyal patojendir. Bu enfeksiyonların antibiyotikle tedavisi zordur ve dolayısıyla bu hastaların sonu ölümle sonuçlanır. *P. aeruginosa*'nın inatçı doğası, biyofilm olarak bilinen, ekzopolisakkarit bir ortamda bakterinin zırh oluşturma yeteneği ve antibiyotik direnç mekanizmasının olmasından kaynaklanmaktadır (Demuth vd., 2005; Tümmler, 2006).



Şekil 2.12. Quorum sensing ve biyofilm oluşumu a) Biyofilm oluşum basamakları, b) *P. aeruginosa* 'da confocal mikroskoptan alınmış bir resmi (http 14)

Biyofilm oluşumu, sinyallerle düzenlenen yüzeye tutunma, mikrokoloni oluşması, hücre dışı polisakkarit bileşenlerin üretilmesi, olgunlaşma ve diğer bölgelere yayılma şeklinde 4 ana süreçten oluşur (Şekil 2.11)(Ulusoy, 2007).

Bu bakteri, gıda kaynağı olarak organik bileşikleri çok değişik şekillerde kullanabilir. Böylece besin olarak sınırlı yerlerde dahi lokalize olma yeteneğindedirler. *P. aeruginosa*, insanlarda bağışıklık sistemini bozmanın yanı sıra, doku zararlarına yol açan birçok toksik proteini üretebilen bir bakteri türüdür (http 12).

Virülenste çok önemli rol oynayan, salgıladığı birçok ekstrasellüler enzimin üretiminin kontrolü, sinyal molekülleri ile sağlandığı için, çevreyi algılama 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 vd., 2003).

P. aeruginosa'nın ürettiği ve virülenste önemli olduğu bilinen ekstraselüler enzimler arasında elastaz, proteaz, ramnolipid, piyosiyenin, piyoverdin sayılabilir. Elastaz, elastin ve kollajen gibi ökaryotik proteinleri parçalayan ve insan immunoglobulin G hücrelerini inaktive eden bir metalloproteazdır. Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, LasR-LasI çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir.

Elastazın *P. aeruginosa*'nın patojenitesine önemli katkısı olduğu, hayvan deneyleriyle ortaya konmuştur. LasB elastaz gerek tek başına gerekse *Pseudomonas* tarafından üretilen diğer proteazlar ile birlikte işlev göstererek biyolojik olarak önemli birçok substratı parçalar veya inaktive eder. Bu proteinler aynı zamanda önemli virülens faktörleri olarak kabul edilmektedirler. *P. aeruginosa* belirli çevresel koşullar altında ramnolipid olarak adlandırılan, hidrofilik kısmı bir veya iki ramnoz molekülü içeren ve hidrofobik kısmı yağ asidi yapısında olan biyosurfaktan üretir. Ramnolipidler yüzey gerilimini azaltıcı özelliklerinden dolayı, endüstriyel ve çevreyle ilgili pek çok alanda kullanılmaktadır. Bunlar arasında hidrokarbonlar gibi düşük çözünürlüğe sahip kirleticilerin uzaklaştırılması yada biyodegradasyonunun arttırılması sayılabilir.

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyal kolonilere mavi-yeşil renk veren piyosiyenin pigmentini üretirler. *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyenin molekülü, önemli patojenite faktörlerinden birisidir. Bu molekül birçok bakteri türüne karşı antibiyotik özelliği göstererek, *P. aeruginosa*'nın bulunduğu ortamda rekabet şansını arttırır. Yapılan in vitro çalışmalar, piyosiyenin 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.

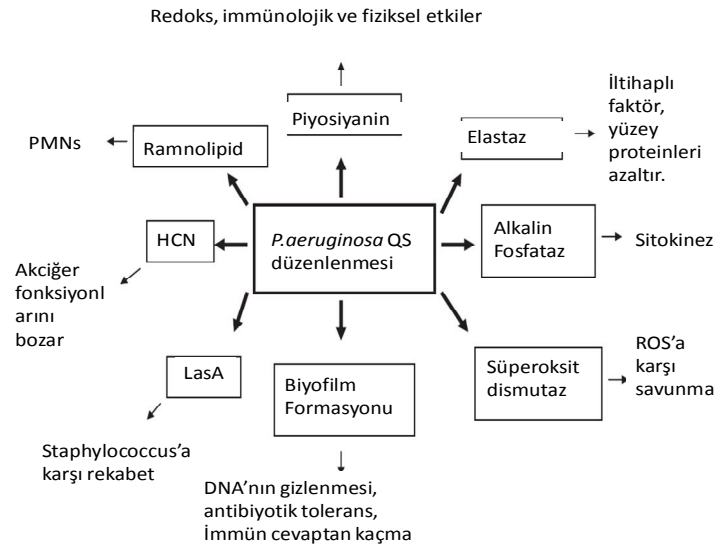
P. aeruginosa siderofor olarak adlandırılan ve demirin eksik bulunduğu durumlarda demiri güçlü bir şekilde bağlayan piyoverdin denen temel bir bileşen üretir. Sideroforlar demiri bağlarlar ve reseptöre dayalı mekanizmalarla bunlar hücre içine alınırlar. Bu mekanizmayla, *Pseudomonas* demir için yarışarak ortamdaki diğer bakterilerin gelişmesini kısıtlar (Ulusoy, 2007).

Çizelge 2.1. *P. aeruginosa*'da bulunan çevreyi algılama sistemleri ve bu sistemler tarafından kodlanan özellikler

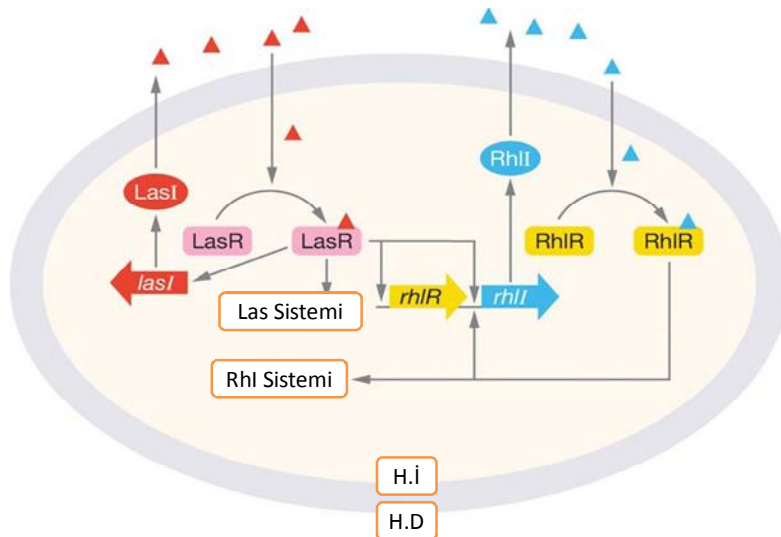
<i>las</i> sistemi tarafından kontrol edilen özellikler	<i>rhl</i> sistemi tarafından kontrol edilen özellikler
PQS sentezi	PQS sentezi
Rhl sistemi	Ramnolipid üretimi
Biyofilm oluşumu	
Alkalın proteaz üretimi	
Elastaz üretimi	Elastaz üretimi
	Piyosiyanin üretimi
Lipaz üretimi	Lipaz üretimi
	Lektin A ve B üretimi
Hidrojen siyanid üretimi	Hidrojen siyanid üretimi
Xcp salgılanması	Xcp salgılanması
	Kitinaz üretimi
	RpoS
Ekzotoksin A üretimi	
Noramidaz	
Katalaz üretimi	
Süperoksit dismutaz üretimi	
Aminopeptidaz	
Yüzme Hareketi	
	Ekzoenzim S üretimi
Kayma Hareketi	Kayma Hareketi
Titreme Hareketi	Titreme Hareketi

*Pseudomonas*lar, insan patojeni olan *P. aeruginosa* ve *P. syringe* gibi bitki patojeni olan türlerde çok iyi çalışılmıştır. Ayrıca, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* ve *P. chlororaphis* gibi, bitkilerde kolonize olma yeteneği olan türlerde de iyi çalışılmıştır. Çoğu *Pseudomonas* türü, patojenite ve bitki büyümesi gibi önemli işlevlerin kontrolü için açillenmiş homoserin laktonları üretirler.

P. aeruginosa'da tanımlanan iki farklı sistem ile çalışan çevreyi algılama sisteminin ekstrasellüler virulans faktörlerinin ekspresyonunu (elastaz, alkalin proteaz, piyosiyenin, ramnolipid gibi) düzenlediği gösterilmiştir (McGrath, vd., 2004; Wagner, 2005; Juhas vd., 2005; Venturi, 2006; Reading ve Sperandio, 2006).



Şekil 2.13. *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sisteminin düzenlenmesi ile virülens faktörleri ve Kistik Fibrozisle ilişkileri. ROS, reaktif oksijen türevleri; PMN, polimorfonüklear lökosit (nötrofil) (Winstanley ve Fothergill, 2009)



Şekil 2.14. *P. aeruginosa*'nın quorum sensing sistemi aşamaları H.D, hücre dışı; H.İ, hücre içi (Waters ve Bassler, 2005)

P. aeruginosa'nın çevreyi algılama sistemi aşamaları, hedef genlerin büyük bir kısmını kontrol etmek için çalışır. LasI otouyarıcı kırmızı üçgenlerle, Rhl otouyarıcı ise mavi üçgenlerle temsil edilmektedir (Şekil 2.13)(Waters ve Bassler, 2005).

Düşük hücre yoğunluğunda, otouyarıcıların küçük bir miktarı hücre dışındaki ortamda mevcuttur. Hücre yoğunluğu artarsa, otouyarıcının konsantrasyonu hücre dışındaki ortamda artar ve hücre içi konsantrasyonu eşik bir değere gelir (Wagner, 2005).

İlk keşfedilen sistem olan “las sistemi”, *las I* (“3- oxo-C12-HSL” nin sentezinden sorumlu otouyarıcı sentaz geni) ve *las R* (transkripsiyonal aktivatör proteinini kodlayan gen) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır.

Bir virülens faktörü olan las B elastazın ekspresyonunu düzenlediği için las sistemi olarak adlandırılan bu sistem; Las A proteaz, alkalen proteaz, biyofilm oluşumunu ve ekzotoksin A gibi çeşitli hücre dışı enzimlerin sentezlenmesini düzenler.

rhl sistemi ise; *rhl I* (C4- HSL, otouyarıcı sentaz) ve *rhl R* (transkripsiyonal aktivatör proteinin kodlayan gen)' den oluşmaktadır. Rhl AB operonunun ekspresyonunu kontrol eden *rhl* sistemi; ramnolipid üretimi için ramnosiltransferaz' ın sentezlenmesini düzenlemesinin yanı sıra Las A/B elastaz, piyosiyanın, siyanid ve alkalen proteazın optimal miktarda üretimi için gereklidir (Delden vd., 1998; Smith vd., 2003; Daniels vd., 2004).

2.2. Çevreyi Algılama Mekanizmasının Düzenlediği Fenotipler

Birçok farklı Gram pozitif ve Gram negatif patojenin, virülens faktörlerinin üretimini koordine etmek için küçük, difüze olabilen N-açıl homoserin lakton (AHL) türevi sinyal molekülleri üretmek suretiyle birbirleriyle haberleşmektedirler. Çevreyi algılama (quorum-sensing) olarak adlandırılan bu olayın birçok Gram(-) bakteri,

hayvan, bitki ve balık patojeni tarafından biyoluminesans, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli fizyolojik işlemlerin regülasyonunda kullanıldığı keşfedilmiştir (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

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'da flagella yüzme hareketinin gerçekleştirilmesini sağlarken, tip IV pili ise titreme (twitch) hareketinin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

Titreme hareketi ilk olarak *Acinetobacter calcoaceticus*'ta 1961'de Lautrop tarafından tanımlanmıştır. Titreme hareketi, *S. sanguis* gibi Gram + bakterilerde, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* gibi Gram – bakterilerin çoğunda da gösterilmiştir. Titreme hareketinin varlığı, genetik olarak bu hareketin olduğu bilinen *P. syringe* ve *P. fluorescens*'te ise henüz kanıtlanamamıştır. *P. aeruginosa* kolonileri agarda karakteristik olarak kenarları düz ve buzlu cam görünümünde gelişirler. Buna karşılık titreme hareketi yeteneğine sahip mutantlar kubbeli ve yumuşak koloniler oluştururlar (Whitchurch, 2006).

