

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVREYİ ALGILAMA (QUORUM SENSING) İNHİBİTÖRÜ
OLARAK TASARLANAN MOLEKÜLLERİN ETKİLERİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ebru ÖNEM

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY**

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA -2013**

© 2013 [Ebru ÖNEM]

TEZ ONAYI

Ebru ÖNEM tarafından hazırlanan " **Çevreyi Algılama (Quorum Sensing) İnhibitörü Olarak Tasarlanan Moleküllerin Etkileri Üzerine Çalışmalar** " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Gülgün TINAZ
Marmara Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Yasemin DÜNDAR
Gazi Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Bayram ÇEVİK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Selma TABUR
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Ebru ÖNEM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Çevreyi Algılama (Quorum Sensing) Sistemi Ve Bu Sistemi Kullanan Bakteri Türleri.....	4
2.2. Gram Negatif Bakterilerde Görülen AHL Aracılı (LuxI/LuxR Tipi) Çevreyi Algılama Sistemi.....	5
2.2.1. LuxI/LuxR Tipi Çevreyi Algılama Sistemi Görülen Gram Negatif Bakteri Türleri.....	9
2.2.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'te Çevreyi Algılama.....	9
2.2.1.3. <i>Chromobacterium violaceum</i> 'da Çevreyi Algılama	9
2.2.1.4. <i>Erwinia carotovora</i> 'da Çevreyi Algılama	10
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Çevreyi Algılama Sistemi ve Bu Sistem Tarafından Kontrol Edilen Virülens Faktörleri.....	11
2.3.1. <i>las</i> çevreyi Algılama Sistemi	11
2.3.2. <i>rhl</i> Çevreyi Algılama Sistemi	12
2.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Virülens Faktörleri.....	13
2.3.4.1. Kirpik (Flagella).....	13
2.3.4.2. Adezinler	14
2.3.4.3. Lipopolisakkarit (LPS).....	14
2.3.4.4. Ekzopolisakkarit (Alginat).....	14
2.3.4.5. Endotoksin	15
2.3.4.6. Ekzotoksin A.....	15
2.3.4.7. Ekzoenzim S-T (ExoS)	15
2.3.4.8. Enterotoksin	15
2.3.4.9. Sitotoksin (lokosidin)	15
2.3.4.10. Hemolizinler.....	16
2.3.4.11. Elastaz ve Alkalen Proteaz.....	16
2.3.4.12. Piyosiyanin.....	16
2.3.4.13. Biyofilm	17
2.4. Gram Pozitif Bakterilerde Çevreyi Algılama Sistemi.....	18
2.5. Hibrit Tipi (Autoinducer 2 tipi) Çevreyi Algılama Sistemi	19
2.6. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibisyon Mekanizmaları.....	21
2.6.1. AHL sinyal molekülünün sentezinin önlenmesi	22
2.6.2. AHL sinyal molekülünün yıkılması	23
2.6.3. AHL sinyal molekülünün alınmasının önlenmesi.....	24
2.7. Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Tasarlanan Moleküllerin Sentezi.....	28
3.1.2. Sentez Yöntemleri.....	31
3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları	34

3.3. U65, U77, U92 Moleküllerinin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özelliklerinin Test Edilmesi	36
3.3.1. QSI1 (Quorum Sensing Selector Strain 1) Testi.....	36
3.3.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> 026 - <i>Chromobacterium violaceum</i> VIR07 Pigment Üretim Testi	38
3.4. <i>rhlI</i> , <i>lasI</i> , <i>lasR</i> ve <i>rhlR</i> Genlerinin PCR ile Analizi	38
3.5. İnhibitör Etkisi Araştırılan Moleküllerin (U65, U77, U92) Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MIK) ve Büyüme Eğrileri	40
3.6. <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P.aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 Klinik İzolatlarının Antibiyotik Hassasiyetlerinin Araştırılması (Disk difüzyon yöntemi)	41
3.7. Virülens Faktörleri Üretim Testleri.....	42
3.7.1 Elastaz Testi	42
3.7.2. Piyosianin Testi.....	43
3.7.3. Proteaz testi	44
3.7.4. Kayma Hareketi Testi	44
3.7.5. Biyofilm Oluşum Testi.....	44
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	47
4.1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Tasarlanan Moleküllerin Seçimi.....	47
4.2. U65, U77, U92 Moleküllerinin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özelliklerinin Test Bulguları.....	48
4.2.1.QSI1(Quorum Sensing Selector Strain 1) Test Bulguları.....	48
4.2.2. <i>C. violaceum</i> 026 ve <i>C. violaceum</i> VIR07 Pigment Üretim Testi Bulguları	48
4.3. Klinik İzolatların Çevreyi Algılama Sistemi Genlerinin Araştırılması	49
4.4. Büyüme ve Gelişme Eğrileri.....	50
4.5. Antibiyotik Hassasiyet Testi	52
4.6. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Elastaz Üretimine Etkisi	54
4.7. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Piyosianin Üretimine Etkisi	62
4.8. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Kayma Hareketine Etkisi	69
4.9. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Proteaz Üretimi Etkisi.....	76
4.10. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Biyofilm Oluşumuna Etkisi	80
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	103

ÖZET

Doktora Tezi

ÇEVREYİ ALGILAMA (QUORUM SENSİNG) İNHİBİTÖRÜ OLARAK TASARLANAN MOLEKÜLLERİN ETKİLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Ebru ÖNEM

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY

Hücre-hücre iletişim ile popülasyon yoğunluğuna bağlı iletişim mekanizması çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılmakta ve pek çok bakteri cinsinde görülmektedir. Bakteriler arasındaki bu iletişimin temeli, bakterilerin bulundukları ortama otourarıcı (AI) sinyal molekülü olarak adlandırılan bir takım maddeleri sentezlemeleri ve sentezlenen bu maddelerin yoğunluğu ile ortamdaki popülasyon yoğunluklarını algılayabilmeleri ve bunun neticesinde de sinyal moleküllerinin özel genlerin ekspresyonun da rol oynamasına dayanmaktadır. Bakteriler bu şekliyle yüzlerce davranış sergilemekte fakat bunlar içerisinde en önemli olanı enfeksiyon hastalıkların kaynağı olan virülens faktörlerinin bu sistem aracılığı ile sentezidir.

Bakterilerde çok fazla sinyal molekülü tanımlanmış olup Gram negatif bakterilerde yaygın olarak açıl homoserin lakton sinyal molekülü adı verilen moleküller görülmektedir. Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemini, virülens faktörleri üretmek, biyofilm oluşumunu sağlamak, kayma hareketi yapmak gibi hastalıkların patogeneğinde önemli rolü olan olayların düzenlenmesinde kullanır. Çevreyi algılama sistemini virülens faktörlerinin regülasyonundan sorumlu olmasının keşfinden sonra bu sistemin inhibisyonu sağlanarak bakterilerle mücadelede yeni tedavi stratejileri olarak düşünülebilmektedir.

Bu amaçla çevreyi algılama sisteminde önemli rolü olan açıl homoserin lakton moleküllerinin analogları sistemin inhibisyonu üzerine denenmektedir. Bu çalışmada çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak tasarlanıp sentezlenen benzimidazol türevi moleküllerin (U65, U77, U92) virülens faktörleri piyosyanin, elastaz, proteaz üretimi, kayma hareketi üzerine etkisi ile biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla çalışma kapsamına *P. aeruginosa* PA01 ve farklı vücut dokularından izole edilen dokuz adet klinik izolat dahil edilmiştir. Çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak tasarlanan moleküllerin inhibitör etkileri biyomonitör suş olan QSI1 ve *C. violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07 suşları kullanılarak tespit edilmiştir. İnhibitör etkileri tespit edilen moleküllerin virülens faktörleri kayma hareketi ve biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkileri araştırılmış ve sonuçta çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak sentezlenen benzimidazol türevi moleküllerin (U65, U77, U92) virülens faktörleri üzerinde önemli inhibitör etkilerinin olduğu görülmüştür. Özellikle *P. aeruginosa* PA01 suşunda biyofilm ve kayma hareketi üzerine % 56- % 74 arasında değişen inhibisyon oranları gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çevreyi Algılama, *N*-Açıl homoserin lakton, *Pseudomonas aeruginosa*, virülens faktörleri.

2013, 103 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

STUDIES ON EFFECTS OF NOVEL QUORUM SENSING INHIBITORY MOLECULES

Ebru ÖNEM

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Seyhan ULUSOY

Density-dependent cell-cell communication, or quorum sensing (QS), has been demonstrated in numerous species of bacteria. And bacteria communicate with each other within their vicinity using chemical signalling molecules which are known as autoinducers (AI). Quorum sensing relies on these autoinducers to control gene expression in response to changes in bacterial cell density. Several signalling molecules have been identified and the most common type in most Gram negative bacteria are the *N*-acylhomoserine lactones (AHLs). Quorum sensing signal molecules are also emerging as multifunctional molecules that influence life, significantly the outcome of host pathogen interactions. In the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* also use quorum sensing systems. In *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems plays a very important role in the regulation of biofilm formation, virulence factors, conjugation and swarming motility. The discovery of quorum sensing systems regulating bacterial virulence has afforded a novel opportunity to control infections without interfering with growth.

In this purposes new AHL analogs synthesis and investigated for inhibition of quorum sensing. In this study we investigated inhibitor effect of several novel benzimidazole molecules named U65, U77 and U92 on some virulence factors elastase, pyocyanin, protease, swarming motility and biofilm formation in *P. aeruginosa* PA01 and 9 clinical *P. aeruginosa* isolates. U65, U77 and U92 screened for anti-quorum sensing activity using a biomonitor strain, QSI1(Quorum Sensing Selector Strain 1) and *Chromobacterium violaceum* CV026, *Chromobacterium violaceum* VIR07. All of them showed anti-QS activity and the inhibitory effect of U65, U77 and U92 on production of elastase, protease, pyocyanin, swarming motility and biofilm formation has been observed. Conclusion novel benzimidazole molecules inhibited especially swarming motility and biofilm formation on *P. aeruginosa* PA01 strain between % 56- %74.

Keywords: Quorum sensing, *N*-acyl-homoserine lactone, *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factors.

2013, 103 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca tecrübeleriyle ilgisini ve bilgisini benden esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a ve Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç Dr. Gülgün TINAZ'a, çalışmalarına katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Yasemin DÜNDAR'a,

Bu zorlu yolda hep yanımda olan eşim Hüseyin Başar ÖNEM'e, tecrübeleriyle katkıda bulunan ve her zaman yanımda olan arkadaşım Melike ÇETİNBAS'a, ayrıca aynı süreçleri paylaştığım Ayşegül ÖZAYDIN ve Demet HANÇER AYDEMİR'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Ayrıca 2827-D-11 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ebru ÖNEM
ISPARTA, 2013

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Kültüre edilen <i>Vibrio fischeri</i> suşları.....	6
Şekil 2. 2. Biyoişırma görülen mürkekkep balığı.....	7
Şekil 2. 3. <i>V. fischeri</i> lux Operonu	8
Şekil 2. 4. <i>N</i> -açıl homoserin laktonunun genel yapısı.....	12
Şekil 2. 5. Biyofilm oluşum basamakları	18
Şekil 2. 6. <i>V. harveyi</i> de görülen hibrit tip çevreyi algılama sistemi.	20
Şekil 3. 1. 1,3-dihidro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-on (U65)	31
Şekil 3. 2. 5-metil-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-on (U77)	32
Şekil 3. 3. 1,3-Diasetil-1,3-dihidro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-on (U92)	33
Şekil 3. 4. Açıl türevlerinin genel formülü	32
Şekil 3. 5. Elastaz testi deneysel aşamalar	42
Şekil 3. 6. Piyosiyanın testi deneysel aşamalar.....	43
Şekil 3. 7. Etanolde çözünmüş kristal viyole içeren örnekler	45
Şekil 4. 1. U65, U77 ve U92 molekülleri için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü	48
Şekil 4. 2. U65, U77, U92 moleküllerinin <i>C. violaceum</i> CV 026'da pigment üretimi üzerine etkisinin agar üzerindeki görüntüsü.....	49
Şekil 4. 3. U65, U77, U92 moleküllerinin <i>C. violaceum</i> VIR 07'de pigment üretimi üzerine etkisinin agar üzerindeki görüntüsü.....	49
Şekil 4. 4. Çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	50
Şekil 4.5. U65, U77, U92 Moleküllerinin <i>P.aeruginosa</i> PA01 suşunun gelişimi üzerine etkisi.....	51
Şekil 4. 6. <i>P.aeruginosa</i> PA01 Suşunun disk difüzyon test sonucu	52
Şekil 4. 7. U65, U77, U92 nolu moleküllerin 3mM derişimleri için <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, <i>P. aeruginosa</i> PA01 klinik izolatlarında absorbands (600 nm) değerleri.	55
Şekil 4. 8. <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi (%).....	56
Şekil 4. 9. U65 molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkisi (%).	56
Şekil 4. 10. U77 molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkisi (%).	57
Şekil 4. 11. U92 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkisi (%).	58
Şekil 4. 12. U65, U77, U92 nolu moleküllerin (1):3mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, klinik izolatlarında elastaz üretimine etkisi.	60
Şekil 4. 13. U65, U77, U92 nolu moleküllerin (1):3mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için <i>P. aeruginosa</i> M5, M6, M7, M8, M9, klinik izolatlarında ve PA01 suşunda elastaz üretimine etkisi.....	61
Şekil 4. 14. <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyanın üretimi (%).....	62

Şekil 4. 15. U65 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimi üzerine etkisi (%).....	63
Şekil 4. 16. U77 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimi üzerine etkisi (%).....	64
Şekil 4. 17. U92 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimi üzerine etkisi (%).....	65
Şekil 4. 18. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için M1, M2, M3, M4, M5 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimine etkisi.	67
Şekil 4. 19. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında ve PA01 suşunda piyosiyenin üretimine etkisi.....	68
Şekil 4. 20. <i>P. aeruginosa</i> PA01ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7,M8, M9 klinik izolatlarında kayma hareketi (%).....	69
Şekil 4. 21. U65, U77, U92 Moleküllerinin 1,5mM derişiminin, <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında kayma hareketi üzerine etkisi (mm)	70
Şekil 4. 22. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında ve PA01 suşunda kayma hareketine etkisi.	72
Şekil 4. 23. A - <i>P. aeruginosa</i> PA01 (pozitif kontrol), B - <i>P. aeruginosa</i> PA0-JP2 (negatif kontrol), C - <i>P. aeruginosa</i> PA01+ DMSO kayma hareketi.....	73
Şekil 4. 24. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunda, U65, U77, U92 moleküllerinin 1,5 mM derişiminde kayma hareketi üzerine etkisi	73
Şekil 4. 25. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunda kayma hareketine etkisi.	73
Şekil 4. 26. M1 Klinik izolatında, U65, U77, U92 moleküllerinin 1,5 mM derişiminde kayma hareketi üzerine etkisi	74
Şekil 4. 27. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin <i>P. aeruginosa</i> M1 klinik izolatında kayma hareketi üzerine etkisi.....	74
Şekil 4. 28. M5 Klinik izolatında, U65, U77, U92 moleküllerinin 1,5 mM derişiminde kayma hareketi üzerine etkisi	75
Şekil 4. 29. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin <i>P. aeruginosa</i> M5 klinik izolatında kayma hareketi üzerine etkisi.....	75
Şekil 4. 30. PA0-JP2 negatif kontrol, M7 klinik izolatı kayma hareketi	75
Şekil 4. 31. <i>P. aeruginosa</i> PA01ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7,M8, M9 klinik izolatlarında proteaz üretimi (%).....	76
Şekil 4. 32. U65, U77, U92 nolu moleküllerin 1,5 mM derişimi için M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında ve PA01 suşunda proteaz üretimine etkisi.	77
Şekil 4. 33. U92 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (%).	78
Şekil 4. 34. U77 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (%).	78
Şekil 4. 35. U92 Molekülünün 3mM, 1,5mM ve 0,75mM derişimlerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (%).	79

Şekil 4. 36. <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında biyofilm oluşumu (%).....	80
Şekil 4. 37. U65, U77, U92 Moleküllerinin 3mM derişiminin, <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna etkisi (%)	81
Şekil 4. 38. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3mM derişimi için <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5 klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna etkisi.	82
Şekil 4. 39. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3mM, derişimi için <i>P. aeruginosa</i> PA01 ve <i>P. aeruginosa</i> M6, M7, M8, M9, klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna etkisi.	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1. Çevreyi algılama sistemi görülen bazı bakteriler ve sinyal molekülleri	21
Çizelge 3. 1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Tasarlanan Moleküller	28
Çizelge 3. 2. Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan bakteri suşları ve özellikleri	35
Çizelge 3. 3. QSiS 1 testi için kullanılan besiyeri içeriği	37
Çizelge 3. 4. <i>rhlI</i> , <i>lasI</i> , <i>lasR</i> ve <i>rhlR</i> gen bölgelerinin PCR analizi için kullanılan primerler ve oluşacak ürün büyüklükleri	39
Çizelge 3. 5. PCR reaksiyon karışımı	40
Çizelge 4. 1. Çevreyi algılama sistemi inhibitör aday moleküller ve yapısal kompozisyonları	47
Çizelge 4. 2. <i>P.aeruginosa</i> PA01 suşu ve <i>P. aeruginosa</i> M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 Klinik İzolatlarının Farklı Antibiyotiklere Hassasiyetleri	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ACP	Açıl taşıyıcı protein
AHL	Açıl Homoserin Lakton
AI	Otuyarıcı
BHL	N-bütanoil-L-homoserin lakton
CLSI	(Clinical and Laboratory Standards Institute)
CnCPA	N-açıl siklopentilamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit-trifosfat
ECR	Elastin Kongo Red
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
IPTG	İzopropiltiogalaktosidaz
LBB	Luria Bertani Broth
LPS	Lipopolisakkarit
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
OD	Optik yoğunluk
OdDHL	N-(3-okzododekanoil)-L-homoserin lakton
OHHL	N-(3-okzohekzanoil)-L-homoserin lakton
PB	Piyosyanin Broth
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QS	Quorum Sensing
QSI	Quorum Sensing İnhibitörü
SAM	S-adenozil homosistein
TBE	Tris Borik Asit EDTA
UV	Ultraviyole ışığı
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid

1. GİRİŞ

Bakteriler yeryüzünde yaşamakta olan en eski canlı grubudur ve milyarlarca yıldan beri de yaşamlarını sürdürmektedirler. Tek hücreden oluşurlar ve kişisel özelliklerini kodlamak için oldukça az sayıda gene ve genetik bilgiye sahiptirler. Çok hücreli organizmalarda görülen hücreler arası sinyallerin alışverişi, karmaşık sinyal yollarının olması çok hücreli organizmaları tek hücreli organizmalardan ayıran önemli bir özellik iken bakterilerin de kendi aralarında iletişim kurabildiklerinin keşfi bu basit olduğu düşünülen organizmalara karşı genel görüşün değişmesine sebep olmuştur.

Bakteriler arasındaki bu iletişimin temeli, bakterilerin bulundukları ortama sinyal molekülü olarak adlandırılan bir takım maddeleri sentezlemeleri ve sentezlenen bu maddelerin yoğunluğu ile ortamdaki popülasyon yoğunluklarını algılayabilmeleri ve bunun neticesinde de sinyal moleküllerinin özel genlerin ekspresyonun da rol oynamasına dayanmaktadır (Lerat, 2004). Bakterilerde bu şekliyle yüzlerce kolektif davranış mevcuttur, fakat bunlar içerisinde en önemli olanı virülens faktörlerinin sentezidir (Henke ve Bassler, 2004).

Birçok mikroorganizma tarafından kullanılan bu sistem ‘Çevreyi Algılama’ (Quorum Sensing) olarak adlandırılmaktadır. Bunun yanı sıra ‘Yoğunluğu Algılama’, “Yeter Çoğunluğu Algılama”, gibi ifadeler de kullanılmaktadır. Bakteriler ortamdaki sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçerek aslında çevrelerindeki popülasyon yoğunluğu hakkında bilgi edinmiş olmakta ve buna bağlı olarak da popülasyon düzeyinde gen ekspresyonu kontrolü gerçekleştirilmektedir.

Bu sistemde üretilen sinyal molekülleri otouyarıcı (autoinducer, AI) olarak adlandırılmaktadır. Bakterilerdeki sinyal molekülleri Gram negatif bakterilerde *N*-açıl homoserin lakton (AHL) molekülleridir. Gram pozitif bakterilerde ise homoserin lakton molekülleri yerine hücreler arası iletişim küçük peptit molekülleri ile sağlanmaktadır (Bassler, 1999) .

Türler arası iletişimde ise otoindükleyici-2 (AI-2) denilen furanosil borat diester molekülleri salgılanır ve bu moleküller hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde iletişimde önemli bir yere sahiptir (Yu vd., 2012).

Çevreyi algılama sistemi ile ilgili ortaya atılan ilk görüşler 45-50 yıl öncesine dayanmaktadır. O dönemler yayınlanan iki makaleden birincisinde Gram pozitif *Streptococcus pneumoniae*'nin bazı kimyasal sinyaller kullanarak koordineli olarak hareket ettiği iddia edilmiştir. İkinci çalışmada ise deniz vibriosu olan Gram negatif *Vibrio fischeri*'nin aynı şekilde bazı sinyal molekülleri aracılığı ile koordineli davranarak biyoışığa gerçekleştirdiği tanımlanmıştır (Fuqua ve Greenberg, 2008).

Bundan sonra yapılan en detaylı ve çevreyi algılama sisteminin ayrıntılı olarak açıklandığı çalışma serbest yaşayan Gram negatif *V. fischeri* ve *Vibrio harveyi* bakterileri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Denizde biyoluminesans (ışık) bakterisi *V. fischeri* sıvı kültürlerde yetiştirilmiş, bu kültürlerde ışık oluşumunun yalnızca ortamdaki bakteri sayısının çok fazla olduğu yoğunluklarda meydana geldiği gözlemlenmiştir (Greenberg, 1997). Bu çalışma, bugün diğer çevreyi algılama sistemlerine örnek teşkil eden, *V. fischeri*'deki çevreyi algılama mekanizmasının esas modelini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu çalışmada otouyarıcı olan homoserin lakton türevi *N*-3-okzo-hekzanoil-L-homoserin lakton bulunmuştur. Bunun devamında 1983 yılında sinyal üretimi için gerekli enzim, sinyal reseptörü ve *lux* geni tek bir DNA fragmentinden izole edilmiştir. 1990'ların başında ise *lux* geninin, sinyal reseptörün ve açıl homoserin lakton moleküllerinin homologları keşfedilmiştir (Fuqua vd., 1994).

Bunu takip eden yıllarda, açıl homoserin lakton (AHL)'ye bağlı çevreyi algılama mekanizmalarının sadece *V. fischeri* ve *V. harvei* gibi deniz bakterileriyle sınırlı olmadığı proteobakterilerle sınırlı birçok bakteri türünde bu moleküllerin bilinen 50 den fazla örneğinin var olduğu ortaya konmuştur (Gray ve Garey, 2001).

1990 ların başlarında bir grup araştırmacı karbapenem antibiyotiklerini üretemeyen *Erwinia carotovora* mutantlarda eksik genlerin tespiti üzerine çalışmış, üzerinde çalıştıkları mutant gruplardan antibiyotik üretemezken, ikinci bir mutant grubuyla birlikte besi ortamına bu antibiyotiği üretebildiklerini görmüşlerdir. Araştırmalar

sonunda ikinci gruptaki mutantların birinci grupta antibiyotik sentezini tetikleyen bir “sinyal molekülü” sentezlediğini anlamışlardır. Çalışmada ilginç olan mutant bakteride görülen sinyal molekülünün *V. fischeri*’de ışık oluşumunu tetiklemek için kullanılan sinyal molekülü ile aynı olması olup bu çalışma çevreyi algılama sisteminin farklı bir yönünün ortaya çıkmasını sağlamıştır (Bainton vd., 1992).

Daha sonraki çalışmalarda fırsatçı bir insan patojeni olan *Pseudomonas aeruginosa*’nın da çevreyi algılama sistemini kullandığı ortaya çıkmıştır (Gambello ve Iglewski., 1991). *P. aeruginosa* da ortaya çıkarılan sistemin biyoışma değil virülens faktörlerinde sorumlu olduğu da anlaşılmıştır. Bu çalışmada ayrıca önemli bir virülans faktör olan “elastaz”ın üretiminin gerçekleştiği ve genin indüklenmesinde rol oynayan AHL’nin 3-okso-C12-HSL olduğu ortaya konmuştur.

Daha sonra bu konu üzerine artan çalışmalarla çok fazla sayıdaki çevreyi algılama sistemi, farklı organizmalarda birer birer tanımlanmaya başlanmıştır. Yine bu tarihlerde ramnolipid, hemolisin ve diğer bazı virülans faktörlerinin sentezini düzenleyen ikinci bir çevreyi algılama sisteminin varlığı ve bu sistemin C4-HSL üretiminden sorumlu olduğunu gösterilmiştir (Winson vd., 1995).

Bakteri kökenli enfeksiyonlarda enfeksiyona neden olan virülens faktörlerinin çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol ediliyor olması, çalışmaları bu sistemin inhibisyonu üzerine yoğunlaştırmıştır. Bu amaçla sistemi inhibisyonu üzerine çok fazla sayıda bitki ve sentetik molekül taranmaktadır. Bu çalışma kapsamında AHL molekülünün analogu olarak tasarlanan ve sentezlenen bazı moleküllerin fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*’da kontrolü çevreyi algılama sistemi tarafından gerçekleşen virülens faktörlerinin üretimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış ve ilk kez sentezlenip etkisi araştırılan bu moleküllerin çevreyi algılama sistemi inhibisyon çalışmalarına önemli katkılar sağlaması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Çevreyi Algılama (Quorum Sensing) Sistemi ve Bu Sistemi Kullanan Bakteri Türleri

Birçok Gram pozitif ve negatif bakteri ve mantarlar birbirleri ile farklı sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurmaktadır. Bu sinyal moleküllerini üretmekle birlikte, mikroorganizmalar bu moleküllerin konsantrasyonunu ölçerek çevrelerindeki mikrobiyal topluluğun miktarı hakkında da bilgi sahibi olmaktadır. Böylece iyi koordine olmuş bir davranış sergilemekte, konağın immün yanıtından kaçabilmek için virülans faktörlerini regüle etmekte ve başarılı bir enfeksiyon süreci geliştirmektedir.