Çizelge 2.2. Bakteriyel N-açıl homoserin laktonların ve düzenledikleri fenotiplerin bazı örnekleri (Boşgelmez-Tınaz, 2003)

Organizma	Düzenlediği fenotip	Sinyal molekülü
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Biyofilm, ekzoproteaz	BHL, HHL
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Ekzoproteaz	BHL, HHL
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plasmidle konjugasyon	OOHL
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Ekzoenzim, siyanid, violasin	HHL
<i>Erwinia carotovora</i>	5R-karbapen-2-em-3-karboksilik asit antibiyotiği	OHHL
<i>Erwinia carotovora (Eca)</i>	Virülens faktörleri: proteaz, selüloz, pektinaz	OHHL
<i>Erwinia stewartii (Est)</i>	Ekzopolisakkarit sentezi	OHHL
<i>Escherichia coli</i>	Hücre bölünmesi	Bilinmiyor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipid, siyanid elastaz ve hemolizin içeren virülens faktörleri	BHL+OdDHL
<i>Pseudomonas auerofaciens</i>	Phenazin üretimi	HHL
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rizosfer genlerinin ekspresyonu	HtDeHL
<i>Serratia spp.</i> ATCC 39006	Karbapenem antibiyotiği, pigment (prodigiosin)	BHL+HHL
<i>Serratia liquefaciens</i>	Hareket	BHL
<i>Vibrio fischeri</i>	Biyoluminesens	OHHL
<i>Vibrio harveyi</i>	Biyoluminesens	HBHL
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bilinmiyor	HHL+OHHL
<i>Xanthomonas campestris</i>	Ekstraselüler enzimler ve polisakkarit virülens faktörleri	OOHL

OHHL : N-3-(okzoheksanol)-L-homoserin lakton

BHL : N-butanol-L-homoserin lakton

HHL : N-heksanol-L-homoserin lakton

OOHL : N-3-(okzooktanol)-L-homoserin lakton

HBHL : N-3-(hidroksibutanol)-L-homoserin lakton

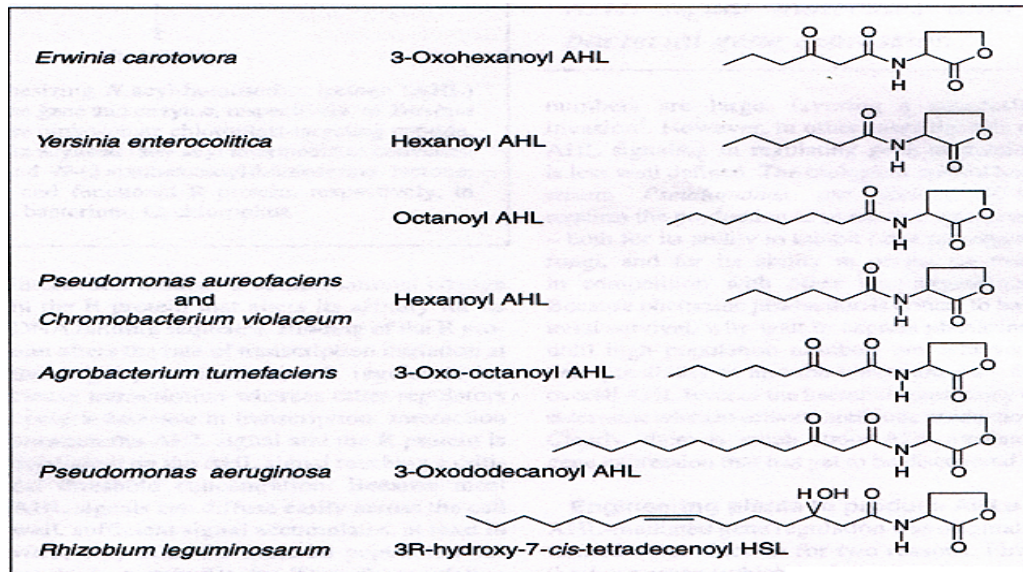
OdDHL : N-3-(okzododekanol)-L-homoserin lakton

HtDeHL: N-3R-(hidroksi-7-cis-tetradekanol)-L-homoserin lakton

2.3. Çevreyi Algılama Sistemi Moleküllerindeki Çeşitlilik

Değişik bakteri türlerinde, çeşitli fizyolojik işlemler, çevreyi algılama ile regüle edilir. Bu işlemlere örnek olarak, biyoluminesans, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu, konjugasyon ve hayvan, bitki ve balık patojenleri tarafından oluşturulan virülens etkenlerinin üretimi verilebilir (Hardman vd., 1998; Chen vd., 2002).

Gram negatif bakterilerde en yaygın olarak bulunan sinyal molekülleri N-açıl homoserin lakton türevleridir (açıl HSL). Sinyal molekülleri AHL, 'autoinducer peptidler (AIP)' ve 'autoinducer 2 (AI-2)' bileşikleri başta olmak üzere birkaç farklı sınıfta incelenir. Her bir sınıf içerisinde yan zincir uzunluk farklılığı gibi küçük değişiklikler de söz konusudur (Saraçlı, 2006).



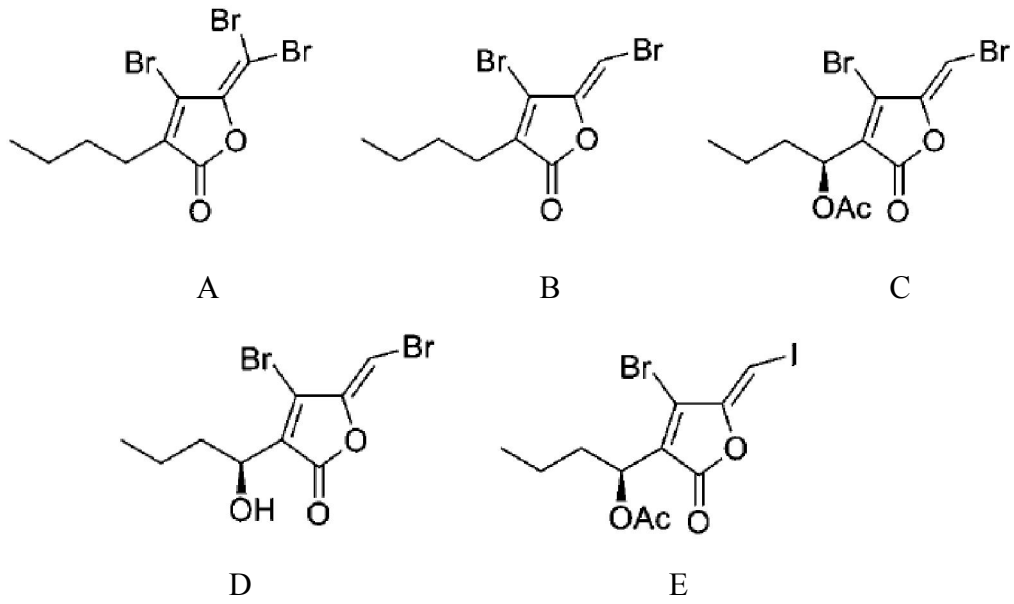
Şekil 2.15. Bakterilerin kullandığı bazı N-açıl homoserin laktonlar ([http 15](http://15))

2.4. Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri

Çoğu patojen bakteri, virülens 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 alımını etkili bir şekilde engelleyen, yeni bir sınıf antimikrobiyal ilaç geliştirmek için yeni bir hedeftir. Hem doğal hem de sentetik orijinli kimyasal kütüphanelerle, tanımlanmış olan birkaç çevreyi algılamayı engelleyici bileşenin, hayvanların akciğerlerinde meydana gelmiş olan enfeksiyonu 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 virülensi bloke ettiği de bulunmuştur (Rasmussen ve Givskov, 2006).

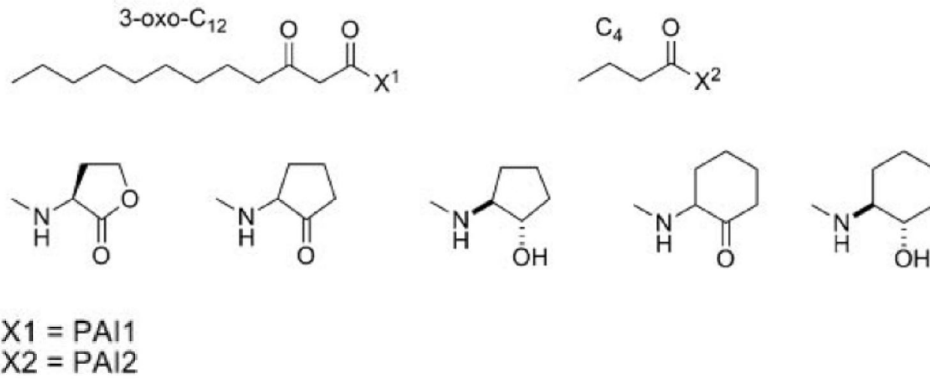
Çevreyi algılama sistemini inhibe eden bileşiklerin bazı özelliklerinin olması önemlidir. Çevreyi algılamayı engelleyen ideal bir bileşiğin, virülens genlerin ekspresyonunda önemli düşüşe neden olan ve düşük moleküler ağırlığa sahip moleküller olması gerekir. Bu engelleyicilerin hem ökaryotik konaklarda hem de bakterilerde toksik yan etkilerinin olmaması gerekir. Ayrıca çevreyi algılama engelleyicilerin yüksek organizasyonlu konaklara dayanıklı ve kimyasal olarak da kararlı olmalıdır. Bu çevreyi algılama sistemini inhibe eden bileşenleri tanımlamak için çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda *C. violaceum*, *V. fischeri*, *E. coli* gibi bakteriler kullanılmıştır.

Bu çevreyi algılama inhibitörlerinden Nys ve arkadaşları ilk defa 1993 yılında Avustralya sahillerinde yaşayan kırmızı bir alg *D. pulchra*'dan A,B,C,D ve E ile gösterilen halojenlenmiş furononları izole etmişlerdir (Şekil 2.15). Bu bileşenlerin Gram Negatif bakterilerde AHL kaynaklı çevreyi algılamayı engellediği bulunmuştur. Örneğin; A ve B ile gösterilen bileşenlerin, *S. liquefaciens*'te kayma hareketini engellediği bulunmuştur (Ni vd., 2008).



Şekil 2.16. *Delisea pulchra*'dan izole edilen halojenlenmiş furononlar

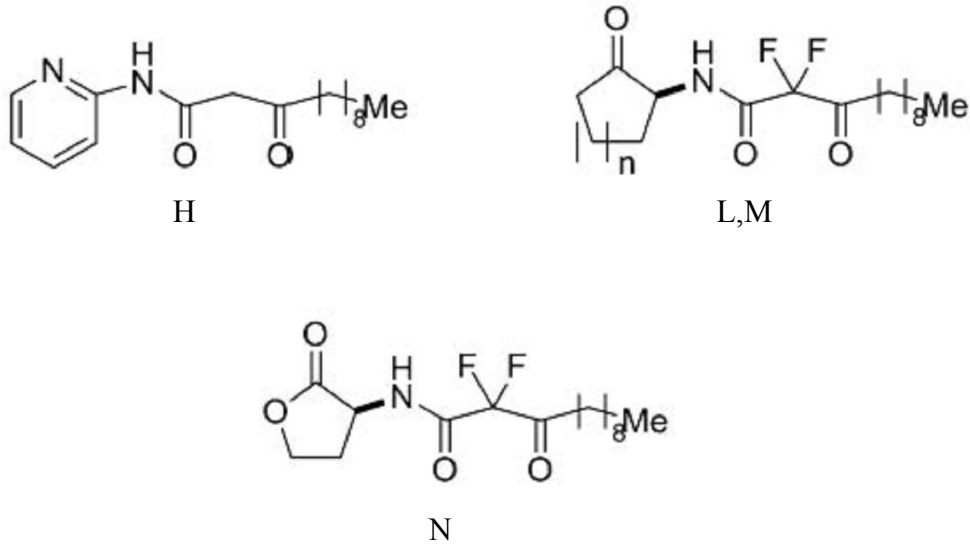
Suga ve arkadaşları, lakton kısımlarının keton, alkol ve aminlerini değiştirerek, yan zinciri C₄ ve 3-oxo-C₁₂ olan *P. aeruginosa*'nın, PAI1 ve PAI2 sinyal moleküllerinin analoglarını sentezlemişlerdir (Şekil 2.16) (Ni vd., 2008).



Şekil 2.17. *P. aeruginosa*'nın sinyal moleküllerinin ve analoglarının yapıları

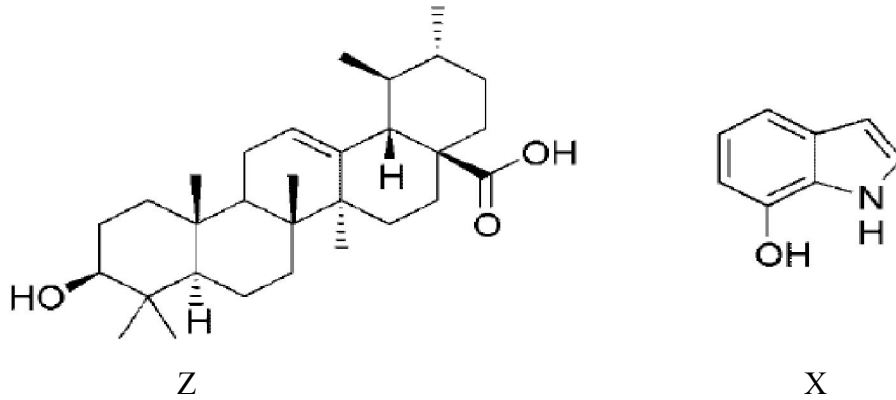
Patojen bir bakteri olan *P. aeruginosa*'da çevreyi algılamaya karşı etkileri anlamak için Spring ve arkadaşları dört tane AHL analogunu sentezlemişlerdir (Şekil 2.17). Açıl zinciri değiştirmek yerine, lakton baş grubuna H ile gösterilen ve LasR'ye zıt çalışan 2-pyridil ve L ve M ile gösterilen analoglar eklenmiştir. N ile gösterilen bileşen ise OdHL analogudur. OdHL (3-oxo-C₁₂HSL) *P. aeruginosa*'nın Las sisteminin bir analogudur. OdHL'nin konak organizmada immün cevabı etkilediğini

bulmuşlardır. *P. aeruginosa*'da piyosiyanin ve piyoverdin gibi virülens faktörlerinin renkli sentezleri çevreyi algılama sistemiyle kontrol edilir. *P. aeruginosa*'da pigment üretiminin onarımı sentetik analogların biyoaktivitesinin basit bir göstergesidir (Ni vd., 2008).



Şekil 2.18. *P. aeruginosa*'da çevreyi algılamayı engelleyen AHL analogları (H, L, M, N)

Wood ve arkadaşları *E. coli*'de biyofilm oluşumunu engelleyen ursolik asit ve 7-hidroksiindol olarak adlandırılan 2 tane çevreyi algılama sistemi inhibitörü bulmuşlardır (Şekil 2.18)(Ni vd., 2008).



Şekil 2.19. *E. coli*'de biyofilm oluşumunu engelleyen QS inhibitörleri Z) Ursolik asit X) 7-hidroksiindol

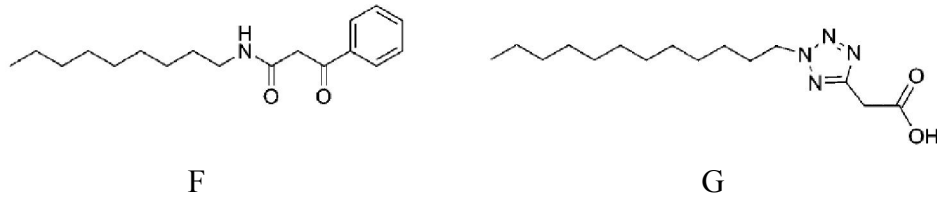
Dacheng Ren ve arkadaşları (2001), *E. coli*'de doğal furanon olan 4-bromo-5-(bromometilen)-3-butil-2'in, kayma ve biyofilm formasyonu üzerine etkilerini çalışmışlardır. Kayma hareketi ve biyofilm formasyonunun engellenmesinin moleküler temelini göstermek için *V. fischeri*'nin mutant suşlarında, furanonların otouyarıcı I ve otouyarıcı II üzerine engelleme etkisi test etmişlerdir. Bu doğal furanonların belirli miktarlarının *V. fischeri* ve *E. coli*'de otouyarıcı I ve otouyarıcı II yoluyla çevreyi algılamayı engellediğini bulmuşlardır (Ren vd., 2001).

Manefield ve arkadaşları (2001), *E. carotovora*'da yaptıkları çalışmada selüloz, proteaz ve karbapenem üretimi üzerine deniz algi olan *D. pulchra*'dan elde edilmiş olan halojenlenmiş furanonların etkilerini test etmişlerdir. Karbapenem ve ekzoenzim üretiminin düzenlenme mekanizmalarındaki farklılıklara rağmen alga ait metabolitler tarafından engellendiğini bulmuşlardır. Karbapenem üretiminin furanona bağlı engellenmesi, *car*ABCDEFGH operonun, 3-oxo-C₆-HSL'ye bağlı ifadesindeki kesintiler sonucu olduğunu göstermiştir (Manefield vd., 2001).

Smith ve arkadaşları (2003), *P. aeruginosa*'da transkripsiyon aktivatör proteini olan LasR'yi etkinleştirme yeteneğine sahip, yeni bir agonist olan 3-oxo-C₁₂-(2-aminosikloheksanol)yi keşfetmişlerdir. Çevreyi algılama aktivatör proteinleri olan LasR ve RhIR'ı tekrar araştırmışlar ve her iki proteinin homoserin laktone bağlanma yerlerinin aynı olduğunu bulmuşlardır. Fakat bu proteinlerin farklı yapısal motiflere sahip olduklarını bulmuşlardır. Bu antagonistlerin virülens faktörleri ve biyofilm oluşumunu azalttığını yani çevreyi algılamayı engellediğini göstermişlerdir.

Juhas ve arkadaşları (2004), virülensi ve çevreyi algılamayı düzenleyen dördüncü bir *luxI* homoloğu dizayn ettiklerini rapor etmişlerdir. AHL sinyal molekülünün üretimini engelleyen VqsR geninin inaktivasyonu, virülens faktörlerin üretimini ve bir nematodun enfeksiyon modelinde *P. aeruginosa*'nın patojenitesini azalttığını göstermiştir. VqsR'nin *C. elegans* üzerinde virülens etkisine sahip olduğu bulunmuştur (Juhas vd., 2004).

Muh ve arkadaşları *P. aeruginosa*'da 200.000 bileşeni görüntülemişler ve iki tane engelleyiciyi bulmuşlardır (Şekil 2.19). Bu çalışmada F ve G olarak belirtilen bileşenlerin, çevreyi algılamaya bağlı elastaz, piyosiyanin gibi virülens faktörlerinin üretimini engelleyebildiklerini bulmuşlardır. *P. aeruginosa*'nın yabani tipinde iki ekstraselüler virülens faktörlerinin ölçümü yapılmıştır. F bileşeniyle piyosiyanin üretiminin engellenmesi %90, G bileşeniyle üretimin engellenmesi ise %40 oranında engellenmiştir. F bileşeniyle elastaz üretimi %60, G bileşeniyle ise %20 oranında engellenmiştir (Ni vd., 2008).



Şekil 2.20. *P. aeruginosa*'da bulunan QS engelleyiciler

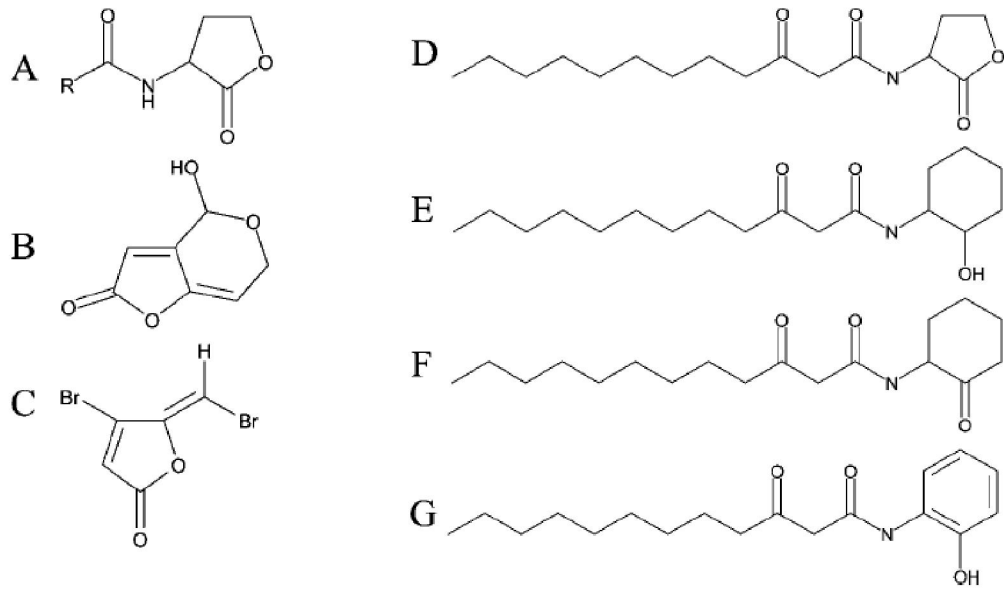
Ayrıca sentetik bir furonon olan C-30'un *P. aeruginosa*'daki çevreyi algılamayı AHL sinyali ile yarışa girerek inhibe ettiği fare modelinde akciğerlerde bakterinin persistansına engel olduğu gösterilmiştir (Hentzer ve Givskov., 2003; http 16).

Çevreyi algılama sisteminin engellenmesi multi antibiyotik dirençli bakterilerle savaşmada yeni bir umuttur. Bakterisidal ve bakteriyostatik stratejilerden ziyade bakteriyel çevreyi algılama sistemlerinin engellenmesi, gıda teknolojisi, tarım ve tıp gibi çok farklı alanlarda talep görebilir (Boşgelmez-Tınaz vd., 2006).

2.4.1. Doğal Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri

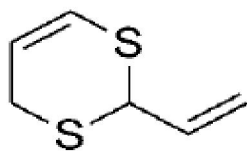
Çevreyi algılama sisteminde engelleyiciler, bitki ve mantar gibi kaynaklardan izole edilebilir. Hem bitkiler hem de mantarlar milyonlarca yıldan beri çevreyi algılama sistemini kullanan bakterilerle işbirliği içindedirler. Bu mantar ve bitkilerin, çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşenleri üreterek,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

Son zamanlarda 50 penisilum türünün, farklı büyüme ortamlarında %66 gibi büyük bir kısmının çevreyi algılama sistemini engelleyici aktivitesiyle ikincil metabolitleri ürettiği bulunmuştur. Bileşiklerden ikisi *P. coprobium* ve *P. radicola*'dan üretilen patulin ve penisillik asittir. DNA mikroarray transkriptomiks doğrulama analizleri, LasR ve RhIR düzenleyicilerinin, *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama genlerinin %60 penisillik asit, %40'nın patulin genleri olduğunu göstermiştir. Bu deneyin bir kanıtı da LuxR proteinine karşı antikorlar ile Western Blot analiziyle elde edilmiştir. Bu da LuxR'nin hızlı yıkılan bileşikler olduğunu göstermiştir (Rasmussen, 2006).

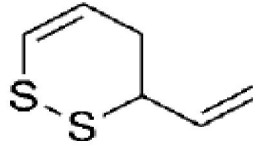


Şekil 2.21. A) Birçok Gram Negatif bakteri tarafından sinyal molekülü olarak kullanılan açillenmiş homoserin laktonların basit yapısı. B) Mantar olan *P. coprobium*'dan izole edilen bir QS engelleyici Patulin C) 30 bileşenli furanon D, *P. aeruginosa*'da las sistemin doğal sinyal molekülü (3-oxo-C12 HSL) E) Las sistemin bir antagonisti olarak görev yapan 3-oxo-C12 HSL'nin bir analogu F) zayıf antagonistik etkisi olan AHL analogu G) Güçlü antagonistik etkisi olan AHL analogu (Rasmussen ve Givskov, 2006)

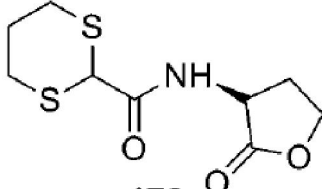
Nielsen ve arkadaşları engelleme sistemini çevreyi algılamayı kullanarak test ettiklerinde, sarımsaktan elde edilen bileşenlerin LuxR üzerinde engelleme etkisinin olduğunu bulmuşlardır (Şekil 2.21). T ve U ile gösterilen bileşenler çevreyi algılama engelleme sisteminde pozitif yanıt vermiştir. Diğer 2 analog olan V ve Y'nin ise LuxI reseptörü üzerinde zıt bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Ni vd., 2008).



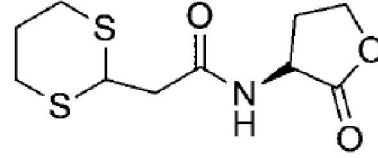
T



U



V



Y

Şekil 2.22. Sarımsaktan elde edilen ve *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemini engelleyen AHL analogları, T ve U: LuxR sistemine antagonist çalışan engelleyiciler V ve Y: LuxI sistemine antagonist çalışan engelleyiciler

Choo ve arkadaşları (2005), Vanilya özütüyle yaptıkları çalışma ile *C. violaceum*'da pigment üretimini engellediğini bulmuşlardır. Genelde vanilya olarak bilinen *Vanilla planifolia* Andrews baharat ve çesni olarak kullanılır. Bu çalışmada vanilya ekstraktının bazı asitler, esterler, fenoller ve hidrokarbonlar içerdiği belirlenmiştir. Ana bileşenlerinin hiçbirisinin furonon türevleri ve doğal uyarıcılarla yapısal benzerliği olmadığı saptanmıştır. İzole edilen bileşikler toksik furonon bileşiklerinden farklı olduğu için güvenle kullanılabileceği insanlar için büyük bir avantaj sağlamıştır. Sarımsak ekstraktını kullanarak *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemini engelleyen bir grup araştırmacı, vanilya ekstraktının da bu bakterideki çevreyi algılama sistemini engelleyici aktivitesiyle ilgili çalışmaktadır. Başka çalışmalarla da *C. violaceum* CV026'da *Lotus corniculatu* (gazalboynuzu) bitkisinin çevreyi algılama sistemini engelleyici aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Choo vd., 2005; Bjarnsholt vd., 2005).

Rasmussen ve arkadaşları (2006), bitkilerden burçak, havuç, soya fasülyesi, nilüfer, domates, bezelye tohumları, biber ve sarımsağın da bakteriyel çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşikler ürettiği bulunmuştur. 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 kullanır ama *P. aeruginosa*'da çevreyi algılamaya karşı etkili değildir (Waters ve Bassler, 2005).

Boşgelmez-Tınaz ve arkadaşları (2006), *Scorzonera sandrasica* bitkisinin *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* ATCC indikatör bakterilerde 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. Bu bitki patojeninde, patojeniteleri için gerekli olan ekstraselüler enzimler ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi çevreyi algılama sistemine bağlı olan 3-oxo-C₆-HSL tarafından düzenlenir. Bu yüzden *S. sandrasica* tarafından salgılanan bileşenler aracılığıyla *E. carotovora*'nın çevreyi algılama sistemini engellemesi, bitki hastalıklarına sebep olan bu fitopatojenlerin kontrol altında tutulmasına olanak sağlayabilir. *S. sandrasica* Türkiye'de Ege Bölgesinde Sandras Dağı'nda yetişir ve *Asteraceae* familyasından endemik bir türdür. *Scorzonera* cinsinin bazı türleri çeşitli hastalıkları tedavi etmek için geleneksel tıbbi bitki ve yiyecek olarak da kullanılmıştır. Bu cinsin diüretik, depurative ve analjezik özellikte olduğu da bilinmektedir. Bu bitkinin farmakolojik özelliği hakkında rapor ve bilgi yoktur. Bu bitkinin salgıladığı çevreyi algılamayı engelleyen bileşenlerin kimyasal niteliği ve engelleme aktivitesinin moleküler mekanizması bilinmemektedir. Bu yüzden *D. pulchra* furononları gibi, bu engelleyici bileşenlerin de AHL reseptör proteinine bağlanarak AHL düzenleyici davranışları engelleyebildiğini rapor etmişlerdir (Boşgelmez-Tınaz vd., 2006).

Singh ve arkadaşları (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 belirlemişler. Bu bitkinin pH:4'te hidrolize edilmiş ham ekstraktı ve hidrolize edilmiş etil asetatlı çözeltilisinin çevreyi algılamayı engellediği bulunmuştur. Sonuçlar, aynı zamanda Akasya bitkisinin önemli doğal antioksidanları içerdiğini göstermiştir (Singh vd., 2009).