Farklı bakteri türlerinde, çevreyi algılama ile düzenlenen bazı olaylar ışık yayma (biyoluminesense), biyofilm oluşumu, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon ve virülans faktörlerinin üretimi olarak sıralanabilir (Bandara, 2006). Üzerinde en çok araştırma yapılan çevreyi algılama sisteminin ilk görüldüğü bakteri türü olan *V. fischeri*, üzerinde çok fazla araştırma yapılmış olmasından dolayı mekanizması en iyi anlaşılan tür olup, model organizma olarak kullanılmaktadır. *P. aeruginosa* ise virülans faktörleri üretmesi ve insanda fırsatçı bir patojen olmasından dolayı üzerinde yine çok fazla araştırma yapılan bir organizma olup özellikle bu mekanizmanın bakterideki inhibisyonu tıpta hastalıkların tedavisinde büyük önem taşımaktadır.

Çevreyi algılama sistemi sinyal molekülleri Gram-negatif bakterilerde açıl homoserin lakton (AHL), Gram-pozitif bakterilerde küçük peptitler ve her iki grupta bulunabilen “autoinducer-2” (AI-2) olarak adlandırılan çeşitli gruplardan oluşmaktadır.

Sentezlenen bu moleküller hücrenin dışına salgılanarak burada birikirler ve pasif difüzyon, atım pompaları ya da özgün taşıyıcılar aracılığı ile zardan geçiş gösterirler. Yeterli miktarda sinyal biriktiğinde ilgili genlerin ekspresyonu uyarılmakta ve bazı ürünler ortaya çıkmaktadır (Hentzer ve Givskov, 2003., Lazazzera ve Grossman, 1998). Çevreyi algılama sistem moleküllerini hücrenel metabolitlerden ayıran temel

özelliklerin başında; özel koşullar altında salınmaları, hücre dışında birikmeleri ve özgün reseptörlerce tanınmaları, molekül miktarı belli bir eşiği aştığında planlanmış bir yanıtın ortaya çıkması olarak sıralanabilir. Bazı çevreyi algılama sistem molekülleri bir tür ya da suşa özgü iken bazı moleküller birden fazla bakteriden salınabilmekte ve bazen de aynı sinyal molekülü iki farklı bakteri tarafından kullanıldığı için birbirlerinin virulans faktörlerinin sentezine yardımcı olabilmektedirler.

Gram negatif bakterilerde açıl homoserin lakton sinyal molekülleri aracılığı ile gerçekleştirilen çevreyi algılama sistemi, bu sistemin ilk keşfedildiği *V. fischeri*' deki şekliyle tüm Gram negatif bakterilerde LuxI/LuxR Sistemi olarak adlandırılmaktadır. Sistemi kullanan birçok Gram negatif bakteri türünde LuxI/LuxR homologları bulunmakta olup ve sistem son ürünü ışıma olmayıp örneğin *P. aeruginosa* da olduğu gibi virülens faktörlerinin üretimi olabilmektedir (Bassler, 1999).

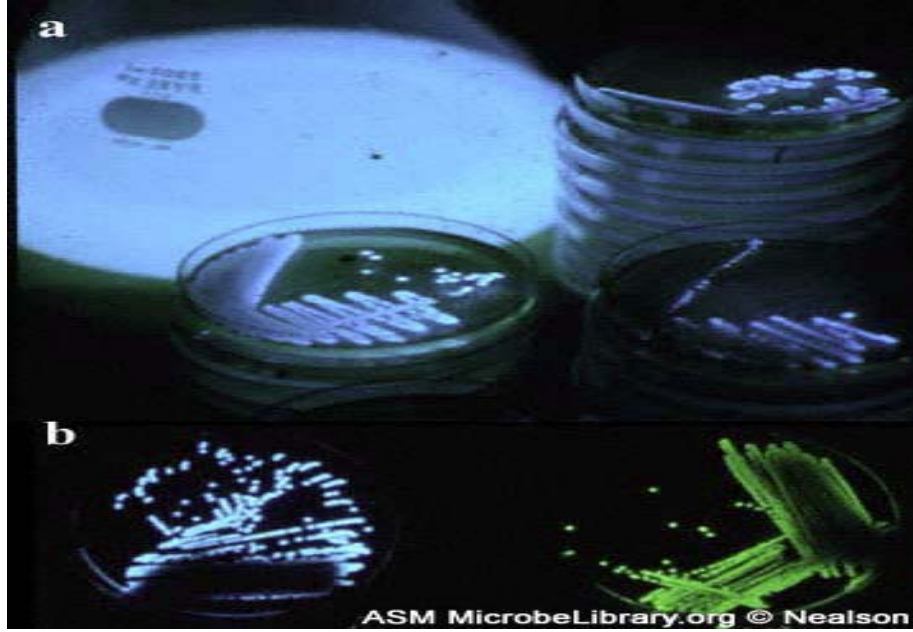
Gram pozitif bakteriler hücre-hücre iletişimlerinde Gram negatif bakterilerden farklı olarak oligopeptitleri kullanmakta ve sistem Oligopeptit Sistemi olarak isimlendirilebilmektedir.

Bakterilerde çevreyi algılama sistemi olarak görülen üçüncü tip sistem hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde görülüp, 'Hibrit Sistem' olarak adlandırılmaktadır (Bassler, 1999).

2.2. Gram Negatif Bakterilerde Görülen AHL Aracılı (LuxI/LuxR Tipi) Çevreyi Algılama Sistemi

AHL aracılı çevreyi algılama sistemi proteobakterlerin α , β γ alt sınıfına ait pek çok Gram negatif bakteride görülmektedir. *Agrobacterium*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Nitrosomonas*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Vibrio*, *Xenorhabdus* ve *Yersinia* bu sistemin görüldüğü bazı bakteri cinsleridir (Hentzer ve Givskov, 2003).

V. fischeri ve *V. harveyi* serbest yaşayan iki deniz mikroorganizması olup, çevreyi algılama sistemi üzerinde yapılan çalışmalarda ve bu sistemin karakterize edilmesinde kullanılan ilk bakteri örnekleridir (Şekil 2.1).

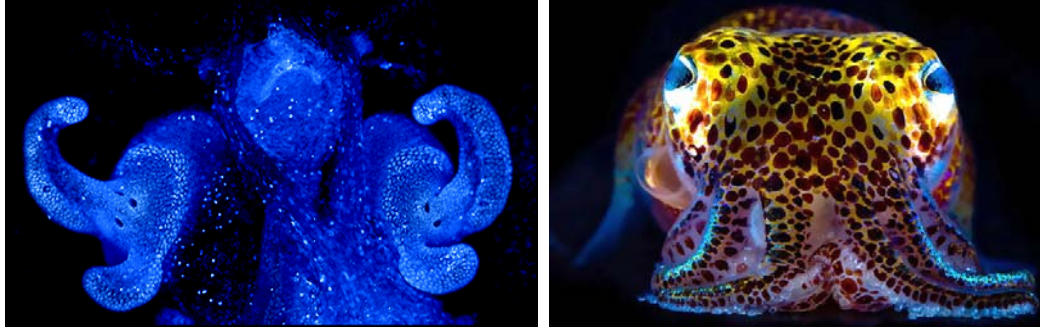


Şekil 2. 1. Kùltüre edilen *Vibrio fischeri* suşları (http 1)

Lux sisteminin ve organizasyonunun tanımlanmasının temeli 9 kb lık DNA parçasının *V. fischeri*'den *E. coli*'ye aktarılması ile başlamıştır. Sonuç ışımının *V. fischeri*'de görülen şekliyle gerçekleşmesi olmuş ve hem gen ekspresyon mekanizması hem de *V. fischeri*'de *lux* geninin polisistronik iletimin yapısı tam olarak karakterize edilmiştir.

Bazı ökaryotik canlılar bakterilerle simbiyotik bir yaşam gösterirler. Bunlardan bir tanesi mürekkep balığı *Euprymna scolopes* ile *V. fischeri* birlikteliğidir. Mürekkep balığı doğduktan kısa bir süre sonra çevredeki bakterileri toplar. Balığın ışık organına yerleşen bakteriler geceleri balık avlanırken ışımaya yapar ve balık ayışığı yansıması gibi görünerek predetörlerine karşı kendini korur (Şekil 2. 2). Bakterilerde ışık organındaki besinlerle beslenir. Sabah olduğunda mürekkep balığı vücudundaki bakterilerin % 95 ini atar ve kuma gömülerek dinlenmeye çekilir. Atılan bakteriler yavru mürekkep balıkları tarafından toplanır. Yetişkin mürekkep balığının vücudunda kalan bakteriler ise geceyarısına kadar tekrar çoğalırlar.

Normalde deniz suyunun mililitresinde 100'den daha az sayıda olan bu bakterinin serbest yaşarken ışıma (biyoluminesans) yapamamaları, ancak bazı deniz balıkları ve mürekkep balıklarının ışık organlarında yüksek konsantrasyonda oldukları zaman çevreye ışık yaymaya başlamaları dikkatleri çekmiştir.



Şekil 2. 2. Biyoışıma görülen mürekkep balığı (http 2)

Bu olayla ilgili ilk açıklamalar, kültür ortamının bir ışıma inhibitörü içerdiği ve bu inhibitörün bakteriler tarafından çok fazla sayıya ulaşarak ortamdan uzaklaştırıldığı şeklindeydi (Kempner ve Hanson, 1968). Ortamdaki bakteriler başlangıçta ilgili maddelere maruz bırakılarak yetiştirildiğinde, ışıma olayının düşük hücre yoğunluğunda bile indüklendiği için bu açıklama öne sürülmüştür. Fakat daha sonra ışıma olayının bir inhibitör maddenin ortamdan uzaklaştırılması yoluyla değil de bir aktivatör molekülün (=otoinducer) birikerek artması sonucu meydana geldiği görülmüştür (Nealson vd., 1970; Eberhard, 1972).

Çevreyi algılama sistemi kısaca ifade edilecek olunursa dört farklı komponentin sirkülasyonu ile gerçekleşir. AHL sinyal molekülü, LuxI tip sentaz, LuxR tip reseptör ve hedef gen (Hentzer ve Givskov, 2003).

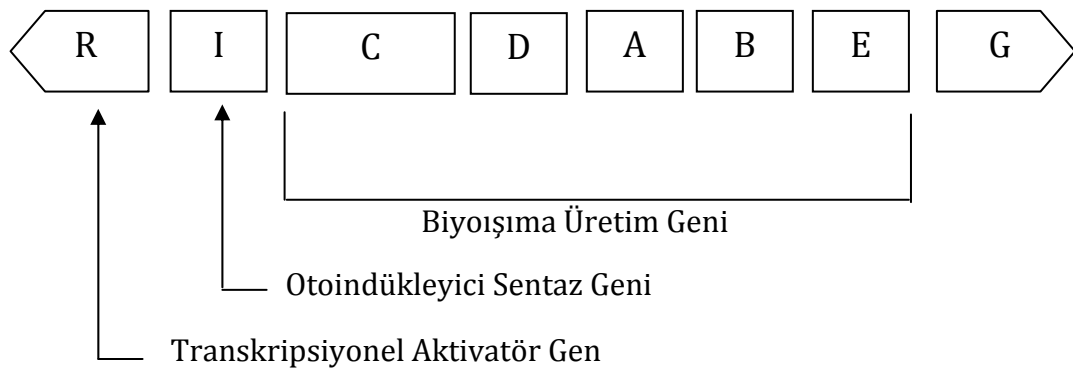
İlk kez *V. fischeri* de aydınlatılan sisteme göre *luxI* operonu, ışık üretimi için *luxI* genini takip eden beş gen (*luxCDABE*) ve bunlara ilave olarak fonksiyonu tam olarak bilinmeyen *luxG* genini içerir (Şekil 2.3).

Bu sistemde *luxC*, *luxD* ve *luxE* genleri, ışık üretiminden sorumlu lusiferaz enzimi için uzun zincir yağ asiti tetradekanoik asiti, yağ aldehit substrata dönüştüren asit

redüktaz enzimini kodlar. *luxA* ve *luxB* ise lusiferazın α , β alt ünitelerini kodlar. *luxI* geni ise çevreyi algılama sistemi sinyal molekülü 3-oxo-C6 HSL (OHHL)'nin üretiminden sorumlu olan enzimi (AI-otoindükleyici açıl homoserin lakton sentaz) kodlar. *luxR* geni ise, AHL transkripsiyonunu kontrol eden bir regülatörü kodlar (Fuqua ve Greenberg, 2002).

Düşük hücre yoğunluğunda *luxI* bazal seviyede transkrip edilir ve OHHL yavaş yavaş artmaya başlar ve yeterli konsantasyona ulaşıncaya kadar devam eder (Steven vd.,1994). Daha sonra AHL, LuxR proteini ile birleşir ve oluşan bu kompleks *luxICDABEG* operonunun transkripsiyonunu güçlü şekilde stimüle eden, *lux* kutusu olarak da bilinen *luxI* in upstream bölgesindeki *lux* promotoruna bağlanır (Stevens vd., 1994; Devin vd., 1989,). Bu durum biyoışmanın başlamasına sebep olur ve *luxI* geninin daha fazla ekspresyonu ve da fazla OHHL sentezine bağlı olarak ışımının arttığı pozitif bir geri beslemeyle sonuçlanır.

V. harveyi, *V. fischeri*' ve diğer gram negatif bakterilerden farklı olarak iki farklı otoindükleyiciye (AI-1ve AI-2) sahiptir. Bunlardan birisi N-açıl-HSL, diğeri ise 3-hidroksi- C4-HSL (HBHL)'dir (Lilley ve Bassler, 2000).



Şekil 2. 3. *V. fischeri* lux Operonu (Fuqua ve Greenberg, 2002)

2.2.1. LuxI/LuxR Tipi Çevreyi Algılama Sistemi Görülen Gram Negatif Bakteri Türleri

2.2.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*'te Çevreyi Algılama

Agrobacterium tumefaciens, toprakta doğal olarak yaşayan gram negatif bir bakteri olup, özellikle dikotiledonların büyük çoğunluğunda yaralanmış dokulardan organizmaya girerek taç tümörü oluşturan bir bitki patojenidir (Piper ve Farrand, 2000).

Hastalık bakterinin sahip olduğu onkogenik DNA' nın konağın çekirdeğine aktarılması ile gerçekleşir. *A. tumefaciens* virülansa sebep olan en önemli etken büyük bir plazmit olan ve Ti plazmit olarak adlandırılan plazmittir (Piper, vd.,1999). Onkogenik DNA Ti plazmitte yer alır ve bitkiye transfer edilerek bitki genomuna entegre olur. İşte bu Ti plazmitin konjugal transferi transkripsiyonel aktivatör protein TraR ve ona bağlı sinyal molekülü (*Agrobacterium* otoindükleyici) AAI; *N*-(3-oksoktanol)-L-homoserin lakton tarafından düzenlenir (Piper ve Farrand, 2000).

Ti plazmitin otoindüksiyon ile transferi oldukça karmaşık bir sistem olup bu transfer ikinci bir sistem tarafından da düzenlenmektedir. İkinci sistemde konjugal opin adı verilen küçük karbon molekülleri rol oynamakta ve bu moleküller traR geninin ekspresyonunu sağlamaktadır (Farrand, 1998). Bu sistemde öncelikle bakteri Ti plazmit ile bitkiyi enfekte etmekte, daha sonra bitki hücreleri opinleri üretmekte ve bu opinler hücrelerin etrafında difüze olmakta ve sinyal molekülleri opinlerin yoğunluğu arttığında cevap olarak hücrede eksprese olmaktadır. Daha sonra otoindükleyici bu moleküller TraR proteinine bağlanarak kompleks oluşturmakta ve bu kompleks de *traR* geninin ifade edilmesini sağlamaktadır.

2.2.1.3. *Chromobacterium violaceum*'da Çevreyi Algılama

C. violaceum Gram negatif, fakültatif anaerob ve saprofit bir bakteridir ve mor pigment bakterisi olarak tanımlanmaktadır. *C. violaceum* doğada yaygın olarak özellikle tropikal ve subtropikal alanlarda toprak ve su örneklerinde bulunur. İnsanlar için patojen değildir (Dur'an ve Rettori, 1998). Fakat hayvanlar ve insanlar için

bazen fırsatçı patojen olduğu görülmektedir. Özellikle deri lezyonları, kemik iliği iltihabı, karaciğer ve akciğer apseleri gibi hayati septisemilere neden olabilmektedir. *C. violaceum* 'un özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olduğu görülmüştür (Midani ve Rathore, 1998).

C. violaceum tarafından üretilen mor renkli pigment viyolasin pigmenti olup üretimi çevreyi algılama mekanizması kontrolü altında gerçekleşmektedir. (McClean vd., 1997).

C. violaceum üzerine yapılan çalışmalarda bakteri genomunda *cvlI* ve *cvlR* genleri tanımlanmıştır. *V. fischeri*'deki biyoışım kontrolündeki kimyasallarla fonksiyonel ve yapısal olarak aynı olan regülatör protein ve HHL sentaz *cvlI* ve *cvlR* genleri tarafından kodlanır. *C.violaceum*'un üremesi sabit faza yakın olduğunda, *cvlI* geni aktive olarak HHL birikimine sebep olur. Sinyal molekülü *cvlR* operatörünü bağlar ve ekspresyonu indükler. *CvlR* genin aktif olması, viyolasin biyosentez operonunun transkripsiyonel regülatör kısmına bağlanmasını sağlar. Pigment üretimi artar. Ayrıca *CvlR*, kitinaz ve ekzoproteaz gibi, *C. violaceum*'daki diğer bazı genlerin ekspresyonunu stimüle etme kabiliyetindedir (Chernin vd., 1998).

2.2.1.4. *Erwinia carotovora*'da Çevreyi Algılama

E. carotovora fırsatçı bir bitki patojeni olup bazı bitki türlerinde yumuşak kök hastalığına sebep olmaktadır. Birçok önemli bitkide özellikle de patates, havuç, salatalık, soğan gibi bitkilerde hastalık yaptığı için ekonomik anlamda önemlidir. Patojenitesi ürettiği faklı ekzoenzimlerin (pectate lisis, pektin lisis, celülaz, proteaz) bitki dokularına hasar vermesi ile gerçekleşmektedir. Hastalık etmeni olan ekzoenzimlerin üretilmesini kontrol eden genlerin regülasyonu ortamdaki popülasyon yoğunluğu ile kontrol edilmektedir. Çevreyi algılama sistemi LuxR/I homologu ExpI ve ExpR nin OHHL sentezinde sorumlu olması ile gerçekleşmektedir (Tınaz, 2003).

Tarımsal önemi dışında bazı *Ecc* suşlarının beta laktam atibiyotiklerinde karbapenem ürettiği görülmüştür. Yapılan birçok moleküler genetik analizi sonucu ilk beş genin, *carABCDE*, antibiyotik biyosentezi için gerekli olduğu bulunmuştur (McGowan,

1997). Diğer genler *carF* ve *carG* karbapenem direncini kodlarken, *carH* geninin fonksiyonu bilinmemektedir.

LuxR regülatörleri gibi CarR fonksiyonu için feromon sinyallere ihtiyaç duyar. Tanımlanan en iyi feromon *N*-(3- okzohekzanol)-L-homoserin lakton (OHHL) dur (McGowan vd., 1995). Bu molekül *V. fisheri*'de biyoışımada sorumlu olan otoindükleyici molekülün aynısıdır.

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*'da Çevreyi Algılama Sistemi ve Bu Sistem Tarafından Kontrol Edilen Virülens Faktörleri

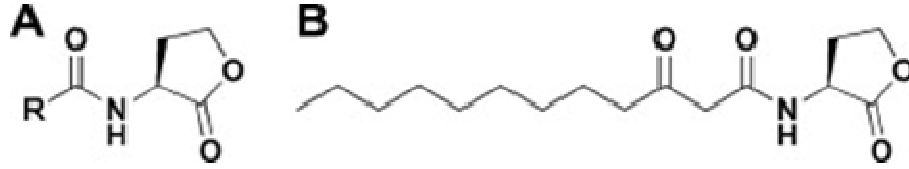
Pseudomonas cinsinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni *P. aeruginosa* olup, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'den sonra en sık karşılaşılan ve ciddi enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Özellikle ağır seyirli hastane enfeksiyonlarında, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, kistik fibroz hastalarında kronik enfeksiyonlar oluşturan fırsatçı bir patojendir. *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyon hastalıklarının meydana gelişinde önemli rolü olan virülens faktörlerinin salınımı çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşmektedir.

P. aeruginosa'da iki ana çevreyi algılama sistemi karakterize edilmiştir. Birbirleriyle hiyerarşik ilişkileri olan bu sistemler *las* ve *rhl* sistemleri olarak adlandırılmaktadırlar (Bratu vd; 2006).

2.3.1. *las* Sistemi

P. aeruginosa'da tanımlanan iki sistemden biri *las* sistemi olup transkripsiyonel regülatör protein LasR tarafından düzenlenir. Sistemin bileşenleri; oto-uyaran sentaz geni olan *lasI*, sentaz geninin ürünü *N*-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (3-okso- C12-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *lasR* genidir (Karatuna ve Yağcı, 2008, Gambello ve Iglewski, 1991). Las sisteminde LuxI homologu LasI *N*-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (OdDHL) sentezini gerçekleştirir.

LuxR homologu LasR ve (OdDHL) otoindükleyici moleküller tarafından aktive edilen *las* sistemi, stafilolitik proteaz (*lasA*), ekzotoksin A (*toxA*), alkalın proteaz (*apr*), elastaz (*lasB*), ve otoindükleyici sentaz (*lasI*) ekspresyonunu gerçekleştirir (Gambello, vd, 1993).



Şekil 2. 4. A: N-açıl homoserin laktonunun genel yapısı, B: N-(3-okso-dodekanoil)-L-homoserin lakton (OdDHL) (Praneenararat, vd., 2011).

2.3.2. *rhl* Sistemi

P.aeruginosa da ikinci bir çevreyi algılama sisteminin keşfi bu sistemin düşünüldenden çok daha karmaşık olduğunu göstermiştir. *rhl* çevreyi algılama sistemini ağırlıklı olarak N-butanoil-L-homoserin lakton (BHL) ve az miktarda N-hekzanoyil-L-homoserin lakton (HHL) sentezinden sorumlu RhIR ve RhII aktivatör proteinleri içerir. *rhl* sistemi kontrolünde ramnolipid, elastaz, piyosiyanın, siyanid ve lipaz üretimi düzenlenir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar *las* ve *rhl* sistemlerinin etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. Her iki sistem spesifik olup; sinyal molekülleri diğer sistemin düzenleyici proteinini uyarmaz. Fakat bunun yanında sistemler birbirinden tamamen bağımsız değildir. LasR/3-okso-C12-HSL kompleksi rhIR ifadesini uyardığı için *las* sistemi hiyerarşik olarak *rhl* sisteminin üzerinde yer alır (Pesci vd., 1997). Ayrıca 3-okso-C12-HSL RhIR'ye bağlanabilir ve C4-HSL'nin transkripsiyonel aktive edici proteinine bağlanmasını engelleyebilir (Pesci vd., 1997). Böylece *las* sistemi *rhl* sistemini hem transkripsiyonel seviyede, hem de translasyon sonrası aşamalarda kontrol ettiği bilinmektedir.

2.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*'da Virülens Faktörleri

Pseudomonaslar deri enfeksiyonlarından sepsise kadar farklı klinik tablolara sebep olabilen, yüksek morbidite ve mortalitesi ile önemli bir insan patojenidir. *Pseudomonaslar* öncelikli olarak hastane kaynaklı fırsatçı bir patojen olup, sağlıklı insanda nadiren hastalık oluşturur. Özellikle hastane ortamında, bağışık yanıtı ve savunma sistemleri bozulmuş insanlarda fırsat bulduğunda her sistem ve organda enfeksiyon oluşturabilme özelliğine sahiptir.

Pseudomonaslar en sık mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda ve kistik fibrozlu hastalarda, yanık sonrası gelişen yanık yarası enfeksiyonlarında notropenik hastalar ve HIV enfeksiyonunu da içeren bağışıklığı kırılmış hastalardaki bakteriyemilerde, diyabetik hastalarda, intravenöz ilaç kullananlarda ve daha birçok hastalıkta önemli rol oynar.

P. aeruginosa enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gelişir. Mikroorganizmanın konakta çoğalarak yukarıda sözü edilen basamakları gerçekleştirerek hastalık oluşturmaya patojenite olarak tanımlanır ve patojeniteden sorumlu yapılar virülens faktörleri olarak adlandırılır.

2.3.4.1. Kirpik (Flagella)

İnsanlarda hastalıklara neden olan *Pseudomonaslar*, enfeksiyonun erken safhalarında konak canlıya tutunma ve dokuda yayılmak için flagellalarını (kirpik) kullanırlar. *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantı olup sıvı ve katı besin ortamlarındaki yüzme, titreme ve kayma hareketlerini kirpik ile gerçekleştirir. (Kohler vd., 2000). Ayrıca şeker gibi ilgi duyduğu moleküllere kemotaksisini yine flagellası aracılığıyla sağlar. Patogeneizde önemli role sahip olan kirpik *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonunun gerçekleşmesinde etkindir ve oldukça immünojeniktir (Mahenthiralingam vd., 1994).

2.3.4.2. Adezinler

P. aeruginosa'nın konak hücrelerine yapışabilme özelliği, konağın hasar görmüş dokularında hastalık oluşturabilmeleri açısından çok önemlidir. *P. aeruginosa*'nın pilusları ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları (nonpilus adezinler) olmak üzere iki protein adezini vardır. Bu yapılar epitellere tutunmadan sorumlu olup ikisinin tutunduğu hücreler farklılık gösterir (Prince, 1992).

2.3.4.3. Lipopolisakkarit (LPS)

Pseudomonas tarafından üretilen diğer bir virülens faktörüdür. Hidrofobik lipit A, merkez oligosakkarit ve O polisakkaritten oluşur. *P. aeruginosa*'nın ürettiği lipid A endotoksik iken O polisakkarit immunodominanttır. *P. aeruginosa* lipopolisakkariti lipit A, organizmanın biyolojik etkisini düzenler, endotoksin oluşumunu sağlayarak sepsise neden olur. *Pseudomonas* lipopolisakkaritleri biyolojik olarak diğer gram negatif bakteri LPS den daha zayıftır (Tang, vd., 1996).

2.3.4.4. Ekzopolisakkarit (Alginat)

Alginat, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen kapsül benzeri ekzopolisakkarit bir maddedir. AlgR transkripsiyonel regülatörünün kontrolünde üretilen virülens faktörlerinden bir tanesidir. Alginat üretimi ile birlikte bakterinin etrafında vizköz bir jel oluşur. Alginat üreten bakterilerin oluşturduğu koloniler, alginat üretmeyen kolonilerden parlak (mukoid) görüntüleri ile kolaylıkla ayırt edilir (Cody vd, 2009).

Akciğerlerde bakteriyi saran alginat tabakası ve bakteri mikrokolonileri bir adezin görevi görmekte ve bakterinin fagositozla sindirilmesini önlemektedir. Bunun yanında alginatın, bakterinin enfeksiyon oluşturmadaki bir diğer rolü ise konağın savunma sisteminden kaçmasına yardım etmesi ve antibiyotiklere karşı da bakteriyi korumasıdır. Dolayısıyla alginatın virülans özellikleri saldırının yanında savunma olarak da görülmektedir (Shankar vd, 1995).

2.3.4.5. Endotoksin

Endotoksin *P. aeruginosa* için önemli bir hücre duvar antijenidir. Lipopolisakkarit yapıda olup, araşidonik asid metabolitlerinin üretimini stimule ederek ateş, şok, dissemine intravasküler koagülasyon ve metabolik değişikliklerle karakterize septik şok sendromuna neden olur

2.3.4.6. Ekzotoksin A

P. aeruginosa'nın en önemli virulans faktörüdür. Birçok *P. aeruginosa* suşu tarafından sentezlenir. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir (Wick, vd., 1990). Ekzotoksin A'nın lokal doku hasarında ve bakteriyel invazyonda rolü vardır.

2.3.4.7. Ekzoenzim S-T (ExoS)

P. aeruginosa'da tip-III sitotoksinler olarak bilinen ekstraselüler toksinler, ExoS, ExoT, ExoU ve ExoY olup, özellikle ExoS, ExoT benzer yapı gösterirler ve bakterilerin yayılmasını ve invazyonunu kolaylaştırıcı etkileri sahiptirler. Virülansı yüksek suşlarda güçlü nekrotik etkisi deneysel olarak gösterilmiştir (Barbieri ve Sun, 2005).

2.3.4.8. Enterotoksin

Normal gastrointestinal aktivitenin kesintiye uğramasına neden olarak diyareye yol açar.

2.3.4.9. Sitotoksin (lokosidin)

Lökosit fonksiyonlarını bozar, deney hayvanlarında pulmoner mikrovasküler hasar yaptığı gösterilmiştir. *Pseudomonaslar* lökositler ve diğer ökaryotik hücrelere karşı da sitotoksin üretirler (Scharmann, 1976). *ctx* geni tarafından kodlanan pro-sitotoksin

olgunlaşarak 18 kDa büyüklüğünde aktif toksine dönüşür. CTX toksini, konak hücrenin lipid tabakasında açıklık oluşumuna neden olur.

2.3.4.10. Hemolizinler

Hemolitik aktiviteleri ile bilinen hemolizinlerden biri fosfolipaz C olup ısıya duyarlı özelliktedir. Diğer hemolizin, ramnolipid ise ısıya dayanıklı hemolizin özelliğinde olup siliyer aktivitenin azalması ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının oluşmasından sorumludur. Bu iki madde sinerjik hareket ederek lipitleri ve lesitini hasara uğratar. Hemolizinler nekroz yaparak enfeksiyon etkeninin doku invazyonuna yardım eder (Berka, vd., 1985).

2.3.4.11. Elastaz ve Alkalen Proteaz

Elastin akciğerlerdeki proteinin yaklaşık % 30'unu oluşturan ve bu organa elastikiyet kazandırarak genişleyip daralmasını sağlayan bir proteindir. Klinik örneklerden izole edilen birçok *P. aeruginosa* izolatında elastaz ve alkali proteaz üretimi görülmüştür. *P. aeruginosa*'da LasA proteaz ve LasB elastazın uyumlu çalışması ile elastolitik aktivite görülür. Her iki enzim de çinko bağımlı metalloendopeptidazdır. Lokal doku hasarı ve bunun sonucunda enflamatuvar reaksiyona sebep olarak, enfeksiyonun yayılmasına yardımcı olurlar. Bu aktiviteye Ekzoenzim S'in protein sentez inhibisyonunun da katkısı vardır. Ayrıca her iki enzim deride, akciğerde ve kornea da nekroza sebep olur. LasB elastaz gerek tek başına gerekse *Pseudomonas* tarafından üretilen diğer proteazlar ile birlikte işlev göstererek biyolojik olarak önemli birçok substratı parçalar veya inaktive eder (Nicas vd., 1985). Nötrofil kemotaksisini engeller, bakterilerin yayılımını artırır. Kronik *Pseudomonas* enfeksiyonlarının çoğunda elastaza karşı antikor saptanmıştır.

2.3.4.12. Piyosiyenin

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyal kolonilere mavi-yeşil renk veren çözünebilir fenazin türevi bir pigment olan piyosiyanini üretme özelliğine sahiptir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyanin molekülü, önemli patojenite faktörlerinden birisidir. Solunum yolları siliyer aktivitesinin kesintiye

uğramasından ve akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarından sorumludur ve üretimi çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında gerçekleşir (Fuqua vd., 2001). Piyosyaninin hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır.

Ayrıca piyosyaninin birçok bakteri türüne karşı antibiyotik özelliği göstererek, *P. aeruginosa*'nın bulunduğu ortamda rekabet şansını arttırdığı bilinmektedir. Diğer bir hücre dışı pigment olan piyoverdinin virülansla ilgili herhangi bir rolü yoktur. Piyosyanin ve piyoverdin'in siderefor fonksiyonları da vardır. *P. aeruginosa* çoğalabilmek için demire gereksinim duyar ve transferrin, ferritin gibi vücut proteinleri ile demir için yarışır. Kısıtlı demir içeren ortamlarda, piyosyanin ve piyoverdin demir iyonları ile şelasyon yapar ve membran içindeki reseptör proteinlere bağlanarak demirin hücre içine alınmasını sağlar.

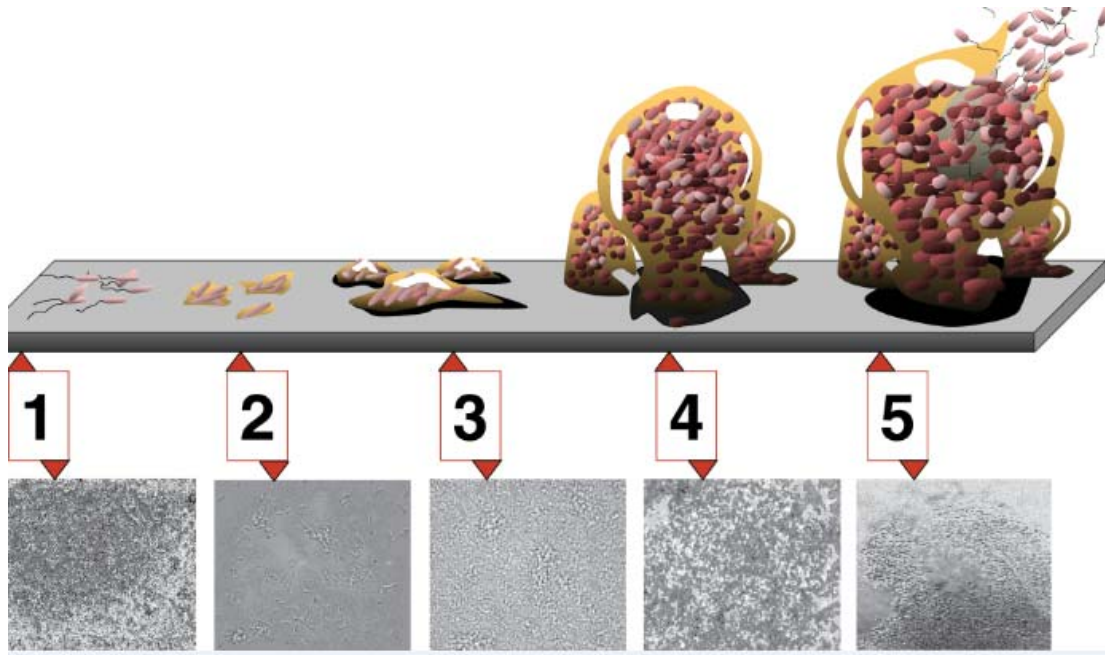
2.3.4.13. Biyofilm

Bakteriler büyüyüp çoğalırken iki ayrı yaşam formu gösterirler. Bunlardan birincisinde bakteri tektir ve planktonik hücreler olarak gelişir diğesinde ise mukoid agregatların içerisinde organize olarak gelişimini sürdürür. Mukoid yapı olarak görülen bu gelişme şekli “biyofilm” olarak adlandırılmaktadır. Bakterilerde görülen bu iki yaşam formu insanlarda görülen bakteriyel enfeksiyonlar için oldukça önemlidir. Planktonik bakterilerin sebep olduğu akut enfeksiyonlar antibiyotiklerle tedavi edilebilirken, biyofilm oluşturan bakteri enfeksiyonlarının tedavisi zor olup kronikleşmektedir (Bjarnsholt, vd., 2010).

Doğada özellikle sucul ortamlarda taşlar üzerinde ya da su borularının içinde görülen kaygan yapı, dişler üzerinde zamanla oluşan plaklar biyofilme birer örnek olup üzerinde çok fazla araştırmanın yapılması özellikle hastane enfeksiyonlarında yarattığı ciddi sorunlardan ve sebep olduğu ekonomik kayıplardandır.

Biyofilm oluşumu las sistemi kontrolünde gerçekleşir (De Kievit vd., 2001). Biyofilm oluşumu, katı veya sıvı bir yüzeye tutunma, mikrokolonizasyon, hücre dışı polisakkarit bileşenlerin üretilmesi, bakterilerin olgunlaşması ve yayılması

basamaklarını içerir (Şekil 2.5). Biyofilmin başlangıç formunda bakteriler van der Waals bağları ile yüzeye zayıf bir şekilde tutunur. Yüzeyden kayıp gitmedikleri sürece fibmria yada pililerini kullanarak yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye sıkıca tutunduktan sonra ekzopolisakkarit (EPS) üretmeye başlarlar ve bu matriks yüzeye daha sağlam tutunmalarını ve çevresel faktörlerden korunmalarını sağlar. Biyofilm tabakası yeterince büyüdüğünde ise biyofilm tabakasından kopmalar meydana gelir ve farklı ortamlara dağılarak yeni biyofilm tabakalarının oluşumu gerçekleşir (Olson, vd.,2002)



Şekil 2. 5. Biyofilm oluşum basamakları 1-Yüzeye tutunma, 2-Geri dönüşümsüz tutunma, 3-Olgunlaşma faz1, 4-Olgunlaşma faz2, 5-Ayrılma, kopma (Monroe, 2007)

2.4. Gram Pozitif Bakterilerde Çevreyi Algılama Sistemi

Gram pozitif bakterilerde çevreyi algılama sisteminde homoserin lakton sinyal moleküllerini ya da LuxI/LuxR sistemi görülmez. Bunu yerine sinyal molekülü, Otoindükleyici peptitler (= AIP) olarak adlandırılan molekülleri kullanırlar. 5-17 amino asitten oluşan bu moleküller bazen alışılmışın dışında yan zincir modifikasyonları göstermektedir.

AHL sinyalinin aksine, bakteri hücre membranı AIP için geçirgen değildir. Hücreden dış çevreye AIP sekresyonunun taşınması hücre yüzeyindeki oligopeptid taşıyıcılar

ile, aranmaları ise iki komponentli sensör transdüksiyon sistemleri ile olmaktadır (Karaboz ve Sukatar, 2004).

Gram pozitif bakterilerde görülen çevreyi algılama sisteminin regülasyonu farklı bakterilerde çeşitlilik gösterse de genellikle iki bileşenli algılama sistemini içerir. *S. aureus* da virülens faktör üretiminden sorumlu olan gen regülasyonu (Agr) siklik peptit sinyal sistemini örnek verecek olursak, AIP nin konsantrasyonu arttıkça küçük regülatör RNA sentezi aktive olur ve böylece virülens faktörlerinin üretimi aktive olur. İlginç olan farklı *S. aureus* türleri farklı siklik peptit sinyalleri üretirler ve bu peptitler diğer Agr sistemi üzerinde inhibitör etki gösterebilmektedir (Fuqua ve Greenberg, 2002).

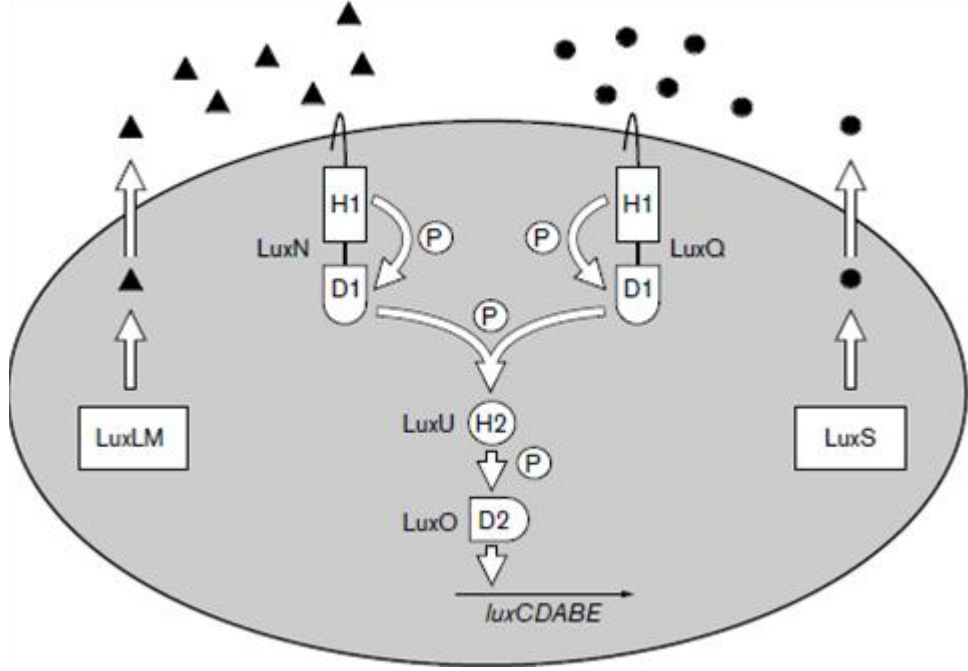
2.5. Hibrit Tipi (Autoinducer 2 tipi) Çevreyi Algılama Sistemi

Vibrio harveyi'de tanımlanan ve “hibrit sistem” adı verilen mekanizmada ise AI-1 adı verilen bir AHL sinyalinin yanı sıra furanosil borat ester yapı sındaki farklı sinyaller de üretilir. AI-2 adı verilen bu sinyallerin farklı türler (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella* ve *Salmonella* türleri) tarafından algılandığı (cross-talk) ortaya çıkmıştır. Yine *Pseudomonas* türlerinde üretilen “siklik peptitler” ve *Bradyrhizobium japonicum*'un ürettiği “Bradyoxetin” çevreyi algılama sistemlerindeki sinyal çeşitliliğini göstermektedir (Çepni ve Güler, 2011).

Serbest deniz vibrio su *V. harveyi* yoğunluğa bağlı lusiferaz operonunun (luxCDABE) ekspresyonunda iki otoindükleyici sistem kullanmaktadır. Diğer gram negatif bakteriler gibi *V. harveyi* de açıl-HSL sinyalleri üretmektedir. Ama bunun yanında HSL aracılı olmadığı bilinen bir sistem aracılığı ile de Gram pozitif bakterilerdeki iki bileşenli algılama sistemine benzer bir sistem görülmektedir.

V. harveyi otoindükleyici, AI-1 ve AI-2 sensör kinaz proteinleri tarafından tanınırlar (LuxN ve LuxQ) (Bassler, 1999). Membrana bağlı histidin kinazlar olan LuxN ve LuxQ proteinleri sinyali hücre içine çok basamaklı fosforilasyonlar aracılığıyla iletir (Milton vd., 2001).

İlginç olan *V. harveyi* çevreyi algılama sisteminde LuxI/LuxR homologunun bulunmamasıdır. *V. harveyi*'de HSL otoindükleyici AI-1 in üretimi *luxL* ve *luxM* genleri tarafından düzenlenirken, AI-2 nin sentezi *luxS* genine bağlıdır (Şekil 2.6). Bu genler *luxI* ailesi otoindükleyici sentezlerle hiç benzerlik göstermemektedirler (Bassler, 1999).



Şekil 2. 6. *V. harveyi* de görülen hibrit tip çevreyi algılama sistemi (Miller vd., 2002).

Çizelge 2. 1. Çevreyi algılama sistemi görülen bazı bakteriler ve sinyal molekülleri

Organizma	Fenotipler	Sinyal molekülleri	Regülatör proteinler
<i>Vibrio fischeri</i>	Biyoışırma	OHHL	LuxI/LuxR
<i>Vibrio harveyi</i>	Biyoışırma	HBHL	LuxM/LuxN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Virölans faktörleri (rhamnolipid, elastaz, hemolizin)	BHL+OdDHL	LasI/LasR RhII/RhIR
<i>Erwinia carotovora</i>	(5R)-Karbapenem-2-em 3-karboksilik asit antibiyotik	OHHL	CarI/CarR
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ti plasmit konjugasyonu	OOHL	TraI/TraR
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Ekzoenzimler, antibiyotik ve viyolesin pigment üretimi	N-hekzanoil-HSL (C6-HSL)	CviI/CviR

2.6. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibisyon Mekanizmaları

Patojen bakterilerin çoklu direnç özelliğı kazanmaları geleneksel antibiyotik tedavilerini de zamanla etkisiz hale getirmeye başlamıştır. Tüm bu sebeplerden dolayı dünya genelinde yapılan çalışmalar güçlenen bu mikroplara karşı savaşıabilecek yeni terapötik yaklaşımlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bakterilerle alternatif savaş seçeneklerinden son zamanlarda en çok üzerine düşülen, bakterilerin konakta hastalık oluşturmaya sebep olan virölens faktörlerinin üretilmesinden sorumlu olan çevreyi algılama sistemidir. (Hentzer ve Givskov, 2003). Çünkü bu sistem Gram negatif ve birçok Gram pozitif bakteride farklı sistemler şeklinde bile olsa virölens faktörlerinin üretiminden sorumludur (Hartman ve Wise, 1998). Son yıllarda bir çok

büyük biyoteknoloji firmaları özellikle çevreyi algılama sistemi inhibisyonu üzerine ilaç geliştirmek için spesifik çalışmalar yapmaktadırlar.

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak AHL sinyal molekülünün sentezinin önlenmesi, AHL sinyal molekülünün yıkılması veya AHL sinyal molekülünün alınmasının önlenmesi başlıkları altında yoğunlaşmaktadır.

2.6.1. AHL sinyal molekülünün sentezinin önlenmesi

AHL sinyal molekülü üreten bakterilerin büyük çoğunluğu *V. fischeri* 'deki luxI homoloğu bir ya da birden fazla gen içerir. Homoserin lakton molekülünün halka kısmı S-adenozil metiyonin tarafından sentezlenir ve ACP (açıl taşıyıcı protein-acyl carrier protein) AHL sinyal molekülünün açıl yan zincirine uygun olarak yönlendirilmesini sağlar. Sinyal molekülü üretimi hakkında bilinenler çevreyi algılama sisteminin inhibisyonunda sinyal üretimini hedef alan çalışmaları arttırmış ve özellikle S-adenozil metiyonin analogları bu amaçla araştırmalara kaynak olmuştur.

SAM in S-adenozil homosistein, sinefungin, S-adenozil sistein gibi çeşitli analogları *P. aeruginosa*'da RhlR proteini tarafından katalizlenen AHL molekülü üzerinde potansiyel inhibitör adayları oldukları gösterilmiştir (Hentzer ve Givskov, 2003; Parsek vd., 1999). SAM ile AHL sentezi özgül bir kimyasal reaksiyon olmasına karşın, SAM prokaryot ve ökaryot birçok organizmada biyokimyasal reaksiyonlarda aktif olarak rol oynamaktadır. Bu sebeple SAM'i substrat olarak kullanan ökaryotik enzimlerin etkilenmeden, SAM analoglarının çevreyi algılama sisteminde AHL sentezi inhibitör adayları olarak kullanılması umudunu arttırmıştır.

SAM analogları dışında son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki bazı makrolit antibiyotiklerin büyümeyi engelleyen en düşük dozda kullanılması *P. aeruginosa*'da AHL sentezini baskılamıştır (Tateda vd., 2001). Özellikle eritromisinin *P.aeruginosa* da hemagglütinin, proteaz, hemolizin ve AHL üretimini baskıladığı rapor edilmiştir. Makrolit antibiyotikler ribozomal seviyede protein

sentezini inhibe eden moleküller olarak bilinse de çevreyi algılama sistemi üzerine etkisinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği tam bilinmemektedir.

2.6.2. AHL sinyal molekülünün yıkılması

Bakteriler arasındaki iletişimin baskılanması ortamdaki aktif sinyal moleküllerinin azaltılması ile de gerçekleştirilebilmektedir. Bu yönde yapılan araştırmalarda bazı bakteri türlerinin AHL sinyallerini indirgedikleri rapor edilmiştir. Dong vd., yaptıkları bir çalışmada bir *Bacillus* türünün AiiA adı verilen bir enzim aracılığı ile AHL sinyallerinin hidrolizini katalizlediğini göstermişlerdir. *aiiA* geninin ekspresyonunun bir bitki patojeni olan *E. carotovora* da AHL sinyallerini azalttığı ve test edilen tüm bitkilerde yumuşak çürüklük hastalığını semptomlarını hafiflettiği görülmüştür (Hentzer ve Givskov, 2003; Dong vd., 2000). Dahası AiiA ekspresyonu gerçekleştiren transgenik bitkiler *E. carotovora*'nın sebep olduğu enfeksiyonlara daha az hassas oldukları gösterilmiştir.

(Dong vd., 2001), bunun yanı sıra *P. aeruginosa* PAI-A, *Arthrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *A. tumefaciens* ve *Rhodococcus* sp.'de de AiiA homoloğu enzim üretimi gösterilmiştir (Uroz vd., 2003, Huang vd.2003). İnsan solunum yolu epitel hücrelerinde de benzer bir enzimatik aktivite ile AHL moleküllerinin parçalandığı gösterilmiştir. 3-okso-C12-HSL'yi etkileyen bu aktiviteden C4-HSL etkilenmemektedir (Chun vd., 2002). Ayrıca bazı *Bacillus* türleri üretmiş oldukları bir enzim aracılığı ile AHL molekülünü parçalayarak etkisiz hale getirirlerken, bir toprak bakterisi olan *Variovorax paradoxus* AHL'u tek enerji ve azot kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu bakterilerin klinik önemi bilinmemekle birlikte, AHL yıkan enzimlerin klinik önem taşıyabilecekleri açıktır.

Doğada bazı bitki ve mantarlar, birlikte simbiyotik olarak yaşadıkları bakteri popülasyonunun miktarını, bakterilerin üretmiş oldukları AHL sinyal iletişimini bozarak kontrol altında tutmaktadır. *Delisea pulchra* adı verilen bir kırmızı bir deniz yosunu 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-aracılığı ile gelişen virülans 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. Bu molekülün insan patojeni *P. aeruginosa* ve *Serratia liquefaciens* QS moleküllerini de inhibe ettiği gösterilmiştir (Manefield vd., 1999).

2.6.3. AHL sinyal molekülünün alınmasının önlenmesi

Çevreyi algılama sistemini baskılayabilmek için yoğunlaşılacak bir diğer yaklaşım, sinyalin bakteri tarafından algılanmasını engellemeye çalışmak olmuştur. AHL sinyal molekülünün alınmasının engellenmesi, doğal AHL sinyal molekülü ile reseptör proteine bağlanmak için rekabete girme yeteneğine sahip antagonist moleküller ile başarılabilmektedir.

AHL ile rekabete giren moleküller yapısal olarak AHL'ye benzemekte ve AHL bağlanma bölgesi gibi iş görerek reseptörün aktive olmasını engellemektedir. AHL analogu inhibitörlerin sentezi üzerine yoğunlaşan çalışmaların çoğu farklı yollarla açıl yan zincirin modifikasyonu ile gerçekleşmektedir. Açıl yan zincir farklı yollarla modifiye edilebilir ve yapılan çalışmalar yan zincirin uzunluğunun aktivitenin gerçekleşmesinde önemli rol oynadığını göstermiştir.

E. carotovora da çevreyi algılama sistemi üzerine yapılan bir çalışmada açıl yan zincirin uzunluğun bir metil artırılması ile aktivitenin % 50 azaldığı, 2 metil uzatılması ile ise % 90 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Açıl yan zincirinden bir metilin azaltılması durumunda ise aktivitenin sadece % 10 azaldığı görülmüştür.