Ikeda ve arkadaşları 2008 yılında N-açıl siklopentilamin (Cn-CPA)'nin Lux tipi çevreyi algılama sistemini araştırmışlardır. Lux tipi çevreyi algılama sistemi *V.*

fischeri'de ışımayla ilgili gen ifadesini düzenler. Zaten Cn-CPA'nın sentezinin *P. aeruginosa* ve *S. marcescens*'te çevreyi algılama sistemini engelleme yeteneğinin olduğu rapor edilmiştir. *P. aeruginosa* (Las ve RhI) ve *S. marcescens* (Spn çevreyi algılama sistemi)'te özel açıl zincir uzunluğuna sahip CnCPA ile, çevreyi algılama sistemi bu bakterilerde en yüksek engelleme etkisini göstermiştir. Yine Lux tipi çevreyi algılama sisteminde karbon sayısı 5 ve 10 aralıklarında olan Cn-CPA'nın birçok çeşidinde benzer güçlü engelleyici etkileri gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca Lux tipi çevreyi algılama sistemindeki Cn-CPA'nın engelleyici etkisi, doğal bir çevreyi algılama engelleyicisinin halojenlenmiş furanonlardan daha güçlü olduğunu göstermiştir (Wang vd., 2008).

Girennavar ve arkadaşları (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 (Girennavar vd., 2008).

Çevreyi algılama sistemini engelleyen bir bileşenle çalışmak, laboratuvar şartlarında çok iyi yapılmasına rağmen in vivo (canlı içinde) oldukça zordur. *P. aeruginosa*'nın virülensi, basit bir model olarak toprak solucanı olan *Caenorhabditis elegans*'ta çalışılmıştır. Bu küçük solucanlar zararlı bakterilerle beslenir. Ama *P. aeruginosa* ile beslendiğinde hızlıca ölürlür. Ölüme sebep olan faktörlerin, çevreyi algılama ile düzenlenen HCN (hidrojen siyanür) ve phenazinlerin üretimi olduğu bulunmuştur. Nematodların %100 ölümü, yabani tip *P. aeruginosa* ile beslendiğinde birkaç saat içinde meydana gelmiştir. *C. elegans*, çevreyi algılama sistemi bloke edilmiş *P. aeruginosa* mutantları ile beslendiğinde %10 azalma tespit edilmiştir (Waters ve Bassler, 2005).

2.5. Çevreyi Algılama Engelleyicilerinin Tedavideki Yeri

1930’larda, antibiyotiklerin keşfi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yeni bir çıkır açmış ve bakteriyel enfeksiyonlardan ölüm sayısında önemli bir düşüş yaşanmıştır. Ancak 1950’lere gelindiğinde, klinik olarak sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişmeye başlamıştı bile. Günümüzde ise dirençli bakterilerin hızla yayılımı birçok hastalığın tedavisini zorlaştırmakta bazı durumlarda mümkünsüz kılmaktadır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren bakteriler, tedavilerinin güç olması nedeniyle hastane ortamında ciddi problemlere yol olmaktadır. Bu nedenle, her yıl milyonlarca dolar yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için harcanmakta ancak hızla gelişen bakteriyel direnç daha eczane raflarına ulaşmadan önce antibiyotiklerin etkilerini kaybetmeye başlamalarına neden olmaktadır (Camara vd., 2002).

Bir yandan gelişen antibiyotik direnci, diğer taraftan yeni geliştirilen antibiyotik sayısındaki azalma enfeksiyon hastalıkları tedavisi açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Günümüzde yeni antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar arasında, bir bakteri topluluğu içindeki tek tek hücrelerin birbirleri arasındaki iletişimin engellenmesi konusundaki çalışmalar, henüz pratiğe yansımamış olsa da, gelecek için umut vaatmektedir. Kısaca çevreyi algılama adıyla bilinen ve bakteri hücresinin 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).

Günümüzde, Gram-negatif bakterilerde çevreyi algılama sistemini bloke ettiği bilinen tek bileşik, kırmızı bir deniz algi olan *D. pulchra*’dan izole edilen halojenlenmiş furanonlardır. Furononların bu özelliklerinin keşfi, yüksek yapılı bitkilerin de çevreyi algılama sistemini bloke edebileceği olasılığını gündeme getirmiştir. Furononlardan başka, bir kaç karasal bitkinin daha Gram-negatif bakterilerin çevreyi algılama sistemini etkilediği rapor edilmiştir. Bitkiler alemi çok

uzun zamandan beridir ilaçlara kaynak oluşturmaktadır. Bilindiği üzere, ülkemiz birçok aromatik ve tıbbi öneme sahip bitki türünü içeren zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Bu nedenle, özellikle ülkemizde yayılım gösteren bitkilerin seçilerek önemli insan patojenlerinde çevreyi algılama sistemine olan etkilerinin incelenmesi, bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine çok önemli katkılar sağlayacaktır.

Araştırmacılar tarafından, bakterileri antibiyotik kullanarak öldürmek yerine, onlar arasındaki haberleşme sistemini hedef alarak antibiyotik direncine bir çözüm geliştirilebileceği önerilmiştir (Hentzer ve Givskov, 2003).

Bu yüzden ilaç firmaları bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek ve kontrol altında tutmak için antibiyotikler haricinde başka yeni tedavi yolları bulmaya odaklanmışlardır. Bu konuda şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalar, kırmızı bir deniz algı olan *D. pulchra*'dan izole edilen halojenlenmiş furanonların bazı bakterilerdeki çevreyi algılama sistemini bloke ettiğini göstermiştir (Manefield vd., 2001; Hodgkinson vd., 2007).

Çevreyi algılama sistemine ait sinyal moleküllerinin, mikroorganizmaların virülens faktörlerini uyarması ve biyofilm oluşumunda görev alması yeni ilaçların geliştirilmesi için bu sinyal moleküllerini önemli bir hedef haline getirmiştir. Çevreyi algılama inhibitörleri ile ilgili araştırmalar henüz deneme aşamasında olup çalışmalar bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır. Çevreyi algılama moleküllerinin inhibisyonu üç mekanizma üzerinden sağlanmaktadır (Rasmussen ve Givskov, 2006).

a) Çevreyi algılama molekülünün üretiminin önlenmesi

Gram-negatif bakterilerde önemli bir sinyal molekülü olan AHL'nin sentezinde görevli bir enzimi inhibe eden "triclosan" dolayısıyla bu molekülün sentezini de engellemiş olur. Ayrıca bazı makrolit antibiyotiklerin de benzeri etkileri olduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa* izolatlarında yapılan bir çalışmada, azitromisinin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu azalttığı ve elastaz gen

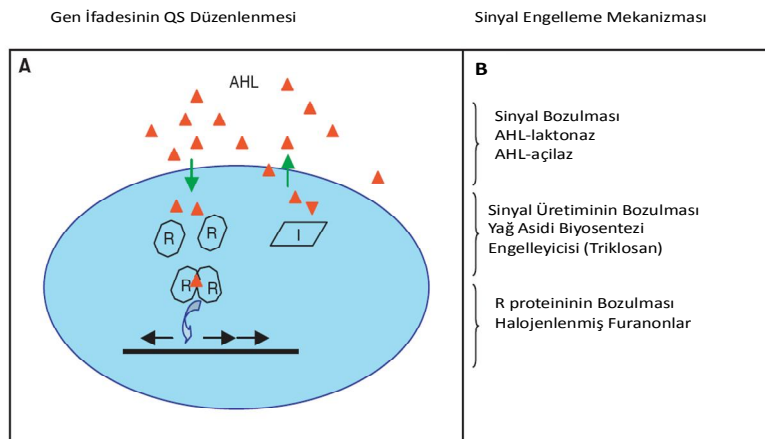
ekspresyonunu önleyerek infeksiyonun şiddetini azaltarak alternatif bir tedavi yaklaşımı sağladığı gösterilmiştir (Tateda vd., 1996).

b) Çevreyi algılama molekülünün yıkılması veya inhibisyonu

Sentezlenmiş olan çevreyi algılama moleküllerinin parçalanması diğer bir hedef olabilir. 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).

c) Çevreyi algılama sinyalinin alınmasının önlenmesi

Çevreyi algılama sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla sinyal reseptör proteinlerinin ya da AHL analogları aracılığı ile reseptöre bağlanmanın azaltılması da üçüncü mekanizma olarak denenmektedir. Bir kırmızı makro alg olan *D. pulchra*’nın üretmiş ve veziküllerinde depolamış olduğu furonon bileşikleri 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).



Şekil 2.23. QS modelleri ve Sinyal engelleme mekanizmaları A) Gram Negatif LuxR tipi QS sisteminde LuxI proteini (I) AHL sinyallerinin sentezini katalizler. Bakteriyel hücrelerin çoğalmasıyla biriken AHL sinyalleri LuxR’ye bağlanarak sinyal vermeye başlar. LuxR-AHL kompleksi hedef genlerin ifadesini teşvik eder. B) LuxR tipi QS sistemlerine karşı sinyal engelleme mekanizmalarına örnekler (Zhang ve Dong, 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

- 1) Agar (Sigma)
- 2) Tripton (Bio basic inc)
- 3) Maya özütü (Idg)
- 4) Sodyum klorür (Riedel de Haen)
- 5) Balon joje
- 6) Beher
- 7) Etil Asetat (Riedel de Haen)
- 8) Gentamisin (Oxoid; 20µg)
- 9) Metanol (Fluka)
- 10) Etanol (Riedel de Haen)
- 11) Eldiven
- 12) Ependorf Tüpü
- 13) Falkon Tüpü
- 14) Gliserol
- 15) Huni
- 16) Kanamisin (Sigma)
- 17) Kloroform (Riedel de Haen)
- 18) Petri Kutusu
- 19) Pipet Ucu (10µl, 200µl, 1000µl, 5000µl)
- 20) Filtre Kağıdı
- 21) 0.45 µm'lik Filtre Kağıdı
- 22) M9 Besiyeri
- 23) CTAB (Sigma)
- 24) L-Glutamik Asit (Merck)
- 25) Magnezyum sülfat $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haen)
- 26) Yağsız Süt Tozu (Fluka)
- 27) D-(+)-glukoz, minimum %99.8 (Sigma)
- 28) Tris (Merck)

29) Metilen mavisi (Fluka)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

1. **Derin Dondurucu:** Analiz için kullanılan suşlar uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80 °C’de Nüve Marka derin dondurucuda muhafaza edilmistir. Bitki ekstraktları ise -20 °C’de Arçelik marka derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.
2. **Etüv:** Besiyerlerine ekilen suşlar, inkübe edilmek için Wtcbinder Marka normal etüv ve Gallenkamp Marka yatay çalkalamalı etüv kullanılmıştır.
3. **UV Spektrofotometre:** Yapılan analizler sırasında sıvı bakteri kültürlerin optik yoğunlukları Shimadzu 1610 Marka UV/ VIS Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.
4. **Otoklav:** Analizler sırasında tüm sterilizasyon işlemleri CertoClav Marka otoklav kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
5. **Hassas Tartım Cihazı:** Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için Metter Toledo PB303-S Marka hassas terazi kullanılmıştır.
6. Buzdolabı (Beko)
7. Mini Santrifüj (Minispinplus Eppendorf)
8. McFarland
9. Rondo (Tefal)
10. Saf Su Cihazı (Milipore Progard 2)
11. Steril Kabin (Telstar CV-100)
12. Vorteks (Velp Scientifica)
13. Evaporatör (Heidolph Laborota 4001)

3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşları

Çizelge 3.1. Kullanılan Bakteri Suşları, Özellikleri ve Kaynakları

Suş Adı	Özellik	Kaynak
<i>C. violaceum</i> CV026		Miguel Camara ve Dr. Steve Diggle
ESS	B-lactam super sensitive	Beechams Pharmaceuticals
<i>Erwinia carotovora</i> GS101	ATCC39048	SDÜ Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Lab Stoğu
PAO1	PT5 orijinal tip	Dr. Thilo Koehler

3.1.4. Besiyerleri ve Çözeltiler

Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan besiyeri ve çözeltilerin içerikleri

Besiyeri ve Çözeltiler	Her litre için Bileşenler
Luria Bertani agar (LB)	10 g Tripton 5 g Yeast Ekstrakt 5 g NaCl 15 g Agar
Luria Bertani Broth (LB)	10 g Tripton 5 g Yeast Ekstrakt 5 g NaCl
%0.7 LB Soft Agar (50 ml)	0.5 g Tripton 0.25 g Yeast Ekstrakt 0.25 g NaCl 0.7 g Agar
Kayma (Swarming) Testi	%0.5 lik LB (agar 1000 ml için 5gr eklendi.) 10 g Tripton 5 g Yeast Ekstrakt 5 g NaCl 5 gr Agar
Yüzme (Swimming) Testi	10g tripton 3g agar 5g NaCl

Çizelge 3.2 (devamı)

Proteaz Testi	10 g Tripton 5 g Yeast Ekstrakt 5 g NaCl 15 g Agar
M9-glutamat minimal medium agar	48mM Na ₂ HPO ₄ 22mM KH ₂ PO ₄ 8.5mM NaCl 18.7mM NH ₄ Cl 2mM MgSO ₄ .7H ₂ O 0.1mM CaCl ₂ .2H ₂ O 15g Agar %0.02 CTAB %0.2 Glikoz %0.0005 Metilen Mavisi %0.05 Glutamat
Elastin Kongo Red (ECR) tamponu	100 mM Tris, 1 mM CaCl ₂ , pH 7.5, 20 mg Elastin Kongo Red

3.2. Yöntemler

3.2.1. Bakteri Suşlarının Üretimi ve Saklanması

Deneylerde kullanılmış olan bakteri suşlarını uzun süreli saklamak için Luria Bertani sıvı besiyerine ekilmiş ve üremeleri için gerekli olan sıcaklığa ayarlanmış etüvlerde 1 gece üremeye bırakılmıştır.