İlginç olan şudur ki doğal AHL molekülünden daha uzun zincire sahip olan analoglar kısa zincirlilere oranla daha fazla inhibitör etki göstermektedirler.

AHL molekülünün reseptörü sitoplazmik veya membranın sitoplazmik yüzünde yerleşik olan LuxR proteini, AIP sinyalinin reseptörü ise membrana bağlı histidin kinazlardır. AI-2 molekülü ise ya AHL benzeri şekilde LuxR homologu LuxP ile etkileşir veya Lsr transporter molekülü ile hücre içine girerek etki gösterir. Bu

noktadan hareketle, *D. pulchra*'nın ürettiği bileşiklerden birisinin LuxR proteinine bağlanarak AHL' nin ayrılmasına neden olduğu ve böylece *S. liquefaciens*'in buğu tarzı üremesini bozduğu saptanmıştır (Raffa vd., 2005; Hentzer ve Givskov 2003). Daha ilginç bir mekanizma ise, bazı bitkilerin ürettikleri AHL analogu bileşikler ile *Bacillus cereus* tarafından antibiyotik sentezini tetikleyerek kendileri için zararlı olan *Pythium torulosum*'un üremesini önlemeleridir (Raffa vd., 2005). Yapılan bir diğer çalışmada in vitro sentezlenen N-oktanoyil siklopeptilamid (C8-CPA) molekülünün *P. aeruginosa* PA01 suşunda lasB-lasZ ekspresyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Ishida vd., 2007). Yine aynı çalışmada denenen diğer analog N- dekanoyil ciklopeptilamitin (CP10-CPA) *P. aeruginosa*'da las ve rhl tarafından düzenlenen virölans faktörlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Ishida vd., 2007). Ayrıca bu molekülün *D. pulchra*'dan elde edilen halojenlenmiş furanonlardan daha etkili olduğu da gözlemlenmiştir.

Rasmussen vd., (2005) rastgele çok sayıda molekülü tarayarak QSI etkili moleküller tanımlamış, bunların içinde en etkili bulunan 4-nitro-piridin-N-oksit'in (4-NPO), *P. aeruginosa*' da çevreyi algılama sistemi ile düzenlenen genlerin ifadesinde % 37'lik bir azalma sağladığını göstermişlerdir. Aynı etkiyi gösterecek doğal bileşiklerin saptanması amacıyla bitkiler ve mantarlar tarandığında, araştırılan 50 *Penicillium* türünün % 66'sında çevreyi algılama inhibisyon etkisi gösteren ikincil metabolitler olduğu belirlenmiştir. Bunlardan penisilik asit *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi ile düzenlenen genlerin ifadesinde % 60'lık, patulinin ise % 45'lik bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca birçok bitkide (renkli burçak, havuç, soya fasulyesi, nilüfer çiçeği, domates, bezelye, kırmızı biber ve sarımsak gibi) sistemi inhibe etme özelliği olduğu tespit edilmiştir (Rasmussen vd., 2005). Yapılan kısıtlı sayıdaki in vivo çalışmalarda fare akciğer enfeksiyonu modelinde furanon 30 , sarımsak özütü, patulin gibi bazı çevreyi algılama sistem inhibitörler molekülleri denenmiş ve moleküllerin akciğerlerdeki bakterilerin temizlenmesine, mortalitenin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Hentzer vd., 2003; Bjarnsholt vd., 2005; Rasmussen vd.,2005).

2.7. Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Bakterilerin birbirleri ile iletişime girdikleri ilk olarak Fuqua ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiş ve sonrasında birçok araştırmacının dikkatini çekerek günümüze kadar çok fazla çalışmaya konu olmuştur.

Özellikle çalışmalar, patojen mikroorganizmalardaki kontrolü çevreyi algılama sistemine bağlı olarak gerçekleşen virülens faktörlerinin üretilmesinin engellenmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Önceleri *V. fischeri*'de keşfedilen ve tamamen aydınlatılan sistem daha sonra tüm bakterilerde aynı sistemin varlığının araştırılması yönünde yoğunlaşmıştır. Diğer bakterilerde sistemin anlaşılması sonrasında ise çalışmalar patojen mikroorganizmalarda bu sistemin inhibisyonu üzerine yoğunlaşmıştır.

P. aeruginosa'nın virülansında çevreyi algılama sistem mekanizmasının rolünü, AHL moleküllerinin konak üzerindeki etkilerini ve bu moleküllerin *P. aeruginosa*'da patojeniteyi nasıl tetiklediğini araştırılmış ve *P. aeruginosa*'da virülansı etkileyen birçok faktörün düzenlenmesinde rol aldığı, AHL moleküllerinin hem patojenite faktörü hem de hücre-hücre iletişimde sinyal molekülü olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Smith ve Iglewski,2003).

Tateda vd., (2001), *P. aeruginosa* izolatlarında makrolitlerin etkilerini araştırmış ve özellikle azitromisinin elastaz gen ekspresyonunu önleyerek özellikle akciğer enfeksiyonlarında enfeksiyonun şiddetini azaltmaya yardımcı olduğunu göstermişlerdir.

Shih ve Huang (2002), biyofilm oluşturma özelliğine sahip mutant PA01 suşu ile çevreyi algılama sistemi baskılanmış PDO 100 suşuna kanamisinin etkisini araştırmış ve sonuçta yüksek kanamisin konsantrasyonda (100mL) PA01 mutant suşunun oluşturduğu biyofilmin çok az etkilendiği PDO 100 suşunun oluşturduğu biyofilmin ise bu antibiyotiğe hassasiyet gösterdiğini bulmuşlardır.

Frezza vd (2008), açıl zincire sülfonilür türevi moleküller eklenerek elde edilmiş sentetik homoserin lakton moleküllerinin *V. fischeri*'de Lux tipi çevreyi algılama sistemi üzerine etkilerini araştırmışlar ve sentezledikleri 9 molekülün sistem üzerine antagonist etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Wang vd. (2008), yaptıkları çalışmada sentetik N-açıl homoserin lakton analoglarının *V. fischeri*'de görülen Lux tipi çevreyi algılama sistemi, *P. aeruginosa*'da görülen Las/Rhl tipi çevreyi algılama sistemleri, üçüncü olarak da *Serratia marcescens*'de görülen Spn tipi çevreyi algılama sistemi üzerine inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla farklı uzunluktaki N-açıl siklopentilamin (Cn-CPA, C4-C11) moleküllerini kullanmışlardır. Sonuçta etkisi araştırılan moleküllerin altı tanesi güçlü inhibitör etki göstermiş özellikle C6, C7 ve C8-CPA moleküllerinin biyoisimayı %90 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Cn-CPA moleküllerinin daha önce farklı araştırma grupları tarafından çalışılmış olup, bu çalışmada üç farklı bakteri grubundaki çevreyi algılama sistemi üzerine inhibisyon etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olması açısından farklılık göstermektedir.

Ishida vd (2007), 'N-açıl siklopentilamin türevleri tarafından *P. aeruginosa* da çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu' başlıklı makalelerinde, N-oktanol siklopentilamin (C8-CPA) ve N-dekanol siklopentilaminin (C10-CPA), *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi kontrolünde üretilen bazı virülens faktörleri üzerindeki inhibisyon etkisini araştırmışlardır.

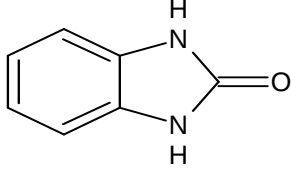
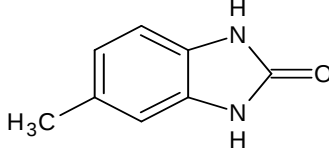
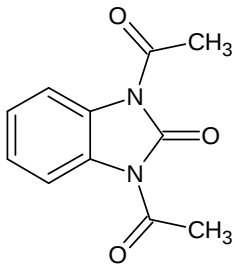
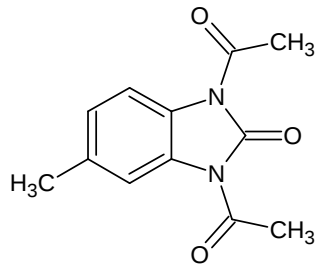
Daha önce yaptıkları çalışmalarda sentetik olarak üretilen açıl homoserin lakton analoglarının uzunlukları ve halka yapılarının agonist ve antagonist etki göstermede kritik rol oynadığını göstermişler ve bu çalışmalarında uzunluğu C4-C12 aralığında değişen bir seri molekül kullanmışlardır. Sonuçta C8-CPA türevinin LasB elastazı kodlayan *lasB* geni üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu, ayrıca C10-CPA türevinin bazı virülens faktörleri üzerinde, -elastaz, piyosiyenin, ramnolipit ve biyofilm formasyonu- güçlü inhibitör etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada C10-CPA otoindükleyici analogunun gösterdiği güçlü inhibitör etkisinin hangi sistem üzerine olduğunu araştırmışlar ve sonuçta hem las hem de rhl sistemlerinin her ikisi üzerine de etki ederek sinyal molekülleri ile rekabete girip, LasR/RhR proteinleri arasındaki etkileşimi engellediğini göstermişlerdir.

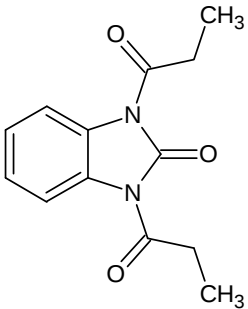
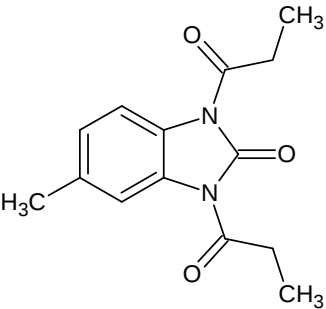
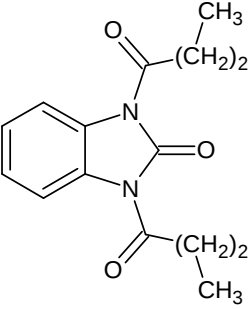
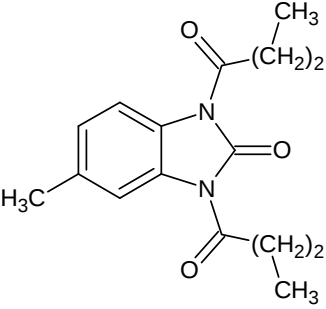
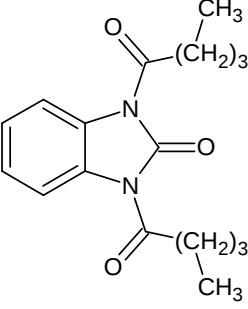
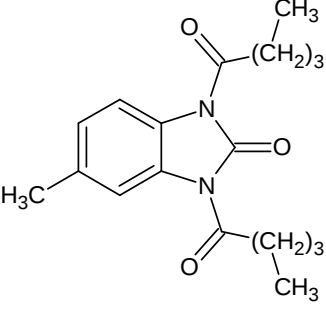
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

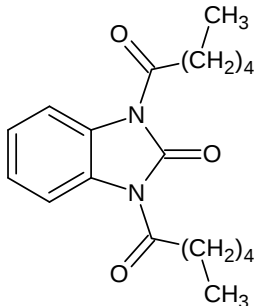
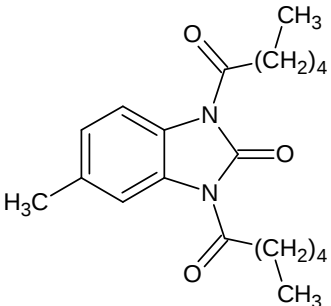
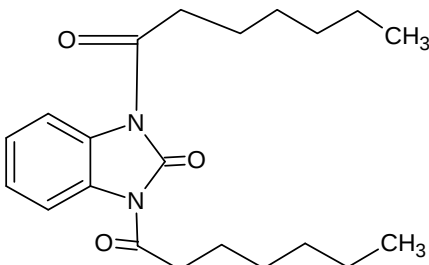
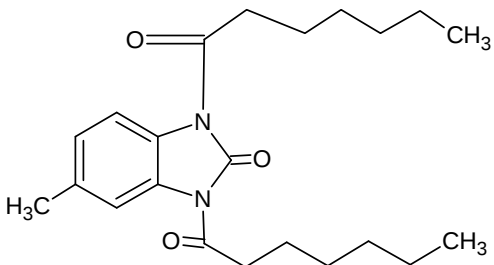
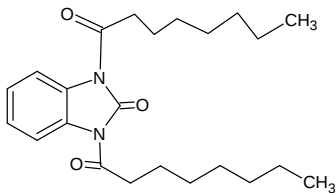
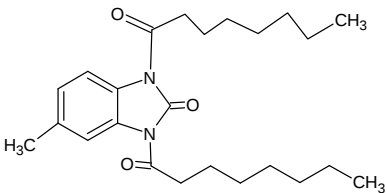
3.1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Tasarlanan Moleküllerin Sentezi

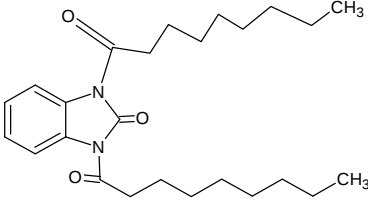
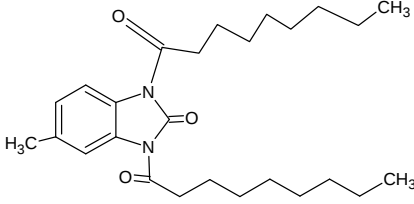
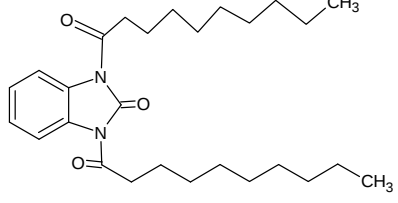
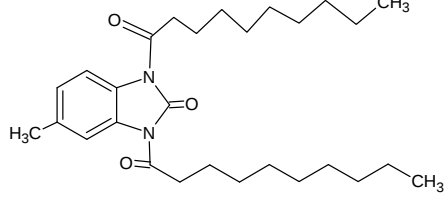
Tez çalışmasında kullanılmak üzere çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak 20 adet molekül Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Anabilimdalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ningur Noyanalpan tarafından tasarlanmaya başlanmış, Prof. Dr. Ningur Noyanalpan'ın emekli olması nedeni ile tasarlama ve sentez çalışmalarına Yrd. Doç. Dr. Yasemin Dünder ile devam edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm çözücüler teknik ve analitik niteliktedir. Bileşiklerin sentezinde ve yapılan analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve solvanlar, Sigma-Aldrich ve Merck firmasının ürünleridir. Mikrodalga ile yapılan tepkimeler, MicroSYNTH mikrodalga sentez reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere 20 farklı molekül sentezlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1.Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Tasarlanan Moleküller

U65 MA: 134.13 g/mol  1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on	U77 MA:148.16 g/mol  5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on
U92 MA: 218.20 g/mol  1,3-diasetil-1,3-dihidro-2H benzimidazol-2-on	U132 MA: 232.23 g/mol  1,3-diasetil-5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on

U127 MA: 246.26 g/mol  1,3-dipropionyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one	U133 MA: 260.28 g/mol  5-metil-1,3-dipropionyl-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on
U128 MA: 274.31 g/mol  1,3-dibutanoyl-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on	U134 MA: 288.34 g/mol  1,3-dibutanoyl-5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on
U129 MA: 302.36 g/mol  1,3-dipentanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on	U135 MA: 316.39 g/mol  5-metil-1,3-dipentanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on

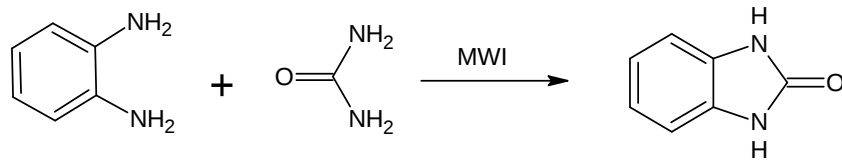
U130 MA: 330.42 g/mol  1,3-diheptanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on	U136 MA: 344.44 g/mol  1,3-diheptanoil-5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one
U67 MA: 358.47 g/mol  1,3-diheptanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one	U86 MA: 372.50 g/mol  1,3-diheptanoil-5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one
U69 MA: 386.52 g/mol  1,3-dioktanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one	U85 MA: 400.55 g/mol  5-metil-1,3-dioktanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one

U68 MA: 414.58 g/mol  1,3-dinonanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one	U84 MA: 428.60 g/mol  5-metil-1,3-dinonanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one
U66 MA: 442.63 g/mol  1,3-didekanoil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one	U83 MA: 456.66 g/mol  1,3-didekanoil-5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-one

3.1.2. Sentez Yöntemleri

1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U65)

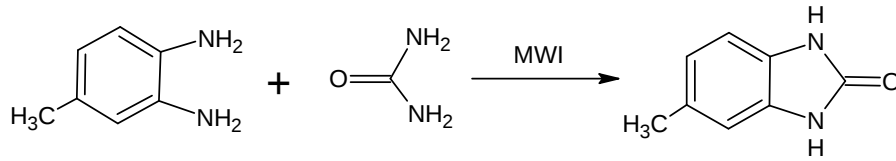
1.08g (0.01 mol) o-fenilendiamin ile 0.9g (0.015) mol üre karıştırılmış ve 140 °C’de mikrodalga ışını kullanılarak 6 dakika ısıtılmıştır. Süre sonunda tepkime ortamı soğutularak suya boşaltılmıştır. Ham ürün süzülüp, %10’luk NaOH ile çözöldükten sonra süzölmüş ve süzöntü der. HCl asit ile asitlendirilmiştir. Oluşan çökelek süzölmüş, su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Verim 1.14g (% 85). Erime derecesi 315 °C [(Kym, 1907) 305 °C, (Kidwai vd., 2005) 304–305 °C].



Şekil 3. 1. 1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U65)

5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U77)

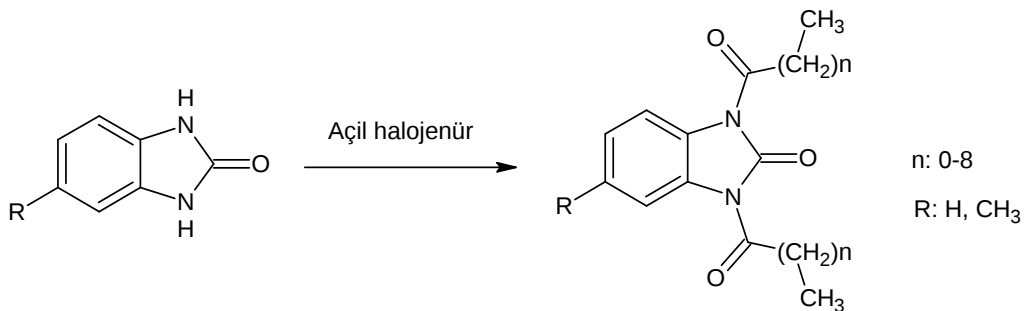
1.22g (0.01 mol) 4-metil-o-fenilendiamin ile 0.9g (0.015) mol üre karıştırılmış ve 140 °C’de mikrodalga ışını kullanılarak 6 dakika ısıtılmıştır. Süre sonunda tepkime ortamı soğutularak suya boşaltılmıştır. Ham ürün süzülüp, %10’luk NaOH ile çözüldükten sonra süzölmüş ve süzöntü der. HCl asit ile asitlendirilmiştir. Oluşan çökelek süzölmüş, su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Verim 0.74g (% 50). Erime derecesi 298 °C ((Efros, vd., 1953) 292 °C).



Şekil 3. 2. 5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U77)

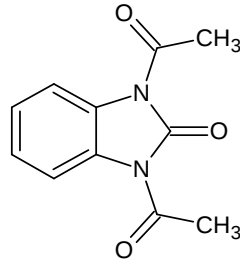
Açıl türevleri için genel sentez yöntemi

0.01 mol 1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U65) veya 5-metil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U77), 40 mL tetrahidrofuran içinde çözülmüştür. Üzerine 0.022 mol trietilamin ve 0.02 mol uygun açıl halojenür ilave edilip ve karıştırılmıştır. 70 °C’de mikrodalga ışını kullanılarak 20 dakika ısıtılmış, süre sonunda tepkime ortamı soğutularak buzlu suya boşaltılmıştır. Ham ürün süzölmüş, su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Etanolden kristallendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 3. Açıl türevlerinin genel formülü

1,3-Diasetil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (Bileşik 3, U92)



MA: 218. 20 g/mol

Şekil 3. 4. 1,3-Diasetil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-on (U92)

Etanolden kristallendirilmiştir. Verimi 1.41g (%64)'dır. Erime derecesi 151 °C'dir. (Lit e.d. 149-151 °C). IR spektrumunda, 1764, 1750, 1714 (C=O gerilim) cm⁻¹'de bantlar gözlenmiştir. ¹H-NMR spektrumunda, (CDCl₃); δ 8.23 (2H, dd, benzimidazol H4, H7), 7.27 (2H, dd, benzimidazol H5, H6), 2.77 (6H, s, CH₃) ppm de pikler gözlenmiştir.

Analitik Kontroller

Erime Derecesi Tayini

Bileşiklerin erime dereceleri “SMP-II Digital Melting Point Apparatus” erime derecesi tayin cihazında saptanmıştır.

Spektrometrik Kontroller

IR Spektrumları

Spektrumlar, Perkin-Elmer Spectrum 400 FT-IR spektrometresinde kaydedildi ve dalga sayısı (cm⁻¹) cinsinden değerlendirilmiştir.

H-NMR Spektrumları

Spektrumlar bileşiklerin CDCl₃ içindeki çözeltisinde, Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digital FT-NMR spektrometresinde alınıp δ skalasında değerlendirilmiştir. Bu analizler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında yaptırılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları

Çalışma sırasında U65, U77, U92 moleküllerinin çevreyi algılama sistemi inhibitör özelliklerinin test edilmesi basamağında QSI1 mutant suş kullanılmıştır. Viyolasin pigment üretimi testinde ise *C.violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07 suşları kullanılmıştır.

Çevreyi algılama sistemi kontrolünde üretimi gerçekleşen virülens faktörleri üzerine, U65, U77, U92 moleküllerinin inhibitör etkilerinin araştırıldığı testlerde ise; *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* M2, *P. aeruginosa* M3, *P. aeruginosa* M5, *P. aeruginosa* M6, *P. aeruginosa* M7, *P. aeruginosa* M8, *P. aeruginosa* M9 klinik izolatları ile pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PA01 suşu ve negatif kontrol olarak da PAO-JP2 suşu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü bakteri stoğundan temin edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3. 2. Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan bakteri suşları ve özellikleri

Suş Adı	Özellik/izole edilen yer	Kaynak
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PT5 orijinal tip	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
PAO-JP2	Mutant <i>P. aeruginosa</i> suşu	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
QSI1	Rekombinant tip (Quorum Sensing Inhibitör Seçicisi)	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Viyolasin pigmenti üretimi açısından mutant CV026	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Viyolasin pigmenti üretimi açısından mutant VIR07	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M1	Klinik izolat-Kan kültürü	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M2	Klinik izolat-Kan kültürü	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M3	Klinik izolat-Balgam	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M4	Klinik izolat-İdrar kültürü	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M5	Klinik izolat-Kan kültürü	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M6	Klinik izolat-İdrar kültürü	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M7	Klinik izolat-İdrar kültürü	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M8	Klinik izolat-Balgam	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> M9	Klinik izolat-Balgam	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu

3.3. U65, U77, U92 Moleküllerinin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özelliklerinin Test Edilmesi

3.3.1. QSIS1 (Quorum Sensing Selector Strain 1) Testi

Çevreyi algılama sistemi üzerine inhibitör adayları olarak sentezlenen moleküllerin çevreyi algılama sistemi üzerine inhibitör etkisi QSIS1 indikatör suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu bakterinin özelliği, sinyal molekülü varlığında yaşamayıp, çevreyi algılama sistemi inhibitörleri (QSIs) varlığında yaşayabilmesidir. QSIS1 suşu *V. fischeri* de bulunan Lux R çevreyi algılama sisteminin *E. coli* lac⁺ suşuna klonlanması ile oluşturulmuştur (Bjarnsholt, vd., 2010). İfade edildiğinde hücre ölümüne sebep olan fosfolipaz A proteinini kodlayan gen (*phlA*), LuxI promotorunun kontrolü altında hücreye eklenmiştir. Eğer ortamda toksik olmayan çevreyi algılama inhibitörü mevcut ise *phl* ifade edilmez ve hücre gelişimine devam eder. (Bjarnsholt vd., 2010).

QSIS1 suşu *phl* geninin ifadesine sebep olan sinyal molekülü, ampicilin, X-gal içeren katı besiyerinde açılan kuyucuklara çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları eklenir ve kuyucuklar etrafında görülen mavi halka yüklenen adayların inhibitör etkilerinin pozitifliğini gösterir. Besi ortamında oluşan mavi halka ortamda bulunan sinyal molekülünün çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları ile baskılandığını bunun sonucu olarak bakterilerin gelişimine devam ettiğini ve bakterilerin ürettiği beta galaktozidaz enzimi ile X-Gal (5-bromo 4 kloro-3indol) molekülünün hidrolize edildiğini ifade eder.