Çizelge 3.3. Bakteri suşlarının üremeleri için gerekli sıcaklık

Bakterinin adı	Gerekli sıcaklık
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	30 °C
<i>Beechams ESS</i>	37 °C
<i>Erwinia carotovora</i>	30 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37 °C

Kültür ortamına toplam hacmin %10'u oranında gliserol ilave edilmiş ve bakteriler - 80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Besiyerlerinin ve Çözeltilerin Hazırlanması

Besiyerleri ve kullanılan tüm çözeltiler Millipore saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Tüm besiyerleri için otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon işlemi uygulanmıştır.

3.2.2.1. Katı ve Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması

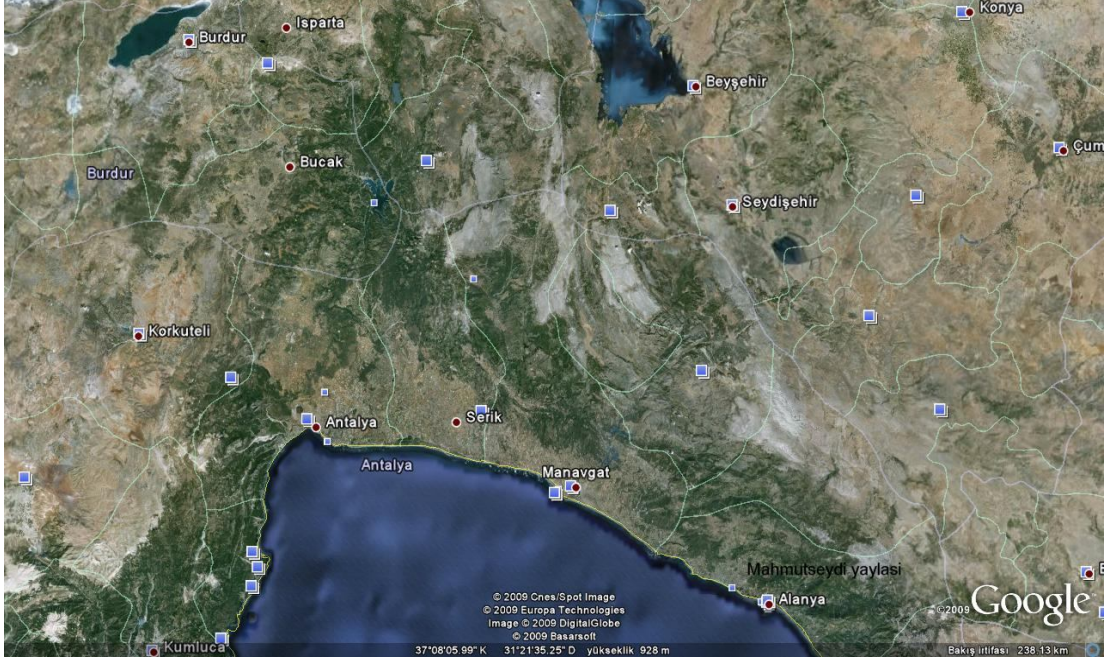
Luria Bertani (LB) sıvı besiyerleri cam tüplere 5 ml, 4 ml veya 2 ml hazırlanarak, 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır. Luria Bertani (LB) agar besiyerleri ise steril petri kutularına ve her bir petriye yaklaşık 25 ml besiyeri dökülmüş, oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra +4 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2.2. Yumuşak Agarın Hazırlanması

%0.7 'lik yumuşak agarlar falkon tüplere 4 ml hazırlanarak, 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra donmaması için +70 °C sıcaklığa ayarlanmış etüve kaldırılmıştır.

3.2.3. Bitkilerin Toplandığı Alanlar, Bitkilerin Özellikleri ve Yetiştirme Şartları

Tez çalışmamızda quorum sensing engelleyici özelliği araştırılacak 13 bitki türü kullanılmıştır. Acı yavşan, adaçayı, kekik ve defne Alanya'dan toplanmıştır; nane, kırmızı soğan, sarımsak, mersin, tesbih (yaprak ve tohum), lavanta, siyah çay, yeşil çay, Isparta'dan aktardan alınarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Bitkilerin toplandığı yerleri gösteren harita (<http> 40)

Defne (*Laurus sp*): Defnegiller (Lauraceae) familyasının *Laurus* cinsini oluşturan herdem yeşil ağaç veya ağaççık görünümündeki bitki türlerinin ortak adıdır.



Şekil 3.2. Defne bitkisinin görüntüsü (<http> 17)

Üç türü bilinmektedir. Azor defnesi (*Laurus azorica*) Azorlar'da, Akdeniz defnesi (*Laurus nobilis*), Türkiye, Yunanistan, İspanya'da, Kanarya Adaları defnesi (*Laurus novocanariensis*), Kanarya Adaları, Madeira Adaları'nda yetişir. (<http> 18.)

Acı Yavşan (*Artemisia absinthium*): Pelin otu Asteraceae familyasından Anadolu'da doğal olarak bulunun bir bitki türüdür. 120 cm'ye kadar uzayabilen bu bitki grimsi ya da beyazımsı yeşil renkli, parçalı yapraklıdır. Itırlı bir bitkidir. Hekimlikle kullanılır.



Şekil 3.3. Acı yavşan bitkisinin görüntüsü (<http> 19)

Genellikle akdeniz bölgesinde yetişir.kırmızı çiçekleri vardır. Dağlarda yetişen tadı acı olan bir çiçektir ve ilaç-içki yapımında kullanılır. Oldukça acı bir ottur (<http> 20)

Kırmızı soğan (*Allium cepa* L.var.cepa): Soğan, Alliaceae familyasındaki *Allium* cinsine dahil tüm bitkilerin genel adıdır.



Şekil 3.4. Kırmızı soğan bitkisinin görüntüsü (<http> 21)

Özellikle *Allium cepa* türünü anlatmak için kullanılır ve bu anlamda "bahçe soğanı" olarak da adlandırılabilir. Yumrusu ve yeşil yaprakları yemeklere tat vermek için kullanılır (<http> 22)

Adaçayı (*Salvia sp*): Ülkemizde bir çok türü doğal olarak yetişen bu bitkinin yaklaşık yedi türü ballı bitki olarak bilinmektedir. Bitki çok yıllık olup boyu 30-60

cm arasında değişir. Yaprakları sık tüylüdür. Çiçekleri açık sarı renktedir (<http> 23).



Şekil 3.5. Adaçayı bitkisinin görüntüsü (<http> 24)

Kekik (*Thymus sp*): Ülkemizde yaygın olarak yetişen bir bitkidir. Kekikte timol, karvakrol, simol, linalol ve borneol maddelerini içeren % 1 oranında uçucu yağ; acı esanslar, tanen, flavonit ve tripenoit bulunur. Kekik bitkisine hoş kokusunu veren, timol ve karvakrol adlı maddelerdir (<http> 25).



Şekil 3.6. Kekik bitkisinin görüntüsü (<http> 26)

Yol kenarlarında, tepelerde ve dağlarda yetişen kekik hoş kokuludur ve çok yıllıktır. Çiçeklenme dönemi Mayıs başından Ağustos sonuna kadar devam eder (<http> 27).

Nane (*Mentha sp*): Bu bitkinin birleşiminde uçucu yağ olan "mentol" vardır. Nane'nin çiçeklenme dönemi Haziran başından Ağustos sonuna kadar sürer.. Bu bitki balı diğer ballardan aromasının farklı oluşu ile hemen ayırt edilir (<http> 28).



Şekil 3.7. Nane bitkisinin görüntüsü (<http> 29)

Sarımsak (*Allium sativum*): Alliaceae familyasına dahil olan, *Allium* cinsinden bir soğanlı bitki türü. 25-100 cm yüksekliğe kadar boy atar. Yapraklarında, saplarında ve toprak altındaki soğanında kokulu bir yağ bulunur. Sarımsak yıllık bir bitkidir. Soğan, yabani soğan, zambak ve pırasa ile akraba olan sarımsak doğada yabani ortamda yetişmez.



Şekil 3.8. Sarımsak bitkisinin görüntüsü (<http> 30)

Sarımsağın, çiğ halde veya yağının, mikroorganizmalar üzerine antibiyotik etkiye sahip olduğu, antiviral, antifungal, antiprotozoon, antiparazitik ve antibakteriyal özellikleri üzerinde durulmaktadır. Bunun yanı sıra antiseptik işlevi, grip, nezle, ses kısıklığı, astım rahatsızlıklarına, bademcik, romatizma ve eklem enfeksiyonlarına, öksürük ve bronşite iyi geldiği ön plana çıkarılmaktadır. Terletici etkisi nedeniyle ateş düşürülmesine yardımcı olur (<http> 31).

Mersin (*Myrtus communis*): Mersingiller ailesindendir. 100 kadar türü vardır. Karadeniz, Ege ve özellikle Akdeniz kıyılarımızda kendiliğinden yetişir. Mayıs-

haziran ayları arasında, beyaz renkli çiçekler açan, 1-3 m boylarında, yapraklarını dökmeyen, bir ağaççıktır.



Şekil 3.9. Mersin bitkisinin görüntüsü (http 32)

Yapı itibariyle gövde ve dallar şeklinde değil maki görünümündedir. Yapraklar kısa saplı ve karşılıklı, yeşil renkli, derimsi, oval şekillidir ve üzerinde salgı bezleri bulunur. Yaprakları hoş kokuludur. Yapraklarında ve çiçek dallarında reçine, tanen, sinaol, terpen, mirtol, pinen gibi maddeler vardır (http 33).

Tesbih (*Melia azedarach*): Tespih ağacı (*Melia azedarach*), tespih ağacıgillerden (Meliaceae) Hindistan'da ve Avrupa'nın sıcak bölgelerinde yetişen bir ağaç türü. Meyvesi zehirli ve kabukları ateş düşürücüdür.



a



b

Şekil 3.10. a) Tesbih bitkisinin görüntüsü (http 34) b) Tesbih tohumunun görüntüsü (http 35)

Lavanta (*Lavandula sp*): Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasından *Lavandula* cinsini oluşturan Akdeniz kökenli bitki türlerinin ortak adıdır.



Şekil 3.11. Lavanta bitkisinin görüntüsü (<http> 36)

Atlas Okyanusu adalarından Akdeniz çevresi ülkelerine ve Hindistana kadar uzanan geniş bir alanda yetişen, lavanta cinsi üyeleri, çalı görünümlü, toplu başak biçiminde mavi, morumsu ya da kırmızı çiçekler açan bitkilerdir. Lavanta, dağlarda, 1000-1800 m arasında yüksekliklerde yetişir. (<http> 36).

Siyah çay (*Camellia sinensis*): Çay, işlenmiş yapraklarının kaynatılmasıyla veya haşlanmasıyla içecek elde edilen bir bitki türüdür.



Şekil 3.12. Siyah çay bitkisinin görüntüsü (<http> 37)

Çay, çalının yapraklarının fermentasyonu, ısıtılması, kurutulması ve bazen diğer meyve veya bitkilerle karıştırılması sonucu elde edilir (<http> 38).

Yeşil çay (*Camellia sinensis*): *Camellia sinensis* yapraklarından elde edilen çaydır. Aynı bitkiden elde edilen siyah çay için yapraklar yavaş yavaş kurutulur, yeşil çay

ise yaprakların toplanır toplanmaz kavrulup hızla kurutulması ile elde edilir. Siyah çay kurutulurken oksijenle tepkimeye girer, yeşil çayın ise tepkimeye girmesine izin verilmez.



Şekil 3.13. Yeşil çay bitkisinin görüntüsü (<http> 39)

Her iki çayda da kafein bulunmaktadır, ancak yeşil çaydaki kafein oranı daha düşüktür. Siyah çayın da, yeşil çayın da antioksidan özellikleri vardır, ancak daha az işlem gördüğü için yeşil çaydaki antioksidan miktarı daha fazladır (<http> 39).

3.2.4. Bitki Ekstraksiyonu için Gerekli Malzemeler ve Hazırlanması

Bitki Ekstraksiyonu İçin Gerekli Malzemeler

Bitki Materyali (gövde, yaprak, tohum)

Etil Asetat

Etanol

Metanol

Kloroform

Bitki örnekleri daha önceden belirlenmiş olan Alanya ve Isparta'dan toplanmıştır. Örnekler seçilirken çalışmanın orijinalitesi açısından özellikle ülkemizde yayılım gösteren tıbbi öneme sahip bitki türleri tercih edilmiştir. Toplanan bitkilerin kullanılacak kısımları kısımları olan gövde, yaprak ve tohum kısımları 35°C'de 72 saat fırında kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki numunelerinden 10'ar gram tartılıp rondoda öğütüldükten sonra toz haline getirilmiştir. Hemen sonrasında kloroform, etanol, metanol ve etil asetat gibi çözücüler kullanılarak çoklu karıştırıcıda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ekstraktlar kaba filtre kağıdından

süzülerek döner buharlaştırıcıda (evaporatör) çözücülerini tamamen uçurulmuştur. Hazırlanan ekstraktlar steril 0.45 µm filtre kağıdı kullanılarak sterilize edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.5. Bitki Örneklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MİK)

Bir mikroorganizmanın inkübasyon süresi sonunda gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobik ilaç yoğunluğuna minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) denir ve mg/L olarak ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek için, bulunan konsantrasyon duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK, bu sınırdan düşük ise mikroorganizma söz konusu ajana ‘duyarlı’ olarak değerlendirilir. Bunun dışında ‘orta’ ve ‘dirençli’ kategorileri de saptanır. Kullandığımız bitkilerin MİK’leri bu çalışmadaki tüm bakteriler için ayrı ayrı yapılmıştır. Her bitki örneği için 8 tüp LB hazırlanmış olup; bir tüp 4ml, 7 tüp ise 2’şer ml olarak hazırlanmıştır. Tüplerin üzerine 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0,06 ve 0.03ml yazılmıştır. Tüplere 160 µl bitki ekstraktı eklenerek son tüpe kadar seyreltilmiştir. Her tüpe bakteri kültüründen 20’şer µl eklenerek bir gece etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hangi tüpte bakteri ürememişse, o bakteriyi öldüren bitki ekstraktı miktarı odur. Sonuçların değerlendirilmesi şu şekilde yapılmıştır.