QSIS1 suşu BT sıvı besiyerinde (0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01 mM FeCl₃, %10 10XA, % 0,025 tiamin, % 0,5 glikoz, %0,5 kazoaminoasit) 30 de 1 gece üretilmiş ertesi gün, BT-agar besiyeri (0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01 mM FeCl₃ ve %2 bacto agar) otoklavlandıktan sonra 43°C de, X-gal (40 mg/ml), IPTG (izopropiltiogalaktosidaz) (100 mM), 10XA (100 mg/ml), tiamin (25 µg/ml), ampicilin (100 mg/ml), % 0,5 glikoz, % 0,5 kozaminoasit, 3-oxo-C6 HSL (100 nM) ve 800 µl bakteri kültürü eklenerek; petri kutularına dökülmüştür (Çizelge 3.3). Besiyeri katılaştıktan sonra besiyeri üzerinde kuyucuk açılmış ve test edilen moleküller (U65, U77, U92) dimetil sülfoksit ile (DMSO) çözündürüldükten sonra

açılmış olan kuyucuklara 50 µl yüklenmiştir. Sonuçları karşılaştırmak ve yönteminin çalıştığını doğrulamak için çevreyi algılama sistemi inhibitörü (QSI) olduğu bilinen patulin, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 1 saat oda ısısında bekletilen petriler daha sonra 30 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan mavi halka çevreyi algılama sisteminin inhibisyonunun göstergesi olmuştur (Bjarnsholt vd., 2010).

Çizelge 3. 3. QSI 1 testi için kullanılan besiyeri içeriği

<u>ABT besiyeri</u>	
CaCl ₂ ,	0,1 mM
MgCl ₂ ,	1 mM
FeCl ₃	0,01 mM
Bacto agar	%2
X-gal	40 mg/ml
IPTG	100 mM
10XA	100 mg/ml
Tiamin	25 µg/ml
Ampisilin	100 mg/ml
Glikoz,	% 0,5
Kozaminoasit ,	% 0,5
3-okzo-C6 HSL(OHHL)	100 nM
Bakteri	800 µl
<u>5XA</u>	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr
Na ₂ HPO ₄	6 gr
KH ₂ PO ₄	3 gr
NaCl	3 gr

3.3.2. *Chromobacterium violaceum* 026 - *Chromobacterium violaceum* VIR07 Pigment Üretim Testi

C. violaceum mor pigment bakterisi olarak bilinmektedir. *C. violaceum* tarafından üretilen mor renkli bu pigment viyolasin pigmenti olup üretimi çevreyi algılama mekanizması kontrolü altında gerçekleşmektedir (McClellan vd., 1997).

C. violaceum'un mutant formu olan 026, C6-HSL üretemezken ortama eklenen C6-HSL varlığında viyolasin üretebilir. *C. violaceum* 026 suşundaki bu viyolasin üretimi C4 ile C8 uzunluğundaki N-açıl zinciri tarafından indüklenir. Aynı şekilde *C. violaceum* 12472' nin mutantı olan VIR07 suşu da ortama uzun zincirli AHL (C10 - C16) molekülleri eklenildiğinde viyolasin pigmenti üretebilmektedir (Morohoshi vd., 2007).

Çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak sentezlenen U65, U77, U92 moleküllerinin, üretimi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen viyolasin pigmenti üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır.

C. violaceum 026 ve *C. violaceum* VIR07 suşları sıvı besiyerinde 30 °C'de 14-16 saat süreyle üretilmiştir. İçerisinde LB agar olan besiyerlerinin üzerine, % 0,5 agar içeren 5 ml soft agar içerisine öncelikle *C. violaceum* VIR07 için OdDHL N-(3-okzododekanoil)- L-homoserin lakton sinyal molekülünden, *C. violaceum* 026 için ise OHHL N-(3-okzohekzanol)-L-homoserin lakton sinyal molekülünden 5µl, sıvı bakteri kültürlerinden ise 100µl eklenerek petri kutularındaki besiyerlerinin üzerine dökülmüştür. Petri kutularındaki besiyerleri katılaştıktan sonra kuyucuk açılmış ve inhibitör adayları olarak sentezlenen U65, U77 ve U97 moleküllerinden 50 µl kuyucuklara yüklenmiştir. Kuyucukların etrafındaki renksiz zon inhibisyonu göstermiştir.

3.4. *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR* Genlerinin PCR ile Analizi

Klinik *P. aeruginosa* bakteri örneklerinde *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR* genlerini tespit etmek için koloni PCR yöntemi uygulanmış ve PA01 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu amaçla bakteri örneklerine ait 1 gecelik agar kültürden 2-3 koloni

steril krdan ile alınmış ve 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpü içerisinde 50 µl steril saf su ilave edilerek koloniler saf su içerisinde süspanse edilmiştir. Süspanse koloni içeren eppendorflar ağızları parafilm ile kapatılarak 100 °C'lik saf suda 15 dakika kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında soğuması için bekletilen eppendorflar daha sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich Universal 32). Santrifüj sonrası süpernatantın 3 µL si PCR için kullanılmıştır.

Bu alışma için suşlarda PCR ile yaklaşık 625 b, 605 bç, 725 bç ve 730 bç'lik sırasıyla *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgelerinin varlığı araştırılmıştır. Bunun için araştırılacak gen bölgesine uygun dört çift primer kullanılmıştır (Schaber vd., 2004). Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonları için kullanılan primerlerin nükleotit dizilimleri izelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 4. *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgelerinin PCR analizi için kullanılan primerler ve oluşacak ürün büyüklükleri

Gen adı	İleri primer	Geri primer	ürün (b)
<i>lasI</i>	5'ATGATCGTACAAATTG GTCGGC-3'	5'GTCATGAAACCGCCAGTCG -3'	605
<i>lasR</i>	5'ATGGCCTTGGTTGACG GTT-3'	5'GCAAGATCAGAGAGTAATA AGACCCA-3'	725
<i>rhII</i>	5'CTTGGTCATGATCGAA TTGCTC-3'	5'ACGGCTGACGACCTCACAC -3'	625
<i>rhlR</i>	5'CAATGAGGAATGACG GAGGC-3'	5'GCTTCAGATGAGGCCAGC -3'	730

2X Master Mix içinde, reaksiyon tamponuna ilaveten 0,05 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi, dNTP karışımı (0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP ve 0,4 mM dTTP), 4 mM MgCl₂ bulunduğundan (izelge 3.5.) n denatürasyon basamağı atlanmış ve PCR reaksiyonun devamı 30 döngü; 95 °C 45 saniye, 55 °C 45 saniye, 72 °C 60 saniye şeklinde gerçekleştirilmiştir. 30 döngünün sonunda 1 döngü 72 °C 5 dakika şeklinde gerçekleştirilip PCR işlemi tamamlanmıştır.

PCR sonucunda oluşan ürünler %1'lik agaroz jel elektroforezde Etidyum Bromür (Sigma) ile boyanarak incelenmiştir. PCR sonucu oluşan ürünler, marker (Fermentas 1kb ladder) ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Sonuçlar *P. aeruginosa* PA01 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. 5. PCR reaksiyon karışımı

2X Master Mix (0,05 U/μl Taq DNA polimeraz enzimi dNTP karışımı (0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP ve 0,4 mM dTTP), 4 mM MgCl ₂)	12,5 μl
Bakteriyel DNA	3 μl
İleri primer	1 μl
Geri primer	1 μl
Steril saf su	7,5 μl
Toplam hacim	25 μl

3.5. İnhibitör Etkisi Araştırılan Moleküllerin (U65, U77, U92) Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MIK) ve Büyüme Eğrileri

U65, U77, U92 moleküllerinin MIK değerleri bu çalışma sırasında incelenen izolatlar (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9) ve *Pseudomonas aeruginosa* PA01 için tespit edilmiştir. Bu amaçla klinik izolatlar 5 ml LB sıvı besiyerinde 37°C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

Test edilen U65, U77 ve U92 molekülleri derişik, % 2, 4, 8, 16, 32, 64 kat olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) ile seyreltilmiştir. İçerisinde 900 μl LB sıvı besiyeri bulunan ve her bir suş ve molekül için ayrı hazırlanan 8 tane plastik tüpe seyreltilen örneklerden 80'er μl ve inkübasyona bırakılmış bulanıklığı 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış bakteri kültüründen 10'ar μl ilave edilmiştir. 37 °C'de çalkalamalı etüvde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (Hammer vd., 1999). İnkübasyon sonrasında MIK değerini tespit etmek için *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarının her biri için örnek sayısı kadar LB agar

besiyeri hazırlanmıştır. Petri kaplarının üzerine derişim oranları yazılarak bölmelere ayrılmıştır. İnkübasyon sonrası ependorflar vortekslendikten sonra seyreltme oranına göre, hazırlanan petri kaplarının üzerindeki uygun bölmeye 5 µl damlatılmış ve 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün koloni oluşup oluşmamasına bakılarak kullanılan örneklerin suşlar üzerindeki MİK değerleri tespit edilmiştir. Kolonin görülmediği ilk bölme MİK değeri olarak kabul edilmiştir. MİK ile belirlenen derişimler için 96 kuyucuklu mikropate kullanılarak büyüme gelişme eğrileri oluşturulmuştur. Kuyucuklara 180 µl LB sıvı besiyeri eklenmiş ve U65, U77, U92 moleküllerinin 24 mM dan başlayan derişimleri (24 mM, 12 mM, 6 mM, 3 mM, 1,5 mM, 0,75 mM, 0.375 mM) kuyucuklarda dilüe edilerek hazırlanmıştır. 37°C’de inkübasyona bırakılan mikropateler 30 dakika aralıklarla “Epoch Miproplate Spektrofotometre” kullanılarak 600 nm de okutulmuştur.

3.6. *P. aeruginosa* PA01 ve *P.aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 Klinik İzolatlarının Antibiyotik Hassasiyetlerinin Araştırılması (Disk difüzyon yöntemi)

Çalışmalarda kullanılan *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarının, antibiyotik direnç profilleri ondört çeşit antibiyotiğe karşı disk difüzyon testi uygulanarak araştırılmıştır. Bu amaçla Gram negatif bakterilerin tedavisinde en çok tercih edilen Piperacillin (Oxoid 100 µg), Ticarcillin (Oxoid 75 µg), Piperasillin-tazobaktam, Imipenem (Oxoid 10 µg), Meropenem (Oxoid 10 µg), Gentamisin (Oxoid 10 µg), Tobramycin (Oxoid 10 µg), Amikasin (Oxoid 30 µg), Siprofloksasin (Oxoid 5 µg), Levofloxacin (Oxoid 5 µg), Sefepim (Oxoid 30 µg), seftazidim (Oxoid 30) µg ,Kolistin (Oxoid 10 µg), Aztreonam (Oxoid 30 µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış 2 mL bakteri süspansiyonu, Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri bulunan petrilere yayılmıştır.

Kullanılan antibiyotik diskler, besiyeri yüzeyine yerleştirilmiş ve 37 °C’de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bakteri suşu için inhibisyon zon çapı ölçülmüştür Test sonuçları, suşlar için hassas (S), dirençli (R) ve orta derecede duyarlı (I) olarak CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ’in kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2011).

3.7. Virülens Faktörleri Üretim Testleri

3.7.1 Elastaz Testi

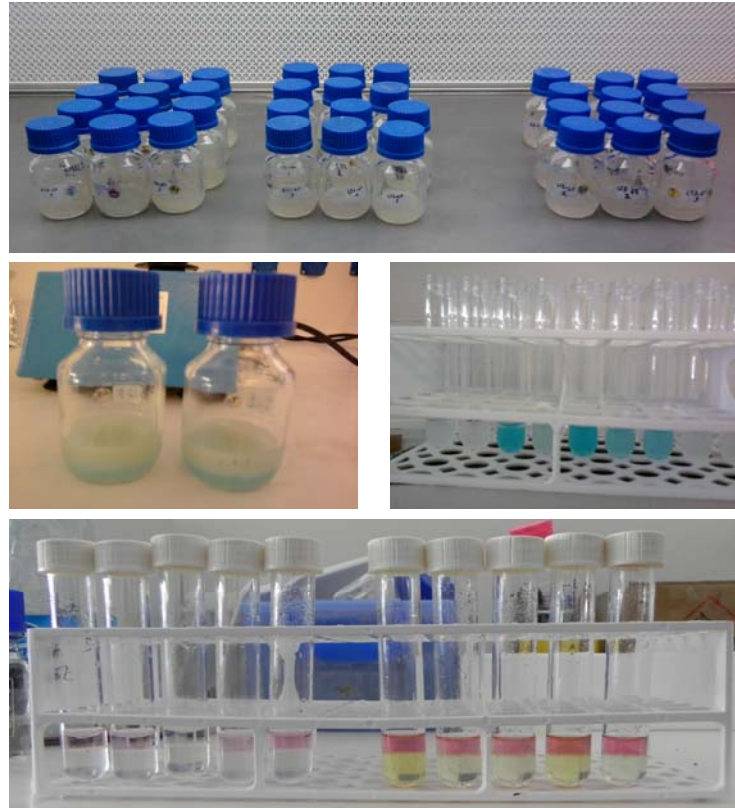
Elastaz aktiviteleri test edilecek *P. aeruginosa* PA01suşu ve *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* M2, *P. aeruginosa* M3, *P. aeruginosa* M4, *P. aeruginosa* M5, *P. aeruginosa* M6, *P. aeruginosa* M7, *P. aeruginosa* M8, *P. aeruginosa* M9 klinik izolatlarının elastaz üretimine etkisi Elastin Kongo Red (ECR) testi ile incelenmiştir (Ohman vd., 1980). *P. aeruginosa* suşları 10 ml LB sıvı besiyerine U65, U77 ve U92 moleküllerinin 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerde eklenmesinden sonra 37 °C’de, çalkalamalı inkübatörde 14-16 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin supernatant kısmından 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 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve supernatant kısım OD 495 nm’de okunmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3. 5. Elastaz testi deneysel aşamalar

3.7.2. Piyosiyanin Testi

U65, U77, U92 moleküllerinin piyosiyanin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi test edilecek bakteri suşları (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, PA01) LB besiyerinde 37 °C’de 16-18 saat üretilmiştir. Test edilecek olan moleküller 3 farklı derişimde (3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM) olacak şekilde hazırlanıp içerisinde 10 ml LB besiyeri olan şişelere eklemiştir. *P. aeruginosa* suşları 600 nm’de OD 0.05 olacak şekilde ayarlandıktan sonra moleküllerin ilave edildiği şişelere eklenmiş ve 37 °C’de 16 saat çalkalanarak üretilmiştir. 16 saat sonra LB besiyeri ortamında üretilen *P. aeruginosa* kültürlerine 5 ml kloroform eklenmiş ve 30 saniye vortekslenmiştir. Şişelerin alt kısmında kloroformdan ayrı olan faz 2ml olacak şekilde her örnekten aynı miktarda alınarak cam tüplere konulmuştur (Şekil 3.5). Daha sonra cam tüplerin üzerine 1ml HCL-su karışımı ilave edilerek 30 saniye vortekslenmiş, tüplerin üst kısmında oluşan pembe faz OD 520 nm de okunarak kaydedilmiştir (Essar vd., 1990).



Şekil 3. 6. Piyosiyanin testi deneysel aşamalar

3.7.3. Proteaz testi

İçerisinde 10 ml LB sıvı besiyeri olan şişelere, OD 600 nm'de 0.05 yoğunluktaki bakteri kültürlerinden hesaplanan miktarda ekleyip 37°C bir gece çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca içerisinde LB+U65, U77, U92 molekülleri olan şişelere de bakteri kültürlerinden OD 600'nm de 0.05 yoğunlukta hesaplanan miktarlarda eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonunda bakteri kültürlerinden 200 µl alınarak ve 500 µl % 0,2 azokazein içeren endorflara aktarılmıştır. 60 dk 50°C 200 ppm de inkübasyona bırakılan endorflara bir saat sonra 200 µl %10 trikloroasetik asit eklenmiş ve 120 dk 50°C de bekletilmiştir. Daha sonra 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı 350 nm'de okunmuştur (Şenyürek vd., 2009). Deneyler en az 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar *P. aeruginosa* PA01 suşu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve negatif kontrol olarak *P. aeruginosa* JP2, *P. aeruginosa* JP3 kullanılmıştır.

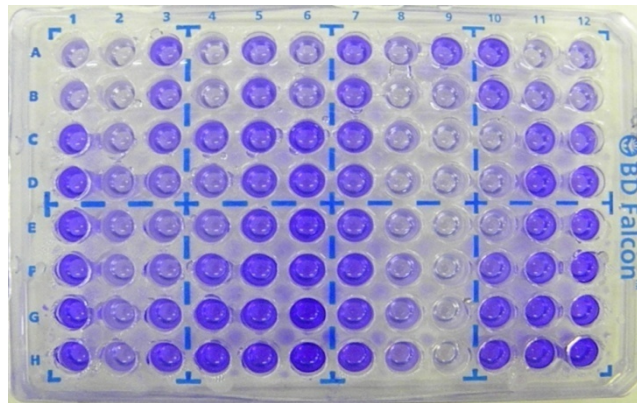
3.7.4. Kayma Hareketi Testi

Test edilecek *P. aeruginosa* suşları (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, *P. aeruginosa* PA01) bir gece Luria-Bertani besiyerinde 37 °C'de üretilmiştir. 8g nutrient broth 1⁻¹, 5 g bakto agar 1-1 ve % 0,5 glikoz içeren kayma besiyeri içine inhibisyon etkisi araştırılan U65, U77, U92 moleküllerinden 1,5 mM derişimde eklenmiştir. Petrilere dökülen besiyerleri katılaştıktan sonra ortalarına bir gece önce ekilmiş olan bakteri kültürlerinin santrifüj sonrası süpernatant kısmından 5 µl eklenmiş ve 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Sonuçlar kayma hareketi özelliğine sahip olan PA01 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.7.5. Biyofilm Oluşum Testi

P. aeruginosa PA01 suşu ve *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* M2, *P. aeruginosa* M3, *P. aeruginosa* M4, *P. aeruginosa* M5, *P. aeruginosa* M6, *P. aeruginosa* M7, *P. aeruginosa* M8, *P. aeruginosa* M9 klinik izolatlarında U65, U77, U92

moleküllerinin biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir. Bu amaçla bakteriler LB besiyerinde 37 °C’de 16-18 saat üretilmiş ve ertesi gün biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi test edilecek olan moleküller (U65, U77, U92) 3 mM derişimde hazırlanıp (DMSO da çözülmüştür) içerisinde 200 µl LB Broth besiyeri olan olan plastik tüplere 6 µl eklemiştir. 16-18 saat üretilmiş olan bakteri kültürleri bulanıklığı 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bulanıklığa ayarlanarak 200 µl LB Broth+6 µl molekül içeren ependorflara 10 µl ilave edilmiştir. Her molekül ve bakteri için üç plastik tüp kullanılmıştır. Her bakteri için besiyeri içeren plastik tüplere sadece bakteri kültürü eklenerek kontrol grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol olarak PA0-JP2 suşu LB içeren plastik tüplere 10 µl eklenmiş ve besiyeri içeren plastik tüplerin üç tanesine de moleküllerin çözücüsü olan DMSO dan 6 µl eklenerek 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda plastik tüplerdeki kültürler OD 600 nm’de okunmuş ve değerler kaydedilmiştir. Daha sonra kültür içeren plastik tüplerin içeriği dökülerek 3 kez saf su ile yıkanmış ve yıkama işlemi tamamlandıktan sonra tüplere % 0,1 lik kristal viyole çözeltisinden 250 µl eklenmiştir. 30 dakika kristal viyole ile muamele edilen plastik tüpler 5 kez saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra 250 µl %95 lik etanol ilavesiyle 15 dakika çözdürülerek örnekler 96 kuyucuklu mikropate içerisine aktarılmış ve “Epoch Miproplate Spektrofotometre” kullanılarak sonuçlar 570 nm’de okunmuştur (Şekil 3.7). Sonuçlar biyofilm oluşturma özelliğine sahip olan *P. aeruginosa* PA01 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 7. Etanolde çözülmüş kristal viyole içeren örnekler

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

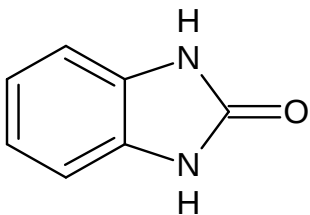
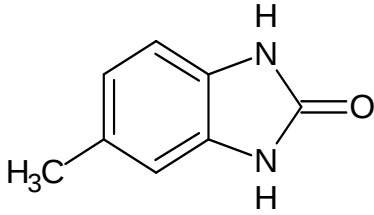
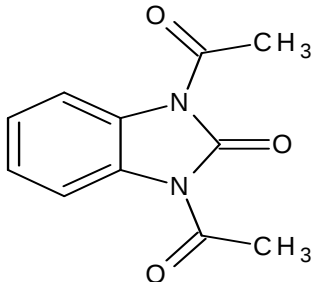
Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen veriler *P. aeruginosa* PA01 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmişlerdir. Sonuçlar ile kontrol arasındaki fark $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistik olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Tasarlanan Moleküllerin Seçimi

Çalışma kapsamında çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak 20 molekül sentezlenmiş, fakat bu 20 molekülün sadece 3 tanesi deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 4.1). Diğer 17 molekül çözünürlük probleminde dolayı çalışmalarda kullanılamamıştır.

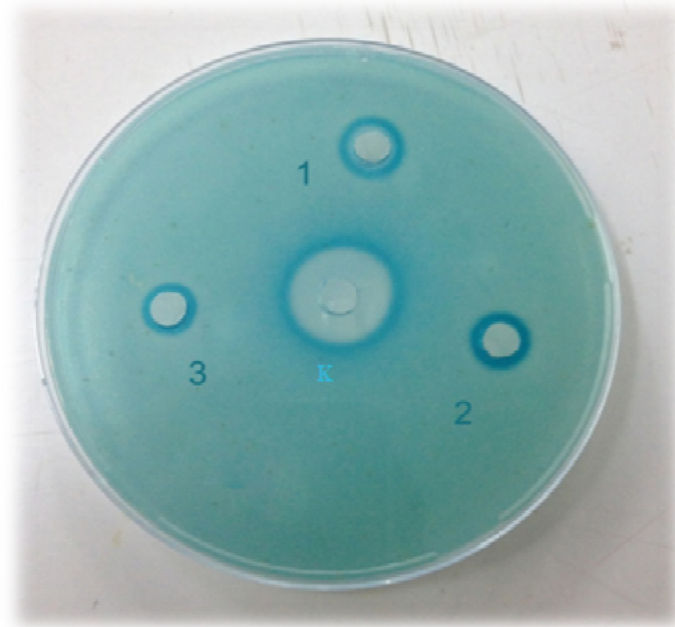
Çizelge 4. 1. Çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı moleküller ve yapısal kompozisyonları

U65 MA 134.13 g/mol  1,3-dihidro-2<i>H</i>-benzimidazol-2-on	U77 MA 148.16  5-metil-1,3-dihidro-2<i>H</i>-benzimidazol-2-on
U92 MA:218.20 g/mol  1,3-diasetil-1,3-dihidro-2<i>H</i>-benzimidazol-2-on	

4.2. U65, U77, U92 Moleküllerinin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özelliklerinin Test Bulguları

4.2.1.QSIS1(Quorum Sensing Selector Strain 1) Test Bulguları

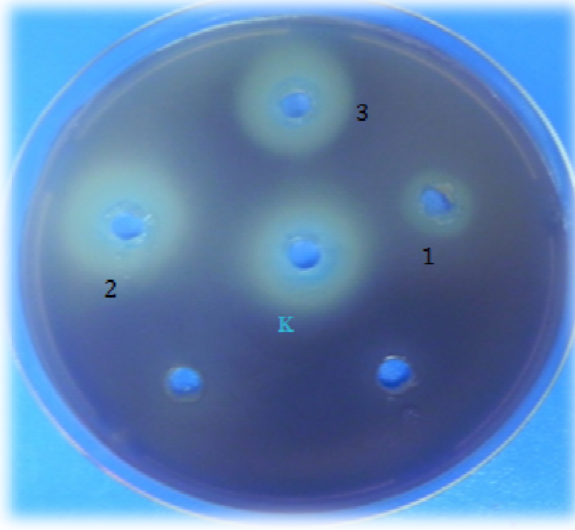
Çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak sentezlenen U65, U77, U92 moleküllerinin çevreyi algılama sistemi üzerindeki inhibitör etkileri QSIS1 testi sonucunda pozitif olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1).