MİK değerinin 4 olması durumunda, 1000ml besiyerine eklenen 4 ml bitki ekstraktının bakteriyi öldürmesi anlamına gelir. 5 ml besiyerine eklenen 200 µl bitki ekstraktı öldüren değerdir. Bu değerden daha düşük bir değer eklenmelidir.

MİK’in 2’ye eşit çıkması 1000 ml besiyerine eklenen 2ml bitki ekstraktının bakteriyi öldürmesi anlamına gelir.

MİK’in 4’ten büyük çıkması ise; 1000 ml besiyerine 4 ml bitki ekstraktının bakteriyi öldürmediği anlamına gelir. 5 ml besiyerine 200 µl’den daha fazla bitki ekstraktının eklenmesi gerekir.

3.2.6. AHL Moleküllerinin Tespiti

AHL sinyal moleküllerinin tespiti, *C. violaceum* CV026 (McClellan vd., 1997) ve *Beechams ESS* (*E.coli* süper hassas suş) indikatör suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Açıl yan zincirinde 4-8 karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 indikatör suşu kullanılmıştır. Ortamdaki mevcut AHL molekülleri, *C. violaceum* CV026 indikatör suşunda mor bir pigment olan viyolasinin üretimini uyarır (McClellan vd., 1997). Diğer bir indikatör olarak karbapenem antibiyotiğine hassas olan *Beechams ESS* kullanılmıştır. *E. carotovora*'nın karbapenem antibiyotiğini üretmesi ile ortamdaki *Beechams ESS* 'nin ölmesine yol açarak şeffaf bir zon oluşmasını sağlar.

3.2.6.1. Ramnolipid Üretimi Testi

0.2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/l⁻¹ metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar petripleri kullanılarak test gerçekleştirilmiştir (Siegmond ve Wagner, 1991). Besiyerleri içerisine bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa*'daki MİK değerine göre hesaplanan bitki ekstraktı eklenerek agar katılaşmaya bırakılmıştır. *P. aeruginosa* suşunun LB agar kültüründen petriplerin ortasına steril kürdanla bir koloni ilave edilmiş ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon ramnolipid aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar bitki ekstraktı eklenmemiş PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ramnolipid testi 3 defa denenmiştir.

3.2.6.2. Kayma Testi

P. aeruginosa suşu bir gece LB agar besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Besiyerleri içerisine bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa*'daki MİK değerine göre hesaplanan bitki ekstraktı, otoklavdan çıkmış olan agara eklenerek agar katılaşmaya bırakılmıştır. *P. aeruginosa* suşunun LB agar kültüründen, kayma besiyeri içeren petriplerin ortasına steril kürdanla bir koloni ilave edilmiş ve 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona

bırakılmıştır (Rashid ve Kornberg, 2000). Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar bitki ekstraktı eklenmemiş, PAO1 suyuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kayma testi 3 defa denenmiştir ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.2.6.3. Elastaz Testi

Elastaz aktiviteleri test edilecek bitki ekstraktı eklenmiş *P. aeruginosa* suşuna Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman vd., 1980). *C. violacein* CV026'da mor pigmentin üretilmediği ve *Beechams ESS*'de şeffaf zon oluşturan bitki ekstraktı derişimleri *P. aeruginosa* suşuna eklenerek LB' de 37°C'de 14 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin süpernatantlarından 100 µl, üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7.5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 37°C'de 3saat çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatantın OD si 495nm'de okunarak kayıt edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar bitki ekstraktı eklenmemiş PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Elastaz aktivitesi testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.2.6.4 .Proteaz Testi

P. aeruginosa suşu 14-16 saat LB agar besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Besiyerleri içerisine bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa*'daki MİK değerine göre hesaplanan bitki ekstraktı eklenerek agar katılaşmaya bırakılmıştır. *P. aeruginosa* suşu bir gece LB agar besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Kültürden % 2 yağsız süt tozu içeren LB agar petrilerinin ortasına, steril kürdanla bir koloni ilave edilmiş ve 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır (Dong ve Zhang, 2005). Suşların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir Test sırasında LB negatif kontrol olarak

kullanılmıştır. Sonuçlar bitki ekstraktı eklenmemiş PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Proteaz testi 3 defa denenerek sonuçların ortalaması alınmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Belirlenen Bitkiler

Çizelge 4.1. *E. carotovora*, *C. violaceum* CV026 ve *Beechams ESS* suşlarında, bitki ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonlarının sonuçları

Bakteri Çözücü	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i> CV026	<i>Beechams ESS</i>
Kloroform	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik >4 Nane >4 Kırmızı soğan >4 Sarımsak = 1 Mersin >4 Tesbih yaprak >4 Tesbih tohum >4 Lavanta >4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik = 4 Nane >4 Kırmızı soğan >4 Sarımsak = 0.25 Mersin >4 Tesbih yaprak >4 Tesbih tohum >4 Lavanta = 2 Siyah çay >4 Yeşil çay >4	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik >4 Nane > 4 Kırmızı soğan > 4 Sarımsak =0.5 Mersin > 4 Tesbih yaprak > 4 Tesbih tohum > 4 Lavanta = 4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4
Etil Asetat	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik = 4 Nane >4 Lavanta >4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik >4 Nane >4 Lavanta >4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4	Defne >4 Acı yavşan = 4 Adaçayı = 4 Kekik >4 Nane >4 Lavanta = 4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4

Çizelge 4.1 (devamı)

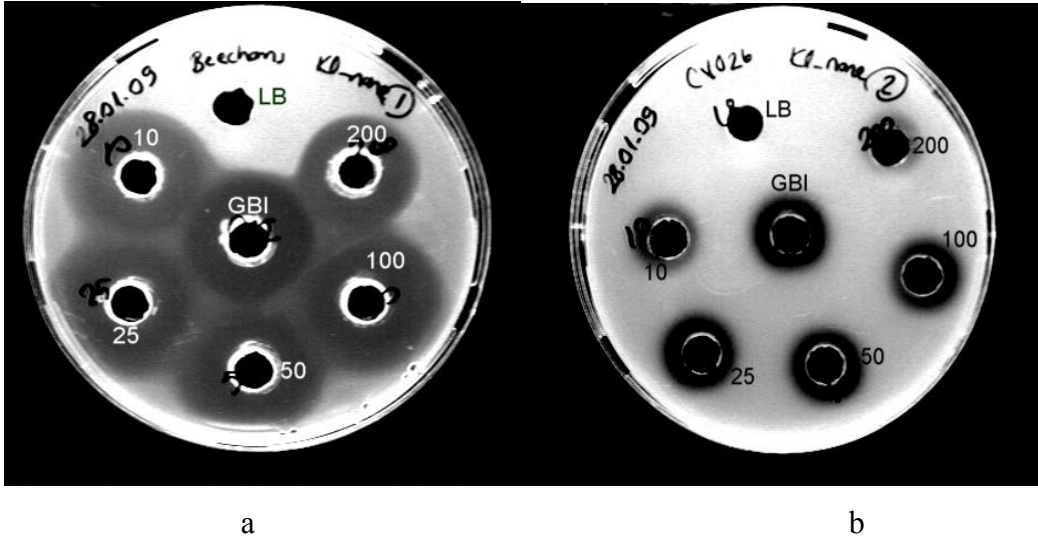
Metanol	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik = 4 Nane >4 Kırmızı soğan >4 Sarımsak >4 Mersin>4 Tesbih yaprak>4 Tesbih tohum>4 Lavanta >4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4	Defne = 4 Acı yavşan = 4 Adaçayı >4 Kekik = 4 Nane >4 Kırmızı soğan >4 Sarımsak = 0.5 Mersin>4 Tesbih yaprak>4 Tesbih tohum>4 Lavanta >4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4	Defne = 4 Acı yavşan = 4 Adaçayı >4 Kekik = 4 Nane > 4 Kırmızı soğan > 4 Sarımsak > 4 Mersin> 4 Tesbih yaprak> 4 Tesbih tohum> 4 Lavanta >4 Siyah çay >4 Yeşil çay >4
Etanol	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik = 2	Defne >4 Acı yavşan >4 Adaçayı >4 Kekik = 4	Defne >4 Acı yavşan = 4 Adaçayı = 4 Kekik = 4

Çizelge 4.2. İndikatör suşlarda inhibisyon zonu gösteren bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa*'da MİK değerleri

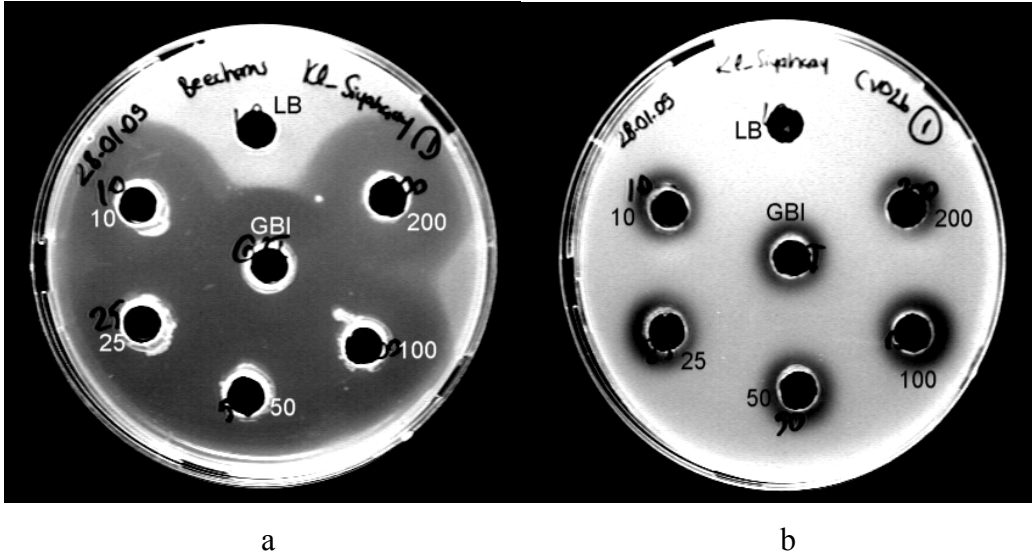
Bitki ekstraktı \ Bakteri	<i>P.aeruginosa</i>
Kloroform-Kekik	>4
Etil asetat-Kekik	=4
Etanol-Adaçayı	=4
Kloroform-Lavanta	>4

4.2. İndikatör Suşlarda N-butanol-L-homoserin lakton (BHL) ve N-3-(okzododekanol)-L-homoserin lakton (OdHL) Sinyal Moleküllerinin Üretimi

C. violaceum CV026 ve *Beechams ESS* indikatör suşları kullanılarak, BHL sinyal molekülünün üretilmediği tespit edilen örnekler için kuyucuk metodu kullanılmıştır. Bazı bitki ekstraktlarının, indikatör suşların sinyal molekülü üretimine bir etkisi olmadığı deneysel olarak kanıtlanmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2)



Şekil 4.1. Nane bitkisinin kloroform ekstraktı ile kuyucuk testi a) *Beechams ESS*'de b) *C. violaceum* CV026'da



Şekil 4.2. Siyahçay bitkisinin kloroform ekstraktı ile kuyucuk testi a) *Beechams ESS*'de b) *C. violaceum* CV026'da

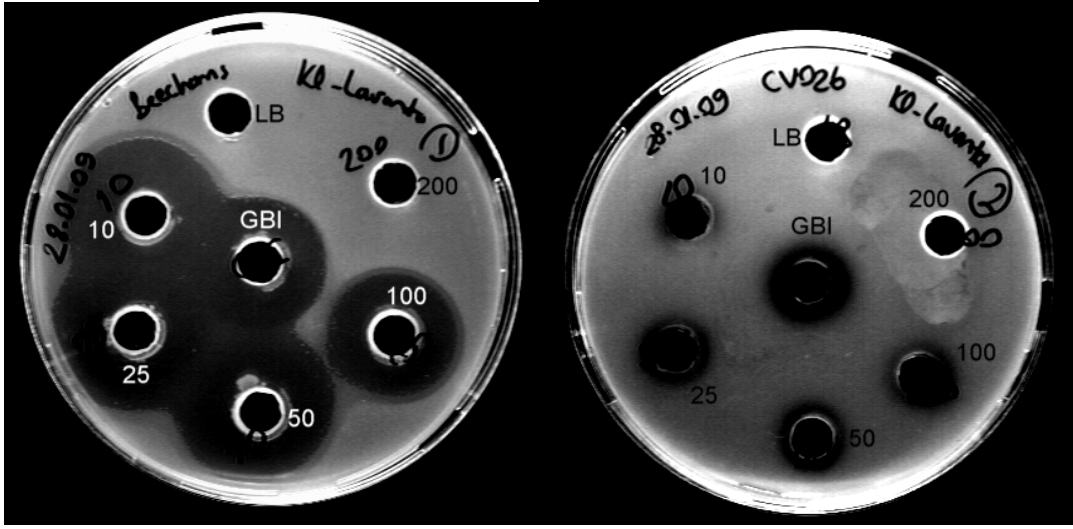
4.3. İndikatör Suşlarda İnhibisyon Gösteren Bitki Ekstraktları ve Kuyucuk Testi Bulguları



Şekil 4.3. Kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının kuyucuk testi a) *Beechams ESS*'de b) *C. violaceum CV026*'da



Şekil 4.4. Adaçayı bitkisinin etanol ekstraktının kuyucuk testi a) *Beechams ESS*'de b) *C. violaceum CV026*'da