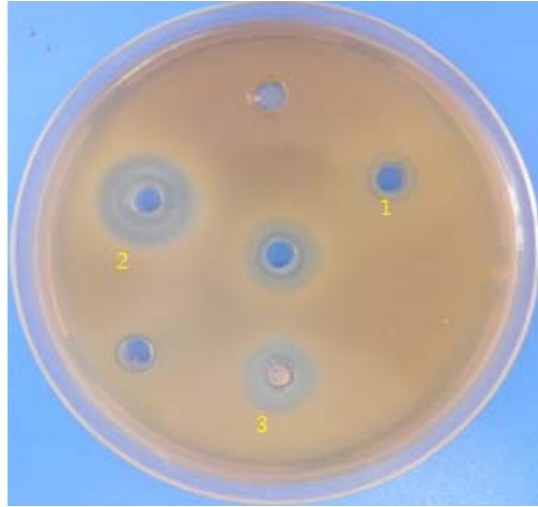
Şekil 4. 1. U65, U77 ve U92 molekülleri için QSIS1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü 1. U65 2. U77 3. U92 K. Patulin(pozitif kontrol)

4.2.2. *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 Pigment Üretim Testi Bulguları

Sinyal molekülü varlığında pigment üretebilen mutant *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 suşları ile yapılan test sonucu besiyeri ortamına sinyal molekülü eklenerek hazırlanan petrilere mor viyolasin pigment üretimi gözlenmiş ve besiyeri üzerinde kuyucuk açılarak viyolasin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan U65, U77, U92 moleküllerinin inhibisyon etkisi kuyucuk etrafında oluşan renksiz zon ile pozitif olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2), (Şekil 4.3)



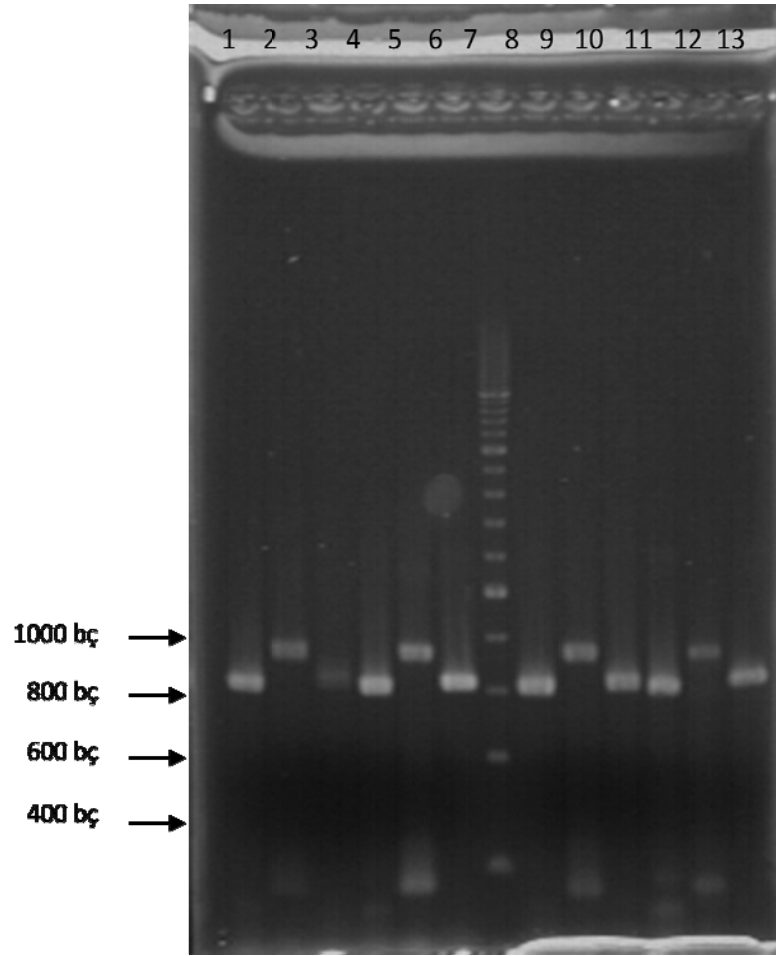
Şekil 4. 2. (1) U65, (2) U77, (3) U92 moleküllerinin *C. violaceum* CV 026'da pigment üretimi üzerine etkisinin agar üzerindeki görüntüsü K: Kontrol (PeA)



Şekil 4. 3. (1) U65, (2) U77. (3) U92 moleküllerinin *C. violaceum* VIR 07'de pigment üretimi üzerine etkisinin agar üzerindeki görüntüsü

4.3. Klinik İzolatların Çevreyi Algılama Sistemi Genlerinin Araştırılması

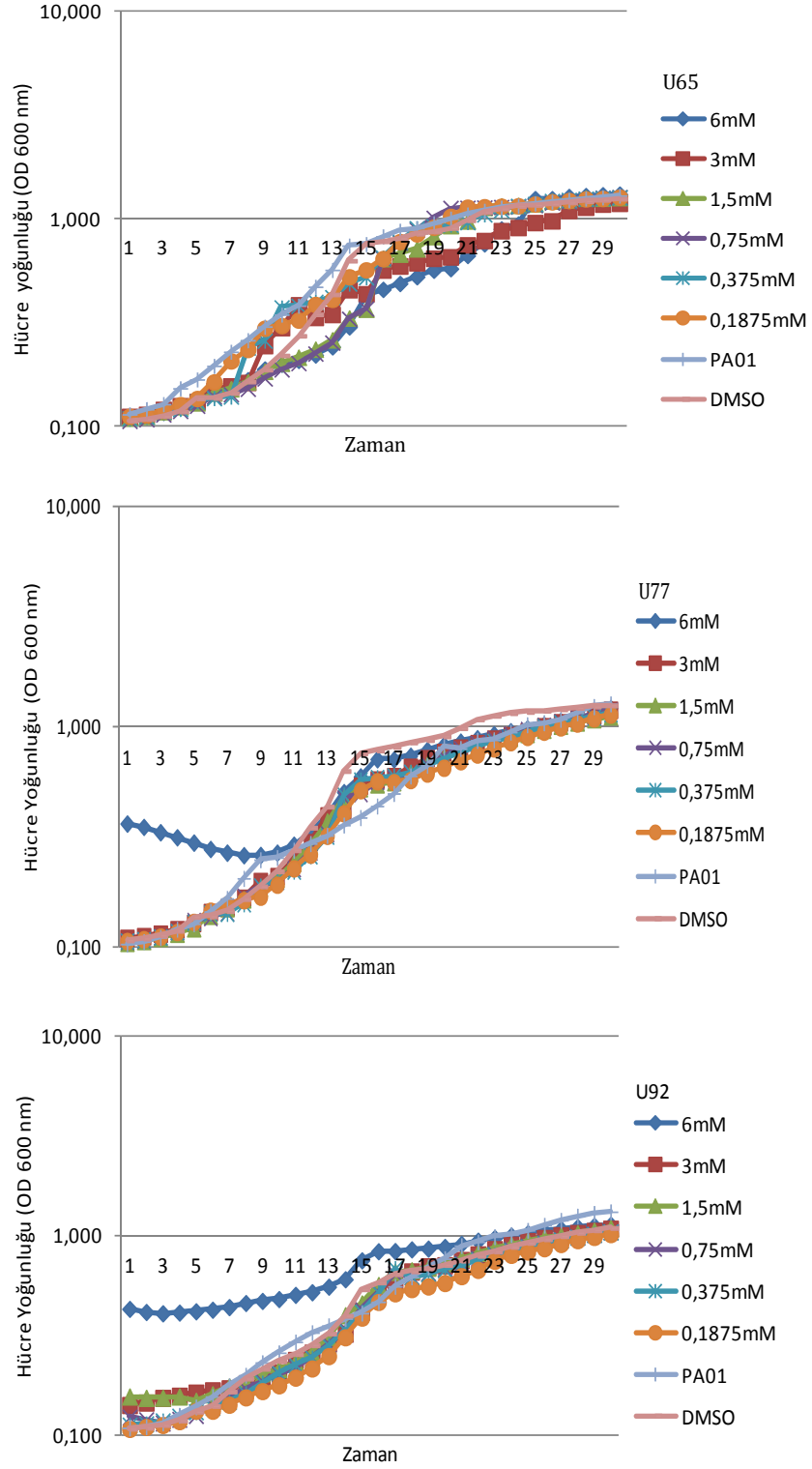
PCR analiziyle 9 klinik izolatın ve *P. aeruginosa* PA01 tamamında *lasI* (605 bç), *lasR* (725 bç), *rhlI* (625 bç), *rhlR* (730 bç) çevreyi algılama sistemi genlerinin mevcut olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. Çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü 1: PAO1 *lasI*, 2: PAO1 *rhlR*, 3: PAO1 *rhlI*, 4: M1 *lasI*, 5: M1 *rhlR*, 6: M1 *rhlI*, 7: DNA Markır (200bç-6600bç), 8: M2 *lasI*, 9: M2 *rhlR*, 10: M2 *rhlI*, 11: M3 *lasI*, 12: M3 *rhlR*, 13: M3 *rhlI*

4.4. Büyüme ve Gelişme Eğrileri

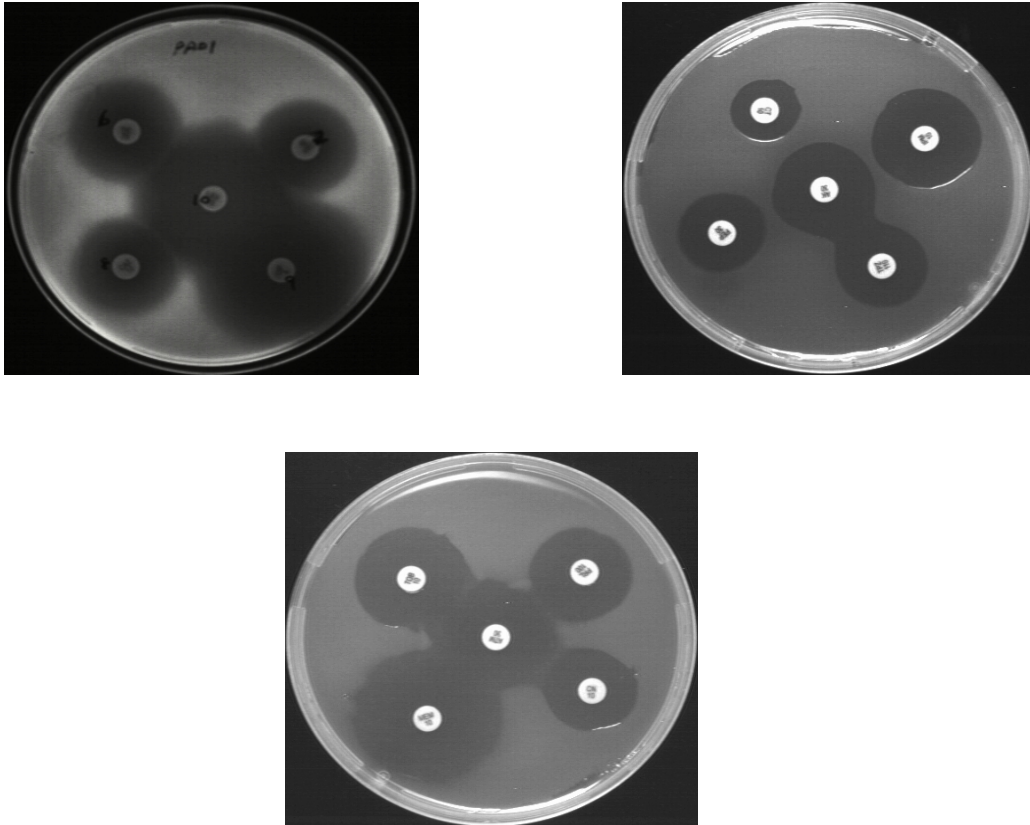
U65, U77, U92 moleküllerinin çalışma sırasında kullanılacak derişimlerinin belirlenmesi amacıyla Mikroplate spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapılmış ve büyüme gelişme eğrileri oluşturulmuştur. 600 nm’de 24 saat sonunda tespit edilen sonuçlara göre 6 mM ve altındaki değerler üremenin baskılanmadığı değerler olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Çalışmada kullanılacak olan derişimler (3 mM, 1,5 mM, 0,75 mM) bu sonuçlara göre belirlenmiştir.



Şekil 4. 5. U65, U77, U92 Moleküllerinin *P.aeruginosa* PA01 suşunun gelişimi üzerine etkisi

4.5. Antibiyotik Hassasiyet Testi

Disk difüzyon testi sonucunda *P. aeruginosa* PA01 ve dokuz adet *P. aeruginosa* klinik izolatlarının tamamının Piperasillin-tazobaktam, Imipenem, Meropenem, Gentamisin, Tobramisin, Amikasin, Siprofloksasin, Levofloksasine karşı duyarlı (S) olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşunun test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Piperasilline M3 ve M9 klinik izolatları orta derecede duyarlı iken M4 dirençli olarak tespit edilmiştir. Tikarsilline M2, M4, M7 orta derecede duyarlı bulunmuştur. Sefepime sadece M9 orta derecede duyarlılık (I) göstermiştir. Seftazidime ise M3 ve M9 izolatları dirençli (R) olup, M4 klinik izolatı orta derecede dirençli (I) bulunmuştur. M3 klinik izolatı Kolistin ve Aztreonama karşı dirençli (R) olup, M1 Aztreonama karşı orta derecede duyarlı (I) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). *P. aeruginosa* PA01 tüm antibiyotiklere duyarlı olarak görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. *P.aeruginosa* PA01 Suşunun disk difüzyon test sonucu

Çizelge 4. 2. *P. aeruginosa* PA01 suşu ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 Klinik İzolatlarının Farklı Antibiyotiklere Hassasiyetleri

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	PA01
PENİSİLLİN										
Piperasillin (100 µg)	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S
Tikarsillin (75 µg)	S	I	S	I	S	S	I	S	S	S
β-LAKTAM/β-LAKTAMAZ										
Piperasillin-tazobaktam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KARBAPENEM										
Imipenem (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Meropenem (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AMİNOGLİKOZİD										
Gentamisin (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramisin (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amikasin (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FLOROKİNOLON										
Siprofloksasin (5 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Levofloksasin (5 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SEFEM										
Sefepim (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Seftazidim (30 µg)	S	S	R	I	S	S	S	S	R	S
LİPOPEPTİT										
Kolistin (10 µg)	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
MONOBAKTAM										
Aztreonam (30 µg)	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S

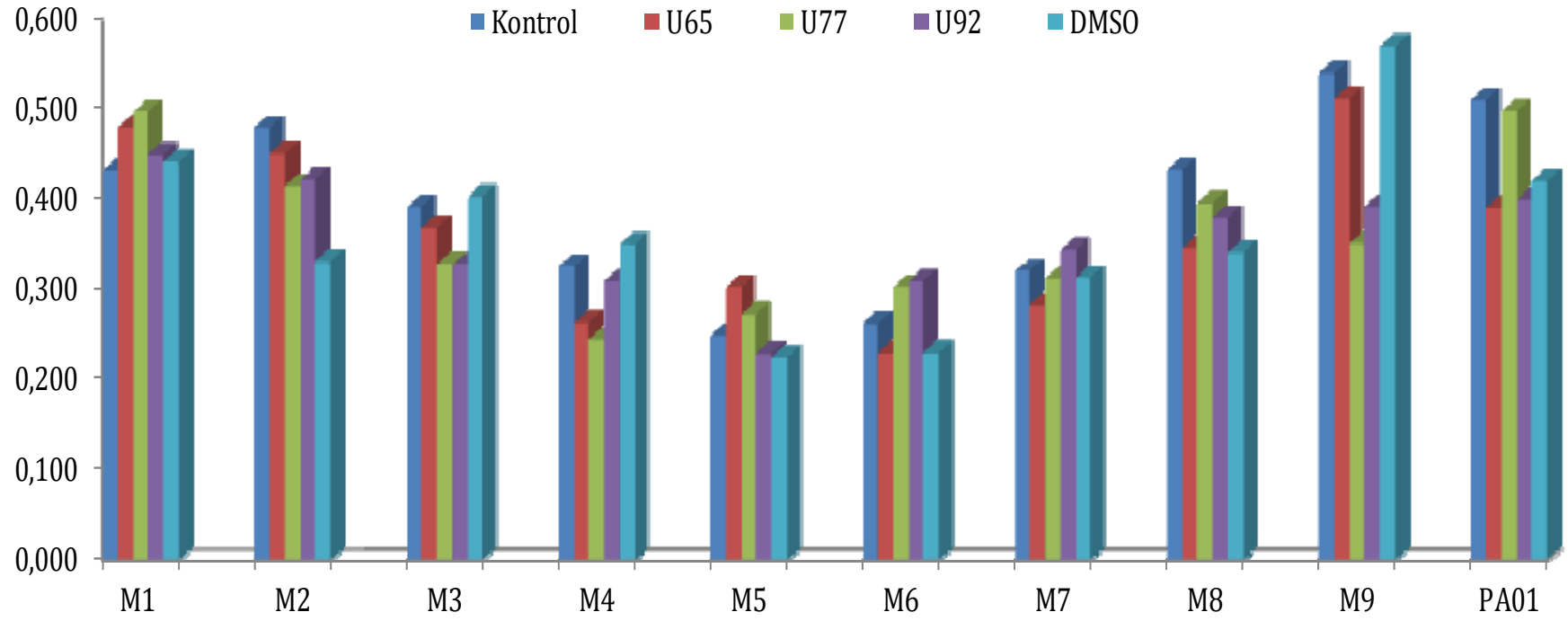
S: Duyarlı

I: Orta Derecede Duyarlı

R: Dirençli

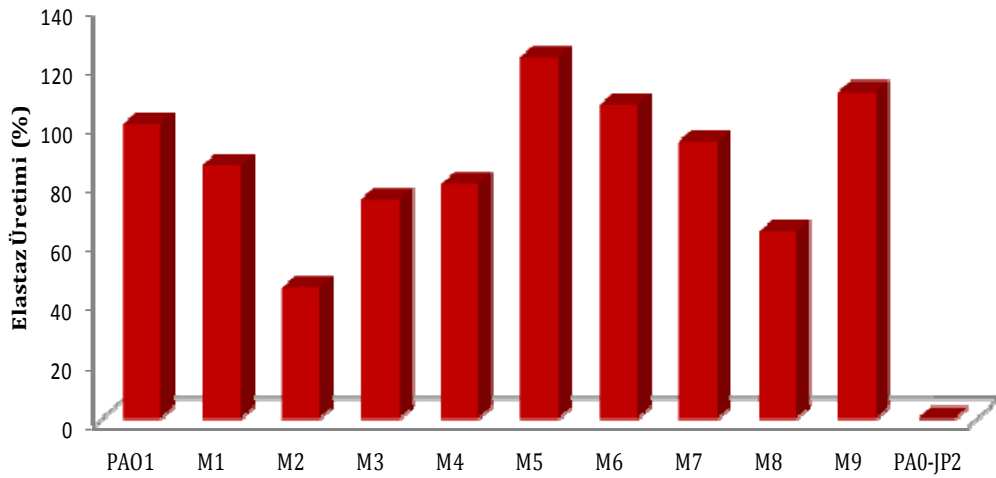
4.6. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Elastaz Üretimine Etkisi

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör adaylarının bakteri gelişimini engellemeyip sistem üzerine inhibisyon aktivitesinin olması istenmektedir. Yaptığımız bu çalışmada çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör adayları olarak tespit edilen U65, U77, U92 moleküllerinin inhibitör etkilerinin bakteri üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olmadan gerçekleştirdiğinin görülmesi için bakteri kültürlerinin öncelikle OD 600 nm'deki değerleri incelenmiş ve virülens faktörlerinin üretim testlerinde U65, U77, U92 moleküllerinin kullanılan 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin OD 600 nm'deki sonuçlarına göre antibakteriyel etkilerinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.7).

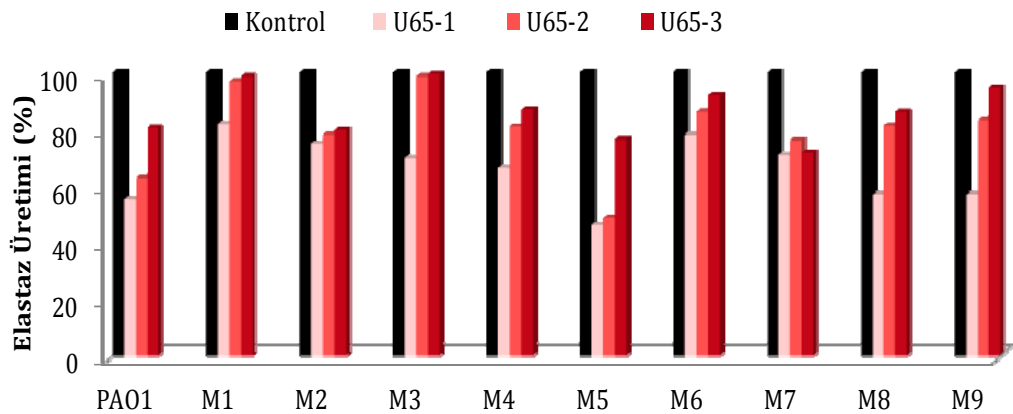


Şekil 4. 7. U65, U77, U92 nolu moleküllerin (1):3 mM derişimleri için *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, *P. aeruginosa* PA01 klinik izolatlarında absorbans (600 nm) değerleri.

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatların elastaz üretim özellikleri incelendiğinde, 9 klinik izolattan 3 tanesinin elastaz üretimi % 100 olarak kabul edilen *P. aeruginosa* PA01 suşuna göre % 7 ile % 23 arasında değişen oranlarda M5, M6, M9 klinik izolatlarında daha fazla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer altı klinik izolatta ise elastaz üretimi % 44 ile % 94 arasında değişmektedir. % 94 ile *P. aeruginosa* PA01 suşuna en yakın elastaz üretme yüzdesini *P. aeruginosa* M7 klinik izolatu gösterirken, en az elastaz üretim aktivitesi % 45 ile *P. aeruginosa* M2 klinik izolatında görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi (%)

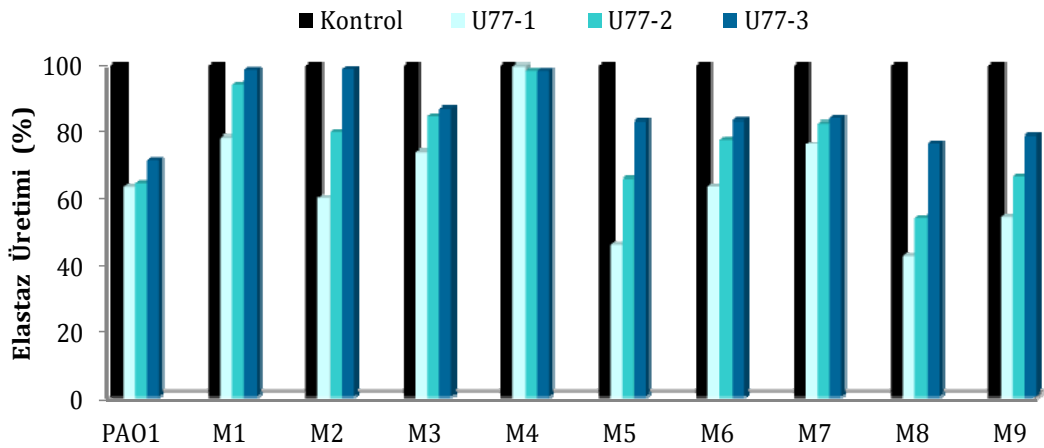


Şekil 4. 9. U65 molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkisi (%).

P. aeruginosa PA01 suşu ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında U65 molekülü 3 mM derişimde elastaz üretimi üzerine % 18 ile % 54 arasında değişen inhibisyon etki göstermiştir. En düşük inhibisyon yüzdesi % 18 ve % 21 olarak M1 ve M2 izolatlarında görölürken inhibisyonun en fazla göröldüğü izolat % 54 ile M5 olmuştur. Bunu en yakın % 45 ile *P. aeruginosa* PA01 suşu takip etmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca tespit edilen inhibisyon yüzdelerinden M4 (% 34), M5 (% 54), M6 (% 22), M7 (% 29), M8 (% 43), M9 (% 43) klinik izolatlarında ve *P. aeruginosa* PA01 suşu (% 45) sonuçları istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.12., Şekil 4.13).

U65 molekülünün ikinci derişiminde ise (1,5 mM) % 3 ile % 52 arasında değişen inhibisyon değerleri saptanmış olup bir üst derişim sonuçları ile doğru orantılı olarak en yüksek inhibisyon % 52 ile M5 izolatında, % 37 ile *P. aeruginosa* PA01 suşunda görölmüştür. M5 (% 52), M7 (% 24), PA01 (% 37) sonuçları istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.12., Şekil 4.13).

U65 molekülünün test edilen 0,75 mM derişiminde ise, % 0 ile % 25 arasında değişen inhibisyon oranları gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bulunan sonuçlardan M7 izolatında görülen % 28 oranındaki inhibisyon değeri istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.13).



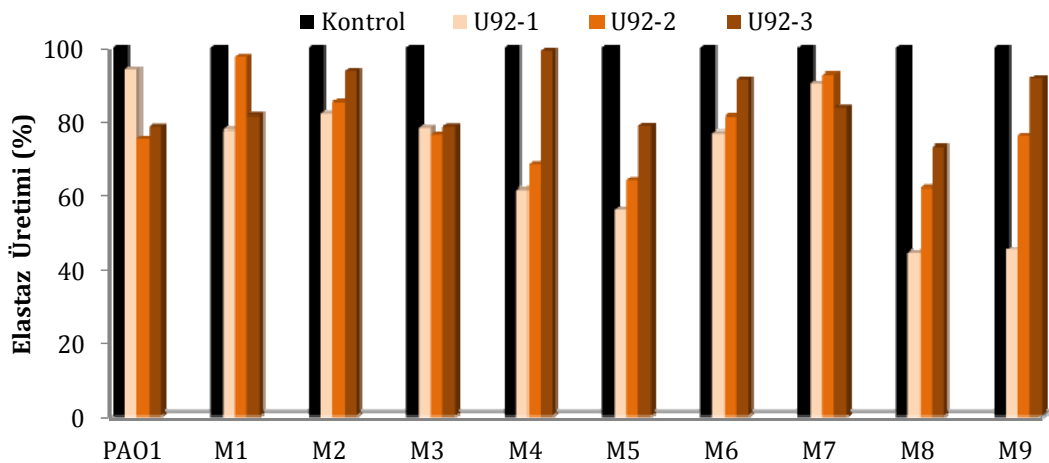
Şekil 4. 10. U77 molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkisi (%).

Elastaz üretimi üzerine inhibisyon etkisi araştırılan ikinci molekül U77'nin kullanılan ilk derişimi 3 mM da inhibisyon değerleri %1 ile %58 arasında değişmiştir. En yüksek inhibisyon değeri % 58 ile M8 klinik izolatında görölürken ikinci sırada % 54 ile M5 klinik izolatı yer almıştır. M4 klinik izolatında ise inhibisyona sebep olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.10). M5 (% 54), M6 (% 37), M7 (% 24), M8 (% 58), M9 (% 46) klinik izolatlar ve PA01 (% 37) suşunda görülen inhibisyon değerleri istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.12., Şekil 4.13).

U77 molekülünün ikinci derişimi 1,5 mM da ise % 2 ile % 46 arasında değişen inhibisyon yüzdeleri bulunmuş ve bu sonuçlardan M5 (% 34), M6 (% 22), M9 (% 34) ve PA01 (% 36) örneklerinde görülen inhibisyon yüzdeleri istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.12., Şekil 4.13).

U77 molekülünün 0,75 mM olan üçüncü derişim inhibisyon sonuçları ise; % 0 ile % 29 arasında değişkenlik göstermiş olup, M9 izolatında % 21 inhibisyon istatistik açıdan anlamlı ($p \leq 0,05$) olup, diğer sonuçlar anlamlı değildir (Şekil 4.10).

Sonuç olarak, U77 molekülünün *P. aeruginosa* PA01 suşu ve 9 adet klinik izolattan 4 tanesinin (M1, M2, M3, M4) elastaz aktivitelerinde inhibisyona neden olmadığı gözlenmiştir.

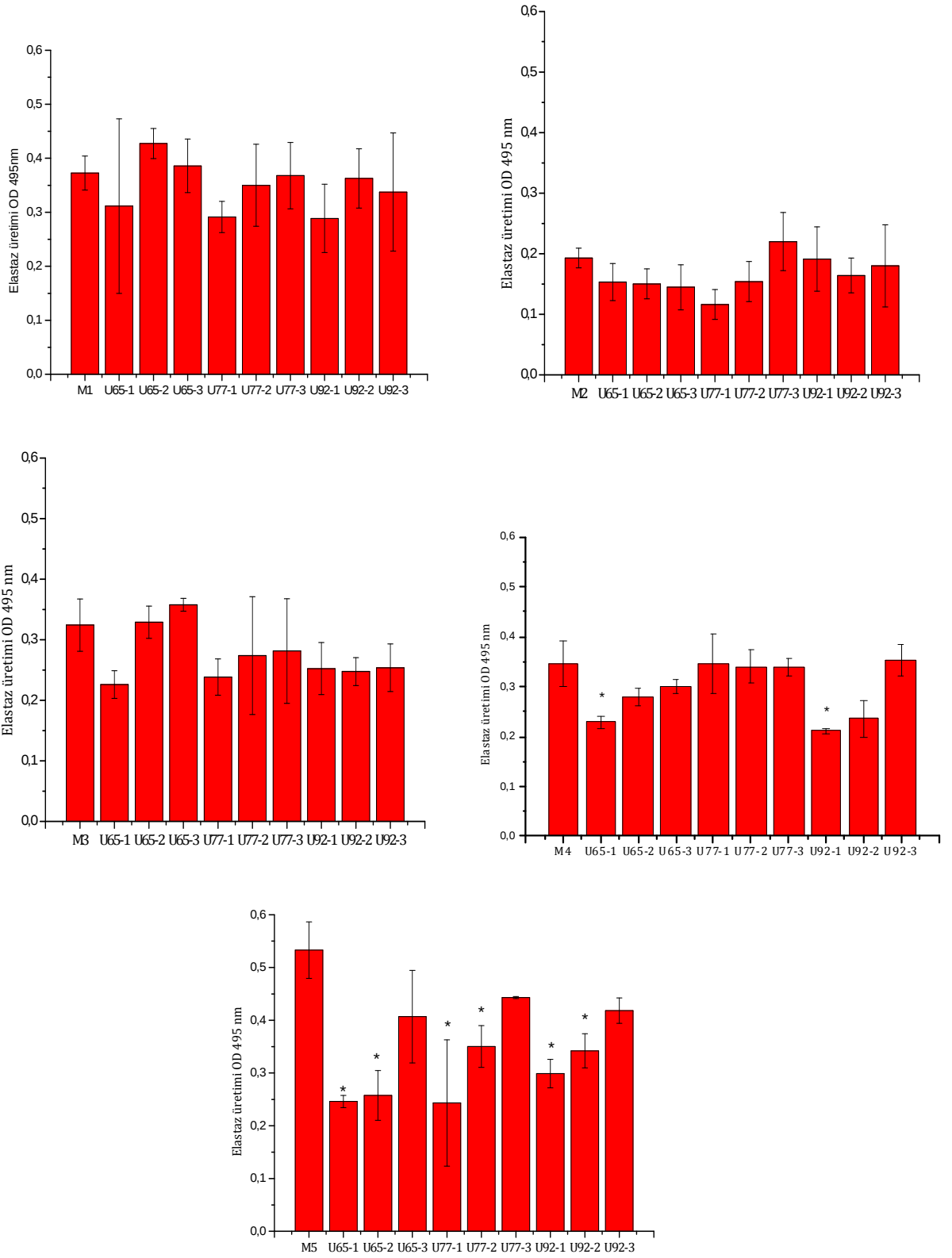


Şekil 4. 11. U92 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkisi (%).

P. aeruginosa PA01 suşu ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında elastaz üretimine inhibisyon etkisi araştırılan U92 molekülünün inhibisyon etkisi ilk derişimde (3 mM) % 6-% 56 arasında bulunmuştur. En fazla inhibisyon etki M8 (% 56) ve M9 (% 55) klinik izolatlarında görölmüştür. M5 izolatında % 44, M4 izolatında % 39, M6 izolatında % 23 olarak tespit edilmiş (Şekil 4.11) ve bu sonuçlar istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.12., Şekil 4.13).

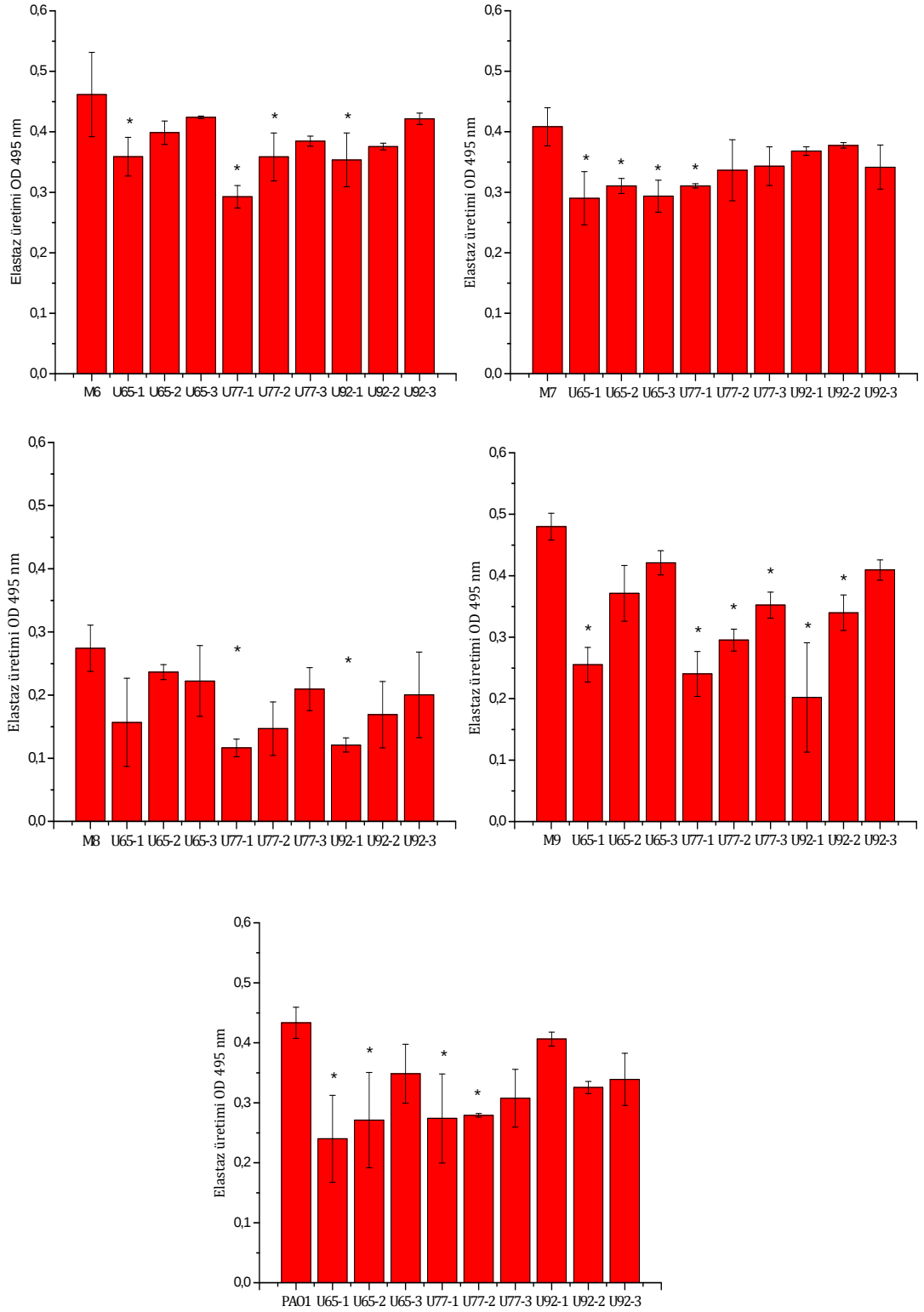
U92 molekülünün ikinci derişiminde gözlenen inhibisyon yüzdeleri % 3-% 38 arasında değışkenlik göstermiş, M5 izolatındaki % 36, ve M9 klinik izolatında da görülen % 24 inhibisyon oranı istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.12, Şekil 4.13).

U92 molekülünün üçüncü (0,75 mM) derişiminde görülen % inhibisyon değeri % 0 ile % 27 arasında görölmüş ve bu sonuçlar istatistik açıdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.12., Şekil 4.13).



Şekil 4. 12. U65, U77, U92 nolu moleküllerin (1):3 mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, klinik izolatlarında elastaz üretimine etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.

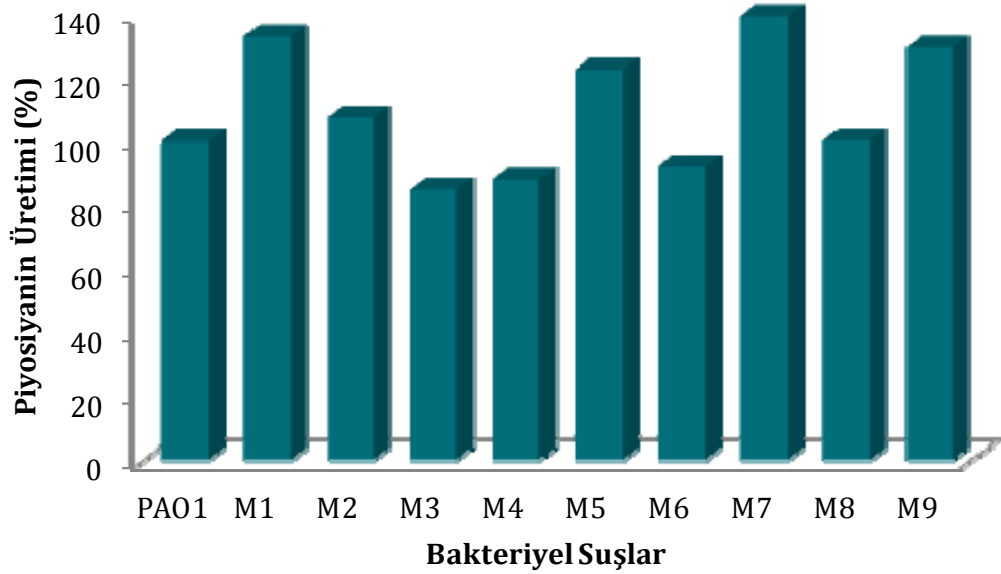


Şekil 4. 13. U65, U77, U92 nolu moleküllerin (1):3 mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için *P. aeruginosa* M5, M6, M7, M8, M9, klinik izolatlarında ve PA01 suşunda elastaz üretimine etkisi.

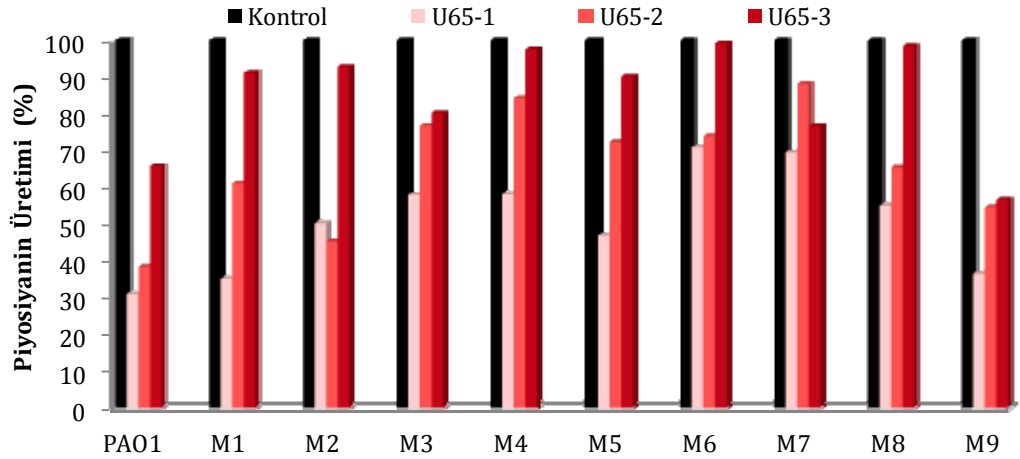
* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.

4.7. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Piyosiyenin Üretimine Etkisi

P. aeruginosa için karakteristik olan piyosiyenin pigment üretimi *P. aeruginosa* PA01 suşu ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında araştırılmış M1, M2, M5, M7 ve M9 klinik izolatlarında; piyosiyenin üretimi PA01 suşuna kıyasla % 7-% 39 arasında değişen oranlarda daha fazla tespit edilmiştir. M8 suşu PA01 ile aynı seviyede aktiviteye sahip iken M3, M4, M6, izolatlarında ise sırasıyla % 84, % 88 ve % 92 oranında piyosiyenin pigment üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14. *P. aeruginosa* PA01 ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimi (%)



Şekil 4. 15. U65 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimi üzerine etkisi (%).

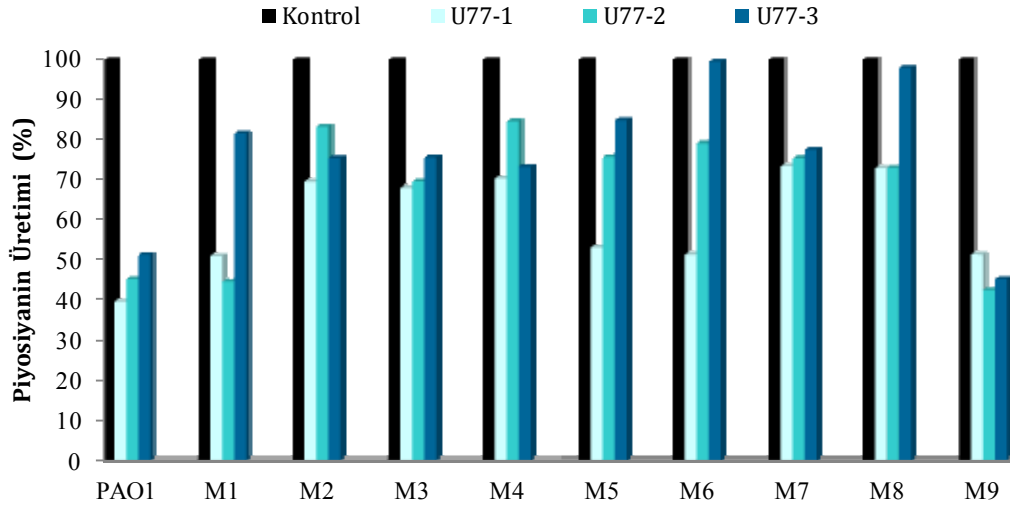
Piyosiyenin üretimi tespit edilen PA01 suşu ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatların piyosiyenin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi öncelikle U65 molekülünün 3 farklı derişimi (3 mM, 1,5 mM, 0,75 mM) kullanılarak araştırılmıştır.

U65 molekülünün 3mM olan ilk derişiminin piyosiyenin üretimi üzerindeki inhibisyon etkisi sonuçlarına göre; M6 klinik izolatında inhibisyon gözlenmezken, *P. aeruginosa* PA01 suşu ve diğer klinik izolatlardan M7 % 31, M3 ve M4 % 42, M8 % 45, M2 % 50, M5 % 53, M1 % 65, *P. aeruginosa* PA01 da % 69 inhibisyon saptanmıştır. (Şekil 4.13.). Saptanan bu değerler istatistik açıdan anlamlıdır ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18., Şekil 4.19). En fazla inhibisyon % 69 ile *P. aeruginosa* PA01 suşunda gözlenmiştir. Bunu takiben % 65 ve % 53 inhibisyon oranı ile M1 ve M5 izolatlarında piyosiyenin pigment üretimi üzerine en yüksek inhibisyon oranları gözlenmiştir (Şekil 4.15).

U65 molekülünün 1,5mM olan ikinci derişiminde ise % 16 ile % 55 arası inhibisyon gözlenmiştir. Bu sonuçlardan ise *P. aeruginosa* PA01 suşunda ve M2 izolatında görülen % 55 ile M1 izolatında görülen % 39 ve M5 izolatında % 28 inhibisyon yüzdeleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18., Şekil 4.12).

U65molekülünün bakterilerde piyosiyenin üretiminin baskılanması amacıyla uygulanan üçüncü derişiminde (0,75 mM) ise % 0 ile % 34 arasında değişen

inhibisyon oranları görülmüş (Şekil 4.18, Şekil4.19) ve bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

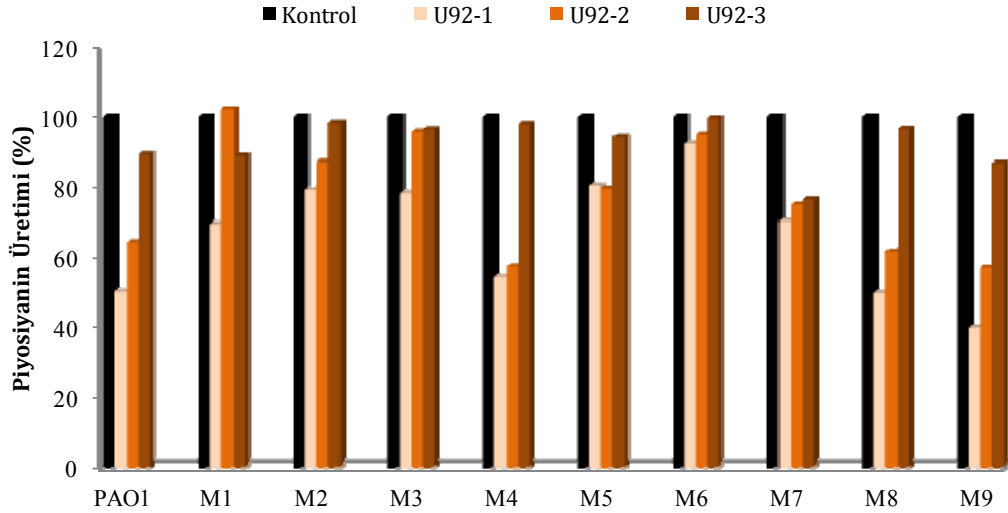


Şekil 4. 16. U77 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimi üzerine etkisi (%).

Piyosiyenin pigment üretimine U77 molekülünün 3 mM derişimdeki etkisi; üzerinde araştırma yapılan bakterilerde % 27 ile %61 arasında değişmektedir. En yüksek inhibisyon % 61 ile *P. aeruginosa* PA01 suş üzerinde tespit edilirken ve en az inhibisyon oranı ise % 27 ile M7 ve M8 klinik izolatlarında görülmüştür (Şekil 4.16). Bu sonuçlardan M1 (% 56), M3 (% 32), M5 (% 47), M6 (% 49), M9 (% 49) ve *P. aeruginosa* PA01 (% 61) suşlarının piyosiyenin üretimlerinin inhibisyon yüzdeleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18., Şekil 4.19).

U77 molekülünün ikinci derişiminde (1,5 mM) *P. aeruginosa* PA01 ve klinik izolatlarında piyosiyenin pigment üretimi üzerine en az etki M4 izolatında % 16, en çok inhibisyon ise *P. aeruginosa* PA01 suşunda % 55 olarak gözlenmiştir (Şekil 4.16). Bulunan sonuçlardan üç tanesi piyosiyenin pigment üretimi üzerindeki inhibisyon etki M1 (% 49), M3 (% 30) ve PA01 (% 55) olarak gözlenmiş ve bu inhibisyon yüzdeleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18., Şekil 4.19).

Bakterilere uygulanan U77 molekülünün üçüncü derişiminde sadece *P. aeruginosa* PA01 suşundaki piyosiyanin pigment üretimi üzerine görülen % 49 inhibisyon istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18), diğer izolatlarda görülen inhibisyon ise % 2 ile % 31 arasında olup anlamlı bulunmamıştır.



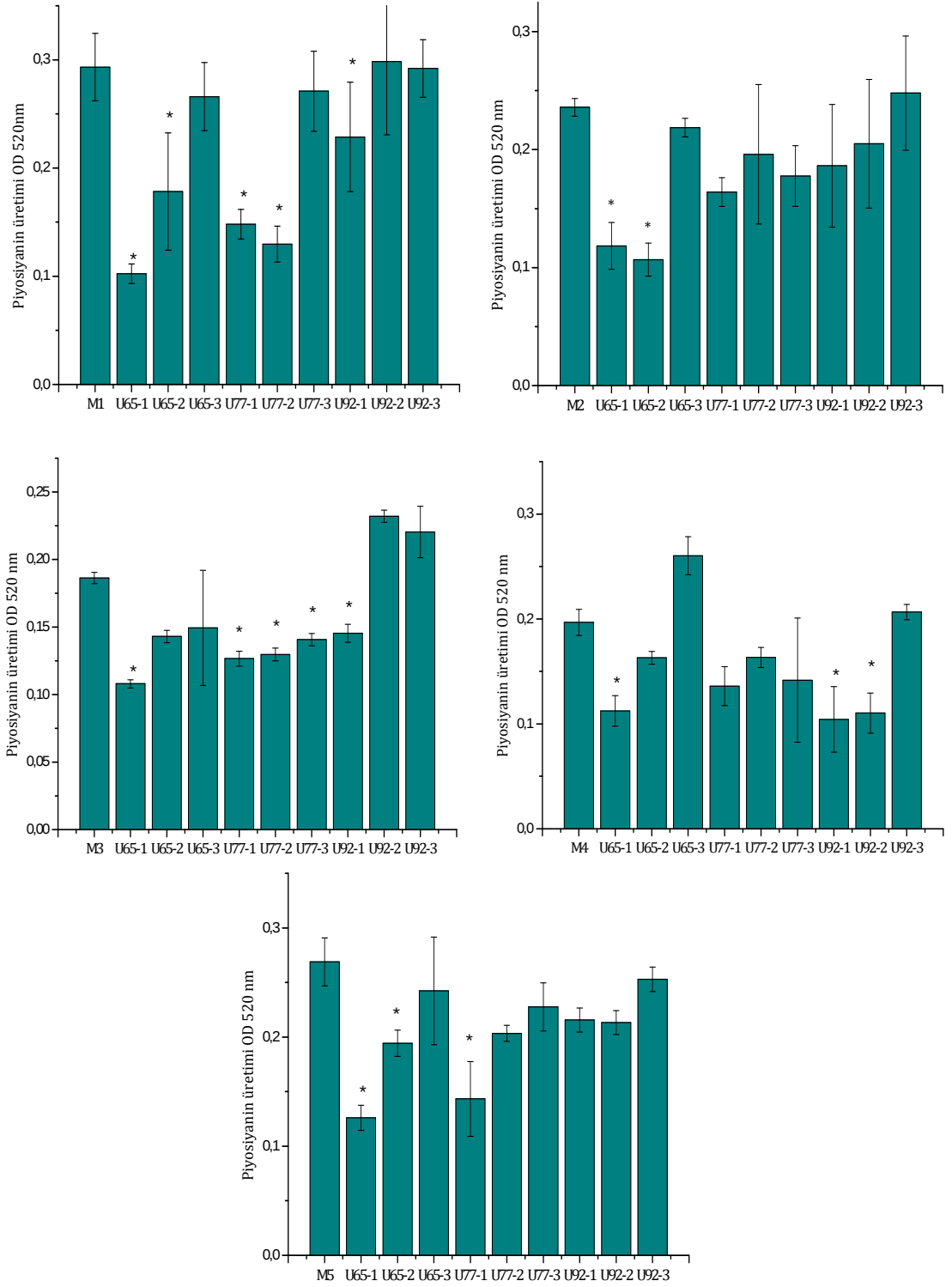
Şekil 4. 17. U92 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında piyosiyanin üretimi üzerine etkisi (%).

U92 numaralı molekülün 3 mM derişiminin piyosiyanin üretimi üzerindeki inhibisyon etkisi *P. aeruginosa* PA01 suşunda % 50 *P. aeruginosa* M9 klinik izolatında % 60, *P. aeruginosa* M8 klinik izolatında % 50, *P. aeruginosa* M4 klinik izolatında % 46, *P. aeruginosa* M1 klinik izolatında % 31, *P. aeruginosa* M3 klinik izolatında % 22 ve *P. aeruginosa* M6 klinik izolatında % 8, *P. aeruginosa* M7 klinik izolatında % 30, *P. aeruginosa* M2 klinik izolatında % 21, *P. aeruginosa* M5 klinik izolatında ise % 20 inhibisyona sebep olmuştur (Şekil 4.17.). Piyosiyanin pigment üretimi üzerine U92 molekülünün 3 mM derişiminin etki ettiği inhibisyon yüzdelerinde *P. aeruginosa* PA01 suşu ve M1, M3, M4, M8, M9 klinik izolatları üzerinde görülen inhibisyon etki istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18, Şekil 4.19).