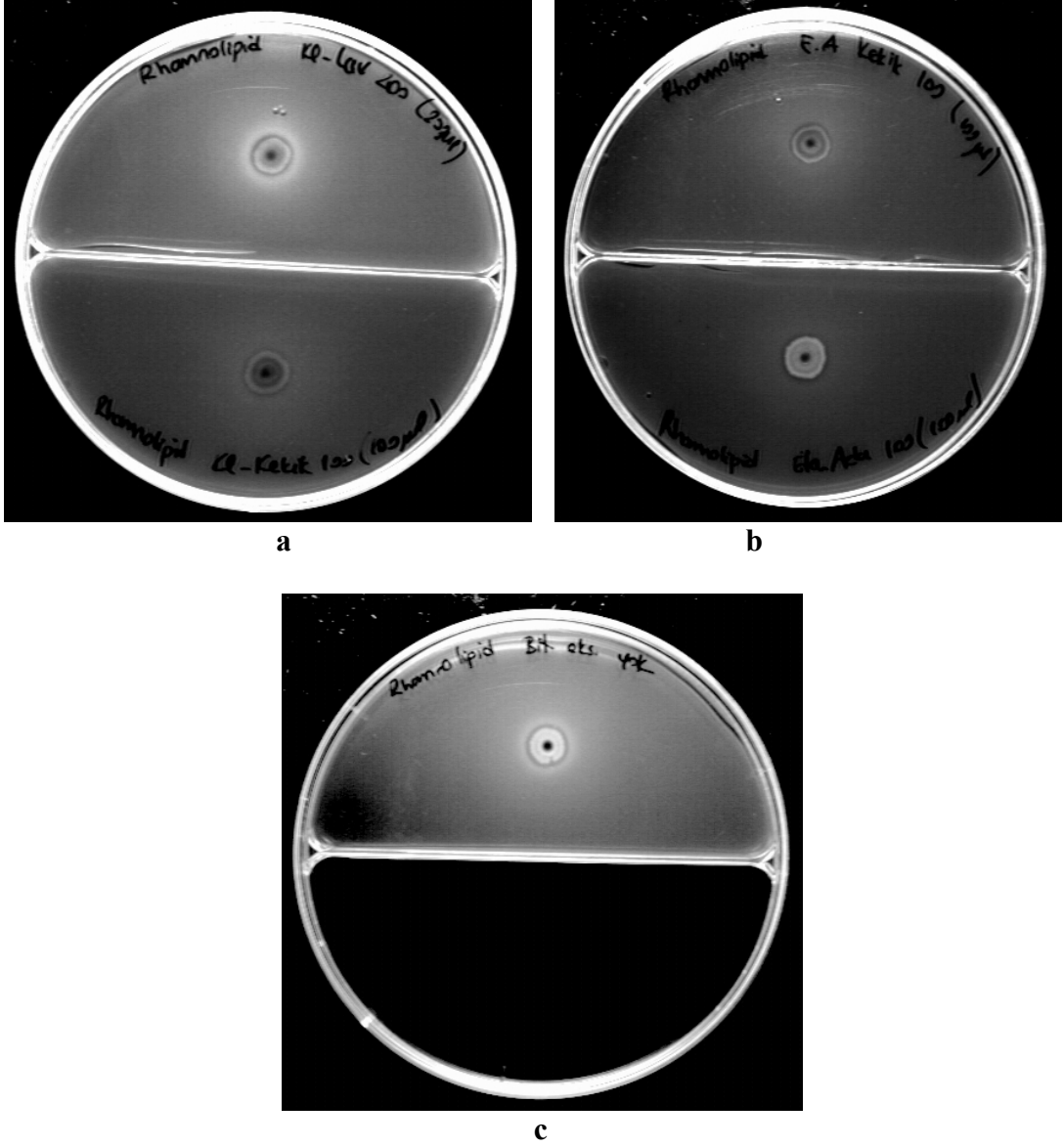


Şekil 4.5. Lavanta bitkisinin kloroform ekstraktının kuyucuk testi a) *Beechams ESS*'de b) *C. violaceum CV026*'da



Şekil 4.6. Kekik bitkisinin kloroform ekstraktının kuyucuk testi a) *Beechams ESS*'de b) *C. violaceum CV026*'da

4.4. *P. aeruginosa*'da Ramnolipid Üretimi ve Bulgular

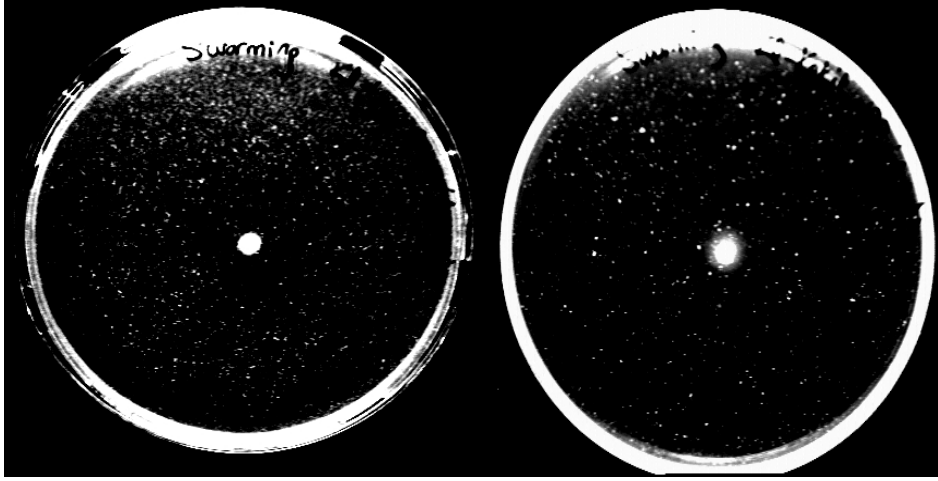


Şekil 4.7. *P. aeruginosa*'da a) lavanta ve kekik bitkisinin kloroform ekstraktının b) kekik bitkisinin etil asetat ve adaçayı bitkisinin etanol ekstraktlarının c) bitki ekstraktı eklenmemiş besiyerinde ramnolipid üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan test

4.5. *P. aeruginosa*'da Kayma (Swarming) Testi ve Bulgular

Çizelge 4.3. *P. aeruginosa*'da Kayma testi sonuçları

Zon Çapı	
Kloroform-Lavanta (200µl)	0.5cm
Kloroform-Kekik (100 µl)	0.8cm
Etil Asetat-Kekik (100 µl)	0.7cm
Etanol-Adaçayı (100 µl)	1.7cm
Bitki Ekstraktı Olmayan	3 cm



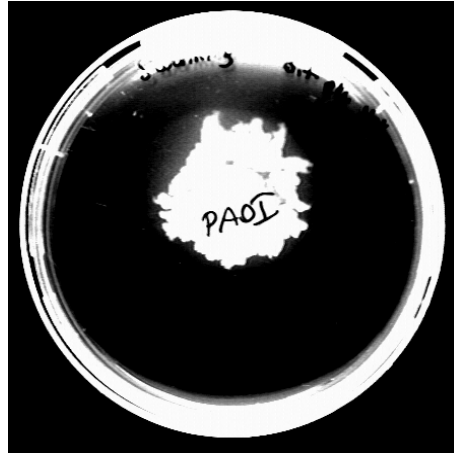
a

b



c

d



e

Şekil 4.8. *P. aeruginosa*'da a) lavanta bitkisinin kloroform ekstraktının b) kekik bitkisinin kloroform ekstraktının c) kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının d) adaçayı bitkisinin etanol ekstraktının e) bitki ekstraktı olmayan besiyerinde kayma hareketi üzerine etkisinin testi

4.6. *P. aeruginosa*'da Elastaz Üretimi ve Bulgular

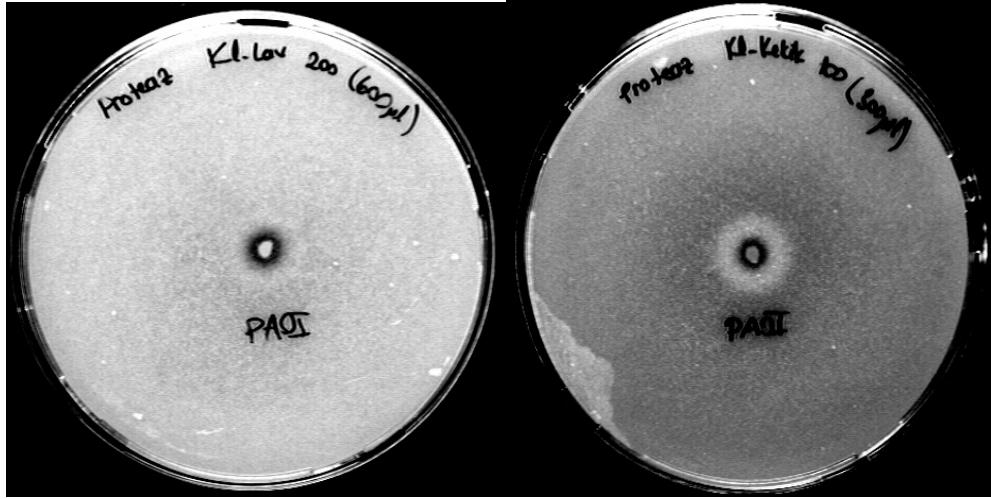
Çizelge 4.4. *P. aeruginosa*'da Elastaz Üretimi ve Sonuçları
OD

Kloroform- Lavanta (200 µl)	0.229nm
Kloroform- Lavanta (100 µl)	0.767
Kloroform- Lavanta (50 µl)	0.984
Kloroform- Kekik (100 µl)	0.237
Kloroform- Kekik (50 µl)	0.583
Etil Asetat- Kekik (100 µl)	0.333
Etil Asetat- Kekik (50 µl)	0.791
Etanol- Adaçayı (100 µl)	0.639
Etanol- Adaçayı (50 µl)	0.702
PAO1	0.634
PAO1 + 200 µl etanol	0.290
LB	0.280

4.7. *P. aeruginosa*'da Proteaz Zon Çapları Bulguları

Çizelge 4.5. *P. aeruginosa*'da Proteaz Zon Çapları

Zon Çapı	
Kloroform- Lavanta (200 µl)	0.85 cm
Kloroform- Kekik (100 µl)	0.75 cm
Etil Asetat- Kekik (100 µl)	1.1cm
Etanol- Adaçayı (100 µl)	1.4cm
Bitki Ekstraktı Olmayan	1.7cm



a

b



c

d



e

Şekil 4.9. *P. aeruginosa*'da a) lavanta bitkisinin kloroform ekstraktının b) kekik bitkisinin kloroform ekstraktının c) kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının d) adaçayı bitkisinin etanol ekstraktının e) bitki ekstraktı olmayan besiyerinde protez üretimi üzerine etkisinin testi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok mikroorganizma türü sosyal bir davranış sergilemektedir. Üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir çoğunluğa ulaşip ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylelikle, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak başarılı bir enfeksiyon sürecini oluşturmaktadır (Saraçlı, 2006).

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

Öte yandan, çevreyi algılama molekülleri aracılığı ile gerçekleştirilen iletişimin bozulması durumunda ise mikroorganizmaların koordineli davranamayacakları ve başarılı bir enfeksiyon süreci ortaya koyamayacakları açıktır. Bu açıdan bakıldığında, çevreyi algılama çalışmalarının yeni ve önemli bir antibiyoterapi alanı olduğu görülmektedir.

Çevreyi algılama sistemini engelleyici bileşenlerin ilk örneği olan *D. pulchra*'dan elde edilen halojenlenmiş furanonlardır. Son zamanlarda bakteriyel çevreyi algılamayı engelleyen bileşenleri üretebilen vanilya, L-canavanine, sarımsak, bezelye tohumu gibi bitkilerle inhibisyon kanıtlanmıştır (Saraçlı, 2006).

Son zamanlarda üzerinde çalışılan ve çevreyi algılama sistemiyle düzenlenen davranışları, bitkilerden elde edilen doğal inhibitörlerle engelleme amacıyla başladığımız çalışmamızda kullandığımız 13 bitkiden elde edilen 39 ekstraktın 4 tanesi indikatör suşlarda çevreyi algılamayı engelleyici bir davranış göstermiştir. Bu nedenle bu 4 ekstrakt (kekik bitkisinin kloroform ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı ve kekik bitkisinin etil asetat ekstraktı) önemli bir insan patojeni olan *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama ile kontrol

edilen davranışları engelleyip engellemediği kuyucuk metoduyla gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama ile düzenlenen kayma hareketi, elastaz aktivitesi, proteaz ve ramnolipid üretimini etkilediği bulunmuştur.

Buna göre kayma testinde, kekik bitkisinin kloroform ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı ve kekik bitkisinin etil asetat ekstraktı eklendiği besiyerlerindeki bakterilerin kayma hareketi, bitki ekstraktı eklenmeyen PAO1'e göre çok daha küçük bir zon çapında ölçülmüştür.

Proteaz testinde yine kekik bitkisinin kloroform ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı ve kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının eklendiği besiyerlerindeki bakterilerin proteaz üretimi bitki ekstraktı eklenmeyen PAO1'e göre çok daha küçük bir zon çapında ölçülmüştür.

Çevreyi algılama sistemi, besin kaynaklarının kısıtlı olduğu durumlarda ramnolipid üretimini uyararak, besin kaynaklarının bulunduğu ortamlara doğru bakterinin hareketine imkan sağlar (Ulusoy, 2007). Ramnolipid testinde kekik bitkisinin kloroform ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı ve kekik bitkisinin etil asetat ekstraktının eklendiği besiyerlerindeki bakterilerin ramnolipid üretimi bitki ekstraktı eklenmeyen PAO1'e göre çok daha küçük bir zon çapında ölçülmüştür.

Elastaz aktivitesi açısından *P. aeruginosa*'da denediğimiz 4 bitki ekstraktı olan kekik bitkisinin kloroform ekstraktı, lavanta bitkisinin kloroform ekstraktı, adaçayı bitkisinin etanol ekstraktı ve kekik bitkisinin etil asetat ekstraktı analiz edilmiştir. ECR (elastin congo red assay) uygulanarak analiz gerçekleştirilmiş ve PAO1 kontrol suşuyla karşılaştırıldığında daha az aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir.

Antibiyotik direnci çok fazla olan *P. aeruginosa* ve bunun gibi patojenitesi yüksek bakterilerin, çevreyi algılama ile düzenlediği virülens faktörlerini, antibiyotik yerine tıbbi öneme sahip olan doğal özlerle engellemek daha umut verici bir yaklaşımdır.

Şimdiye kadar yapılan bazı çalışmalarla *P. aeruginosa*'da ve diğer bazı önemli patojen bakterilerde çevreyi algılama 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 çevreyi algılama sistemini engelleyici bileşenlerin çoğu insan kullanımına uygun değildir. Toksisite ve canlı içindeki etki testleri potansiyel adayları azaltmıştır. Örneğin; halojenlenmiş furanonlar son derece toksik ve reaktif olmaları sebebiyle endüstride, tıpta ve tarımda kullanımları mümkün değildir (Saraçlı, 2006).

Bazı furonon bileşiklerinin gökkuşağı alabalığında öldürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden zehirli olmayan yeni çevreyi algılama engelleyicilerinin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Bundan dolayı, insan, hayvan ve bitki hastalıklarının kontrolü için doğal olan bitkilerin kullanılması yeni bir hedeftir (Boşgelmez-Tınaz vd., 2006).

Ayrıca bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç mekanizmasının olması böyle bitki özleriyle yapılmış olan çalışmaların önemini bir kat daha arttırmaktadır. Çünkü, bitkilerden elde edilen AHL analoglarıyla yapılan bakteriyel üremenin veya sinyal alımının engellenmesine karşı bakteride bir direnç gelişimi söz konusu değildir.

Antibiyotik olmayan bu engelleyicilerin tanımlanması, bitkiler ve hayvanlar gibi insanlarda da bakteriyel hastalıkların tedavisi için, bize yeni fırsatlar sunabilir.

Özet olarak tez çalışmamızda kullandığımız 39 ekstraktın 4 tanesi *P. aeruginosa* gibi çok önemli bir insan patojeninde inhibisyon göstermiştir. Kaynak araştırmasında, kullandığımız bu bitki ekstraktlarının inhibisyonunun daha önce belirlenmemiş olması mevcut bilgilere katkı açısından önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Bassler, B.L., Losick, R., 2006. Bacterially Speaking. *Cell*, 237-246.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Rasmussen, T.B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H.P., Rygaard, J., Moser, J., Eberl, L., Høiby, N., Givskov, M., 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151, 3873–3880.
- Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., Venturi, V., 2003. Role of Gac A, LasI, Ppk, Psr A, Vfr and Clp XP in the regulation of stationary phase sigma factor rpoS/ Rpo S in *Pseudomonas*. *Archives of Microbiology*, 18, 264-271.
- Bodman, S.B., Bauer, W.D., Coplin D.L., 2003. Quorum Sensing In Plant-Pathogenic Bacteria, *Annual Review of Phytopathology*, 41, 455–482.
- Boşgelmez-Tınaz, G., 2003. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turk Journal of Biology*, 27, 85-93.
- Boşgelmez-Tınaz, G., Ulusoy, S., Uğur, A., Ceylan, Ö., 2006. Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Current Microbiology*, 1-20.
- Cámara, M., Williams, P., Hardman, A., 2002. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *The Lancet Infectious Diseases*, 2, 667–676.
- Chen, X., Schauder, S., Pelczar I., Bassler, B.L., Hughson, F.M., Potier, N., Dorselaer, A.V., 2002. Structural Identification of a Bacterial Quorum Sensing Signal Containing Boron. *Nature*, 415-545.
- Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwan, J.K., 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 42, 637–641.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 261–289.
- 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. *Journal of Bacteriology*, 183, 1195–1204.
- Delden, C.V., Iglewski, B.H., 1998. Cell-to cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 551–560.

- Dong, Y.H., Zhang, L.H., 2005. Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *The Journal of Microbiology*, 101-109.
- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H.L., Greenberg, P., Zhang, L., 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 56, 1287-1301.
- Dowell, P., Affas Z., Reynolds, C., Holden, M.T.G., Wood, S.J., Saint, S., Cockayne, A., Hill, P.J., Dodd, C.E.R., Bycroft, B.W., Chan, W.C., Williams, P., 2001. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 41(2), 503–512.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176, 269–275.
- Hardman, A.M., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 199–210.
- Hodgkinson, J.T., Welch, M., Spring, D.R., 2007. Learning the Language of Bacteria. *Acs Chemical Biology*, 715-717.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 204–208.
- Gomi, K., Kikuchi, T., Tokue, Y., Fujimura, S., Uehara, A., Takada, H., Watanabe, A., Nukiwa, T., 2006. Mouse and human cells activation by *N*-dodecanoyl-DL-homoserine lactone (C12 HSL), a *Chromobacterium violaceum* autoinducer. *American Society for Microbiology and/or the Listed Authors/Institutions*, 1-17.
- Hentzer, M., Givskov, M., 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Thejournal of Clinical Investigation*, 112, 1300-1307.
- Jayaraman, A., Wood, T.K., 2008. Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 145–167.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P., Limpert, A.S., Götz, F.V., Steinmetz, I., Eberl, L., Tümmeler, B., 2004. Global

regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 831–841.

Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B., 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environmental Microbiology, 7(4), 459–471.

Kanamaru, K., Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobel, T., Sasakawa, C., 2000. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Molecular Microbiology, 38(4), 805-816.

Kayser F., 2005. Basic Principles of Medical Microbiology and Immunology. In: Medical Microbiology. (Kayser F., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R., eds.) Thieme Stuttgart New York, 18-20, New York.

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. Journal of Bacteriology, 182, 5990–5996.

Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond G.P.C., Kjelleberg, S., 2001. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. FEMS Microbiology Letters, 205, 131-138.

McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology, 143, 3703-3711.

McGowan, S.J., Holden, M.T.G., Bycroft B.W., Salmond, G.P.C., 1999. Molecular genetics of carbapenem antibiotic biosynthesis. Antonie van Leeuwenhoek, 75, 135–141.

McGrath, S., Wade, D.S., Pesci, E.C., 2004. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). FEMS Microbiology Letters, 230, 27-34.

Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B., 2008. Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. Medicinal Research Reviews, 65-124.

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

Otto, M., 2004. Quorum-sensing control in *Staphylococci* – a target for antimicrobial drug therapy?. FEMS Microbiology Letter, 241, 135–141.

- Rashid, M.H., A. Kornberg., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *P. aeruginosa*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 97, 4885–4890.
- Rasmussen, T.B., Givskov, M., 2006. Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. International Journal of Medical Microbiology, 296, 149-161.
- Rasmussen, T., Givskov, M., 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology, 152, 895-904.
- Reading, N.C., Sperandio, V., 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiology Letter, 254, 1–11.
- Ren, D., Sims, J.J., Wood, T.K., 2001. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5 (bromomethylene)-3- butyl-2(5H)-furanone. Environmental Microbiology, 731-736.
- Saraçlı, M.A., 2006."Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. Gülhane Tıp Dergisi, 244-250.
- 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 and Chemical Toxicology, 1-9.
- Smith, K.M., Bu, Y., Suga, H., 2003. Induction and Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs. Chemistry & Biology, Vol. 10, 81–89.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Kaper, J.B., 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. Molecular Microbiology, 43(3), 809–821.
- Steindler, L., Venturi, V., 2007. Detection of quorum-sensing N -acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. FEMS Microbiology Letter, 266, 1–9.
- Ulusoy, S., 2007. Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması. Isparta, Doktora Tezi, 100, Isparta.
- Tateda, K., Matsumoto, N., Furuya, N., Nagashima, T. 1996. Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolids: Exposure-dependent bactericidal

activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 40, 2271-2275.

- Tümmler, B., 2006. Clonal Variations In *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas*. (Ramos, J.L., Levesque, R.C.,-eds), 35-68, Springer, Netherlands.
- Wagner, W.E., Iglewski, B.H., 2005. Quorum sensing and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: *Bacterial Cell-to-Cell Communication Role in Virulence and Pathogenesis*. (Demuth, D.R., Lamont, R.J.,-eds.) United States of America by Cambridge University, 1-23, New York.
- Wang, W., Morohoshi, T., Ikeda, T., Chen, L., 2008. Inhibition of Lux quorum-sensing system by synthetic *N*-acyl-L-homoserine lactone analogous. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1023-1028.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319–346.
- Whitchurch, C.B., 2006. Biogenesis And Function Of Type IV Pili In *Pseudomonas* Species. In: *Pseudomonas*. (Ramos, J.L., Levesque, R.C.,-Eds), 139-188, Springer, Netherlands.
- Winstanley, C., Fothergill, J.L., 2009. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections, *FEMS Microbiology Letter*, 290, 1–9.
- Venturi, V., 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*, *FEMS Microbiology Review*, 30, 274–291.
- Zhang, L.H., Dong, Y.H., 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular Microbiology*, 53, 1563-1571.
- http 1. www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/haberlesme.htm Erişim tarihi. 03.04.2009
- http 2. <http://serc.carleton.edu/microbelife/topics/marinesymbiosis/squid-vibrio/collection.html> Erişim tarihi. 25.05.2009
- http 3. <http://www.cheme.caltech.edu/groups/fha/quorum.html> Erişim tarihi. 27.04.2009
- http 4. <http://www.modares.ac.ir> Erişim tarihi. 27.04.2009
- http 5. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transfection_by_Agrobacterium.svg Erişim tarihi.27.05.2009

- http 6. http://dtp.nci.nih.gov/timeline/noflash/success_stories/S5_depsipeptide.htm Erişim tarihi. 20.05.2009
- http 7. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942122041.pdf> Erişim tarihi.03.04.2009
- http8. http://www.med.sc.edu:85/fox/e_coli-dk.jpg Erişim tarihi. 20.05.2009
- http 9. <http://www.biyoweb.net/blog/escherichia-coligelecegin-enerji-kaynagi> Erişim tarihi. 27.05.2009
- http 10. <http://www.sanger.ac.uk/Info/News-releases/2004/040720.shtml> Erişim tarihi. 20.05.2009
- http 11. <http://www.padil.gov.au/pbt/index.php?q=node/13&pbtID=128> Erişim tarihi. 20.05.2009
- http 12. http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp Erişim tarihi. 20.04.2009
- http13. <http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa> Erişim tarihi. 28.05.2009
- http 14. http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n9/box/nrm907_BX2.html Erişim tarihi. 28.05.2009
- http 15. <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/> Erişim tarihi. 27.04.2009
- http 16. http://infeksiyon.dergisi.org/pdf/pdf_INF_221.pdf Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 17. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Laurus_azorica_\(Flowers\).jpg](http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Laurus_azorica_(Flowers).jpg) Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 18. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Defne> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 19. <http://www.agacler.net/galeri/showimage.php?i=15549> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 20. http://tr.wikipedia.org/wiki/Pelin_otu Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 21. http://cennetimtarimurunleri.com/img/kirmizi_sogan.jpg Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 22. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Soğan> Erişim tarihi. 13.08.2009

- http 23. <http://www.aricilik.gov.tr/teknik/ballibitki/index.htm#3> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 24. <http://www.agaclar.net/forum/attachment.php> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 25. <http://www.sifalibitkiler.us/archives/566> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 26. <http://www.sifalibitkiler.us/archives/566> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 27. <http://www.aricilik.gov.tr/teknik/ballibitki/index.htm#3> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 28. <http://www.aricilik.gov.tr/teknik/ballibitki/index.htm#3> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 29. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Nane> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 30. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sarimsak> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 31. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sarimsak> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 32. <http://www.50mucizebitki.com/mersin.html> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 33. <http://www.50mucizebitki.com/mersin.html> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 34. http://tr.wikipedia.org/wiki/Tespah_ağacı Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 35. <http://agaclar.net/forum/showthread.php?p=466239> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 36. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Lavanta> Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 37. http://organic_tea.win.mofcom.gov.cn/en/plate01/product.asp?id=48212 Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 38. [http://tr.wikipedia.org/wiki/çay_\(içecek\)](http://tr.wikipedia.org/wiki/çay_(içecek)) Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 39. http://tr.wikipedia.org/wiki/Yeşil_çay Erişim tarihi. 13.08.2009
- http 40. <http://maps.google.com/maps?ll=37.44235,31.367103&z=7&t=h&hl=tr> Erişim tarihi. 13.08.2009

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Eylem YURT GÖZE

Dogum Yeri ve Yılı: Niksar/1983

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili :İngilizce

Egitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Niksar Danişmend Gazi Süper Lisesi 1998-2001

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü 2002-2006

Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı 2006-(devam ediyor)

Çalıştığı Kurum : 1. Alanya Devlet Hastanesi'nde Yaz Stajı, 2003-2004

Öğretim Yılı.

2. Fen Bilimleri Enstitüsü Personel ve Dergi İşleri Kısmi Zamanlı Çalışma, 2006-2007 Öğretim Yılı.

3. SDÜ Gelendost Meslek Yüksek Okulu Gıda Teknolojisi Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Dersi için Dışarıdan Atama ile Öğretim Görevlisi, 2006-2007 Öğretim Yılı.

4. Fen Bilimleri Enstitüsü Personel ve Dergi İşleri Kısmi Zamanlı Çalışma, 2007-2008 Öğretim Yılı.

5. Özel Genç Rekor Dershane, Biyoloji Öğretmenliği, 2009-2010 Öğretim Yılı-Devam.