U92 molekülünün piyosiyanin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisinin 1,5 mM derişimdeki sonuçları ise M4 klinik izolatında % 43, M8 klinik izolatında ise % 39 inhibisyon yüzdeleri gözlenmiştir. Bu iki yüzde inhibisyon sonucu istatistiksel olarak

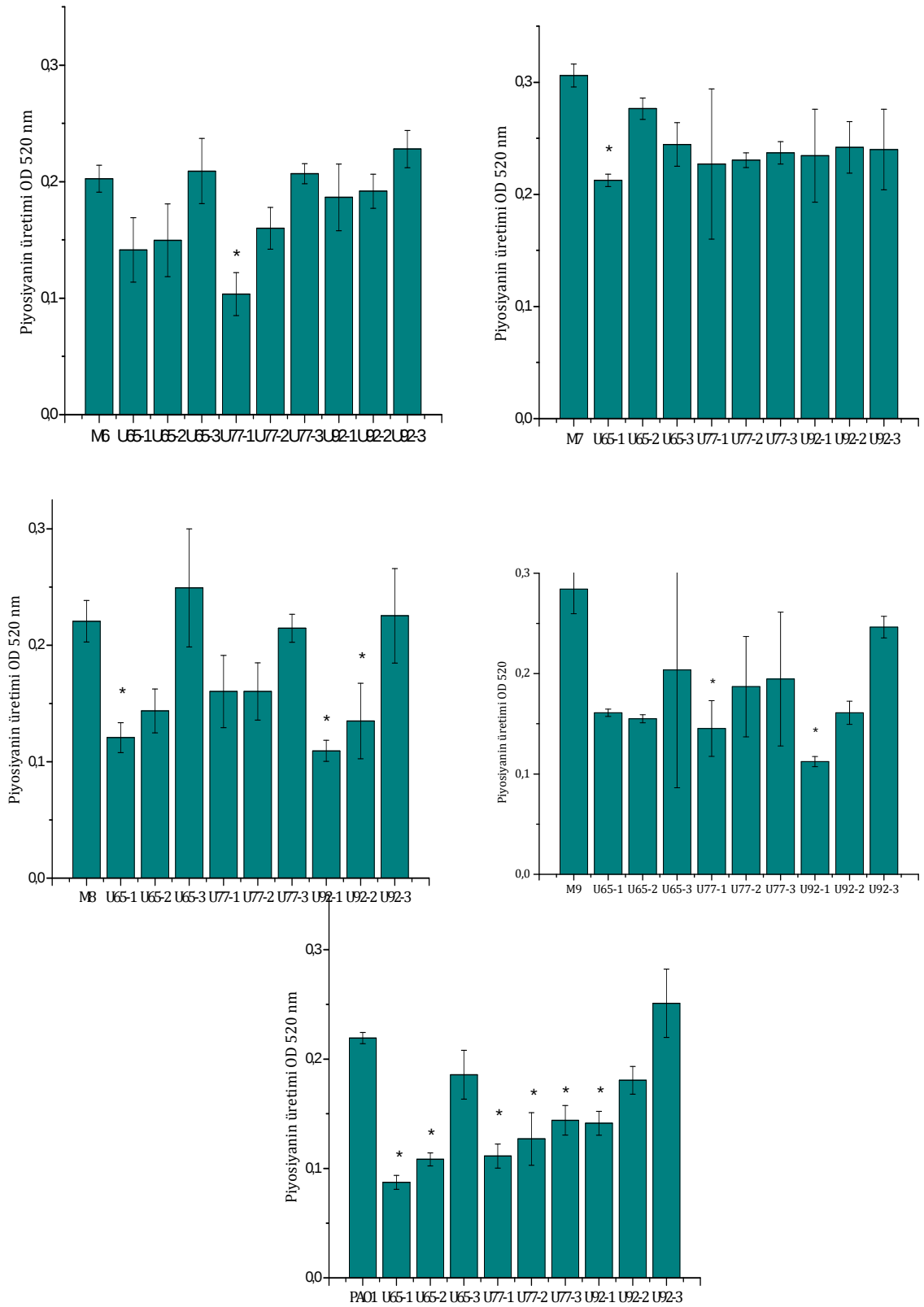
da anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.18., Şekil 4.19). *P. aeruginosa* PA01 suşu ve diğer klinik izolatlarda görülen inhibisyon yüzdeleri istatistik açıdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.18., Şekil 4.19).

U92 molekülünün son derişimi olan 0,75 mM da ise üzerinde çalışılan bakterilerin hiçbirinde piyosiyenin pigment üretimi üzerine anlamlı bir inhibisyon yüzdesi görülmemiştir (Şekil 4.18., Şekil 4.19).



Şekil 4. 18. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3 mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için M1, M2, M3, M4, M5 klinik izolatlarında piyosiyenin üretimine etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.



Şekil 4. 19. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3 mM, (2):1,5 mM, (3):0,75 mM derişimleri için M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında ve PA01 suşunda piyosiyenin üretimine etkisi.

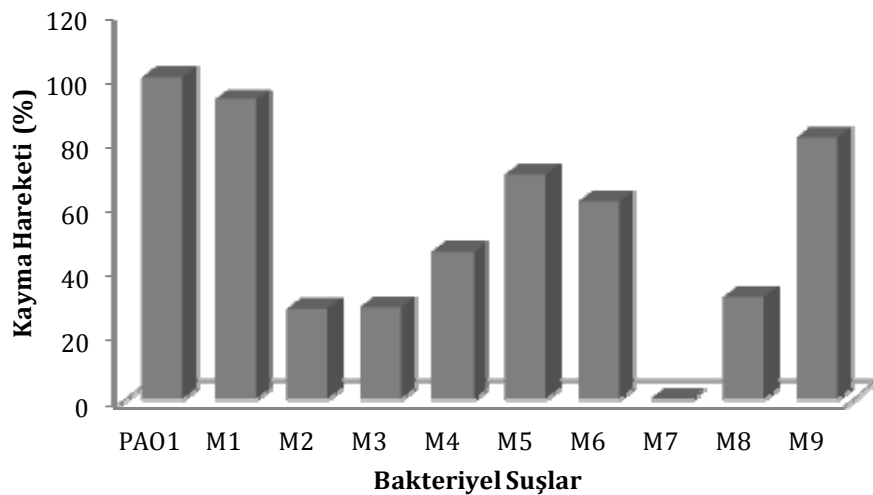
* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.

4.8. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Kayma Hareketine Etkisi

P. aeruginosa da çevreyi algılama sistemi kontöründe gerçekleşmekte olan kayma hareketi üzerine, çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı benzimidazol türevi moleküllerinin (U65, U77, U92) etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmalarda kullanılan *P. aeruginosa* PA01 suşu ve 9 adet klinik *P. aeruginosa* izolatında (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9) benzimidazol türevi moleküllerin 1,5 mM derişimdeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca negatif kontrol olarak da *lasI* ve *rhlI* genleri içermeyen mutant PA0-JP2 suşu kullanılmıştır. Kayma hareketi, bakteri kültürünün petrinin orta kısmına inokülasyon yapılan alandan çevreye doğru gösterdiği yayılmanın çapı ölçülerek tespit edilmiştir. Üç tekrarlı gerçekleştirilen deneysel çalışma sonucu, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.22)

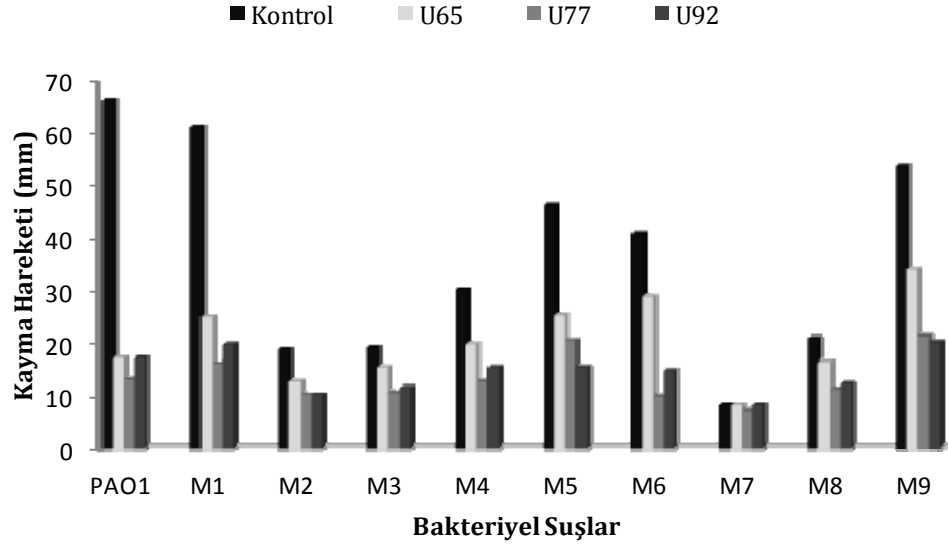
Öncelikle *P. aeruginosa* PA01 suşunun göstermiş olduğu aktivite % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer suşların yaptığı kayma hareketi %'si hesaplanmıştır (Şekil 4.20).

P. aeruginosa PA01 ve diğer klinik izolatların yaptıkları kayma hareketi (mm) ve inhibitör adayı moleküllerin 1,5 mM derişimlerinin kayma hareketi üzerine etkisi Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4. 20. *P. aeruginosa* PA01 ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında kayma hareketi (%)

Üzerinde çalışılan klinik izolatların bir tanesi (M7), PA0-JP2 negatif kontrol suşu ile aynı yayımlı gösterdiği için kayma hareketi yapmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.30). M1 ve M9 suşları % 92 ve % 81 oranları ile *P. aeruginosa* PA01' e yakın seviyede kayma hareketi gösterirken, M5 ve M6 izolatlarında kayma hareketi % 69 ve % 62 oranında görülmüştür. M2, M3, M4, M8 suşlarında ise bu oran % 28 ile % 45 arasında olup en az aktivitenin bu izolatlarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4. 21. U65, U77, U92 Moleküllerinin 1,5 mM derişiminin, *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında kayma hareketi üzerine etkisi (mm)

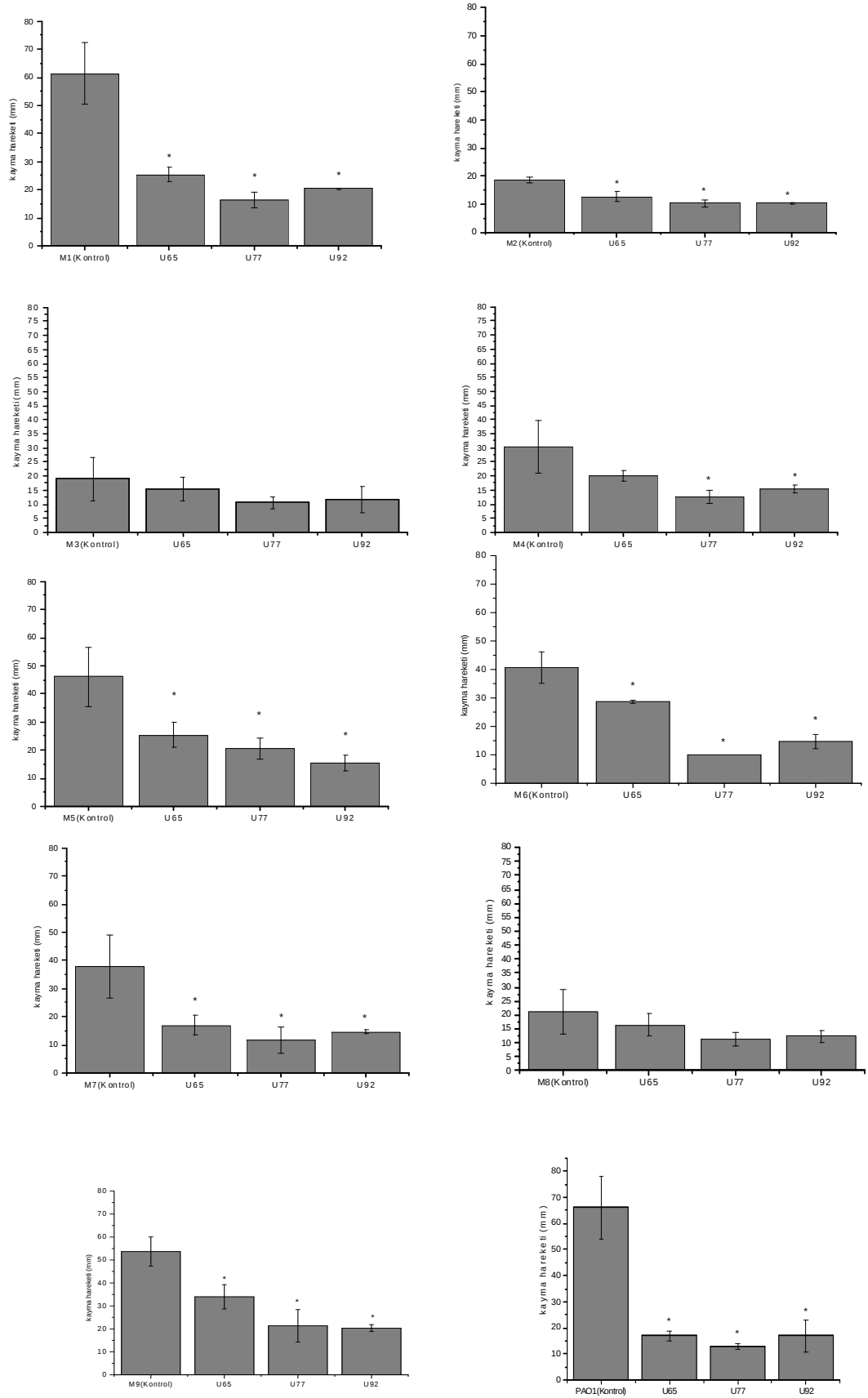
Kayma hareketi üzerine benzimidazol türevi moleküllerin inhibisyon etkisi petride görülen yayılma hareketinin mm olarak ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Şekil 4.21'de 3 farklı molekülün 1,5 mM derişimlerinin (U65, U77, U92) kayma hareketi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre U65 molekülü tüm suşlarda % 19-% 74 arası değişen inhibisyon etki göstermiştir. En yüksek inhibisyon etki % 74 oranıyla *P. aeruginosa* PA01 suşu üzerine olmuştur (Şekil 4.24) ve bu sonuç istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.25). M1 klinik izolatında kayma hareketine inhibisyon etki % 59 olarak görülmüş (Şekil 27) ve istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlı olarak bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 28). M5 klinik izolatında görülen % 45 inhibisyon oranı da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 29, Şekil 30). M9 klinik izolatında ise % 37 inhibisyon oranı gözlenmiştir. M1, M2, M5, M6, M8, M9 klinik

izolatları ile *P. aeruginosa* PA01 suşunda görülen yüzde inhibisyon sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.22).

U77 molekülünün 1,5 mM derişimi ise kayma hareketi üzerinde % 44 ile % 80 arası değişen oranlarda inhibisyona sebep olmuştur. En yüksek inhibisyon % 80 oranında *P. aeruginosa* PA01 üzerinde saptanmıştır. Diğer izolatlarda ise %44 (M3), %45 (M2), % 46 (M8), % 55 (M5), % 58 (M4), % 60 (M9), % 73 (M1) ve % 75 (M6) inhibisyona sebep olmuştur (Şekil 4.20). M1, M2, M4, M5, M6, M8, M9 klinik izolatları ile *P. aeruginosa* PA01 suşunda görülen yüzde inhibisyon sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.22).

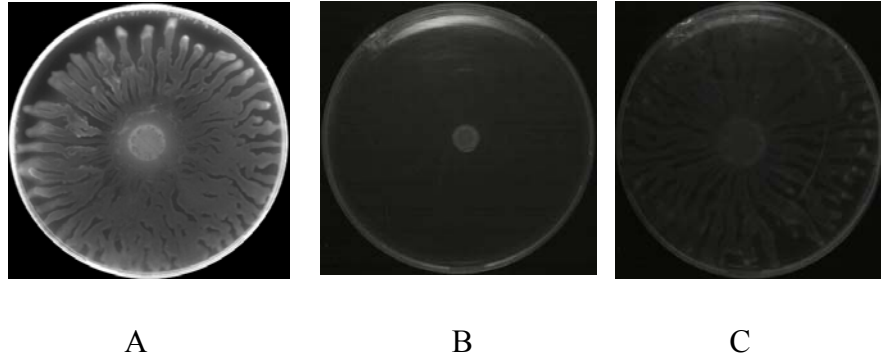
U92 molekülünde ise kayma hareketi üzerine % 39 ile % 74 arası değişen inhibisyon değerleri saptanmıştır. Burada da en yüksek inhibisyon *P. aeruginosa* PA01 suşunun yapmış olduğu kayma hareketi üzerine olmuştur. Diğer izolatlarda ise U92 molekülü, M3’de % 39, M8 % 41, M2 % 45, M4 % 49, M9 % 62, M6 % 63, M1 ve M5’ de % 67 inhibisyona sebep olmuştur (Şekil 4.20). M1, M2, M4, M5, M6, M8, M9 klinik izolatları ile *P. aeruginosa* PA01 suşunda görülen yüzde inhibisyon sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur($p \leq 0,05$) (Şekil 4.22).

Çalışmada U65, U77, U92 moleküllerinin çözünmesinde kullanılan DMSO’nun kayma hareketi üzerine inhibisyon etki göstermediğinin tespiti içinde kullanılan moleküllerin hacmi kadar DMSO eklenen petrilere kayma aktivitesi araştırılmış ve *P. aeruginosa* PA01 suşuna yakın kayma hareketi gösterdiği tespit edilerek DMSO’nun kayma hareketi üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.23).

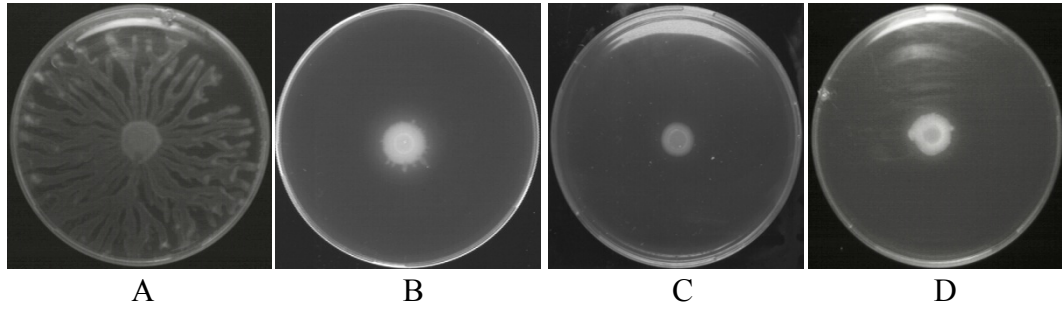


Şekil 4. 22. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında ve PAO1 suşunda kayma hareketine etkisi.

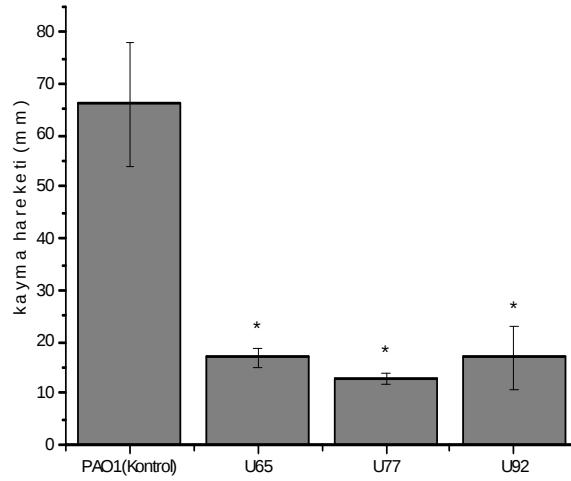
* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.



Şekil 4. 23. A - *P. aeruginosa* PA01 (pozitif kontrol), B - *P. aeruginosa* PA0-JP2 (negatif kontrol), C - *P. aeruginosa* PA01+ DMSO kayma hareketi

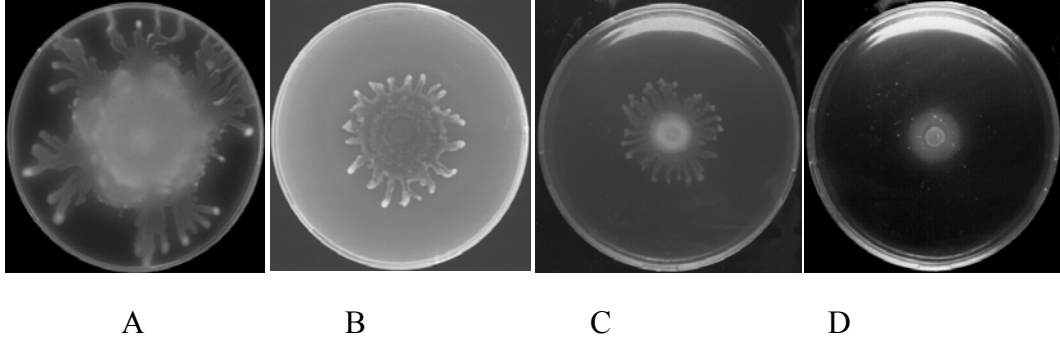


Şekil 4. 24. *P. aeruginosa* PA01 suşunda, U65, U77, U92 moleküllerinin 1,5 mM derişiminde kayma hareketi üzerine etkisi [A (PA01-Kontrol), B (PA01+U65), C (PA01+U77), D (PA01+U92)]

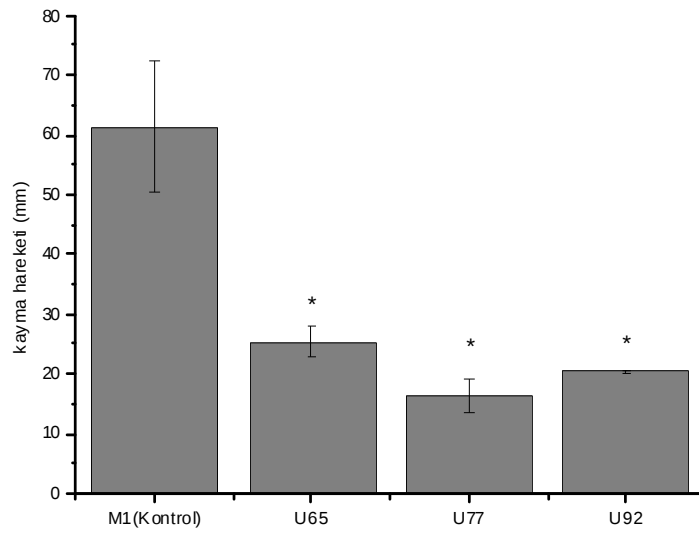


Şekil 4. 25. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin *P. aeruginosa* PA01 suşunda kayma hareketine etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.

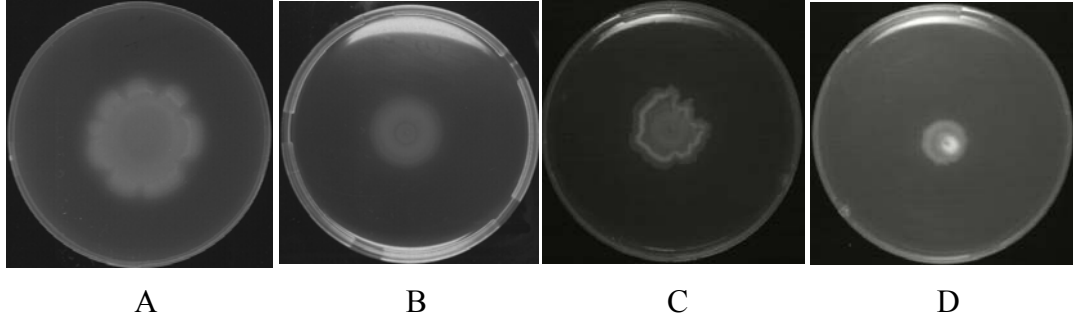


Şekil 4. 26. M1 Klinik izolatında, U65, U77, U92 moleküllerinin 1,5 mM derişiminde kayma hareketi üzerine etkisi [A (M1-Kontrol), B (M1+U65), C (M1+U77), D (M1+U92)]

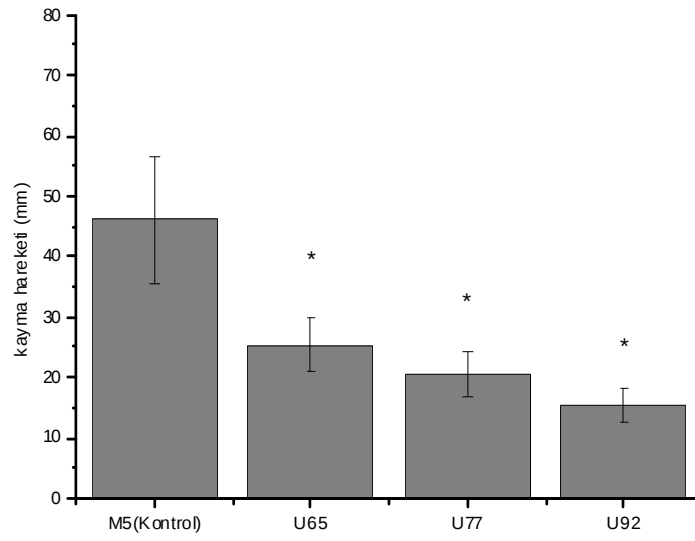


Şekil 4. 27. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin *P. aeruginosa* M1 klinik izolatında kayma hareketi üzerine etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.

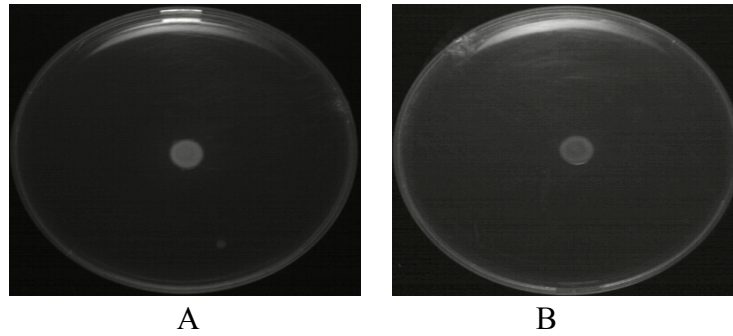


Şekil 4. 28. M5 Klinik izolatında, U65, U77, U92 moleküllerinin 1,5 mM derişiminde kayma hareketi üzerine etkisi [A (M5-Kontrol), B (M5+U65), C (M5+U77), D (M5+U92)]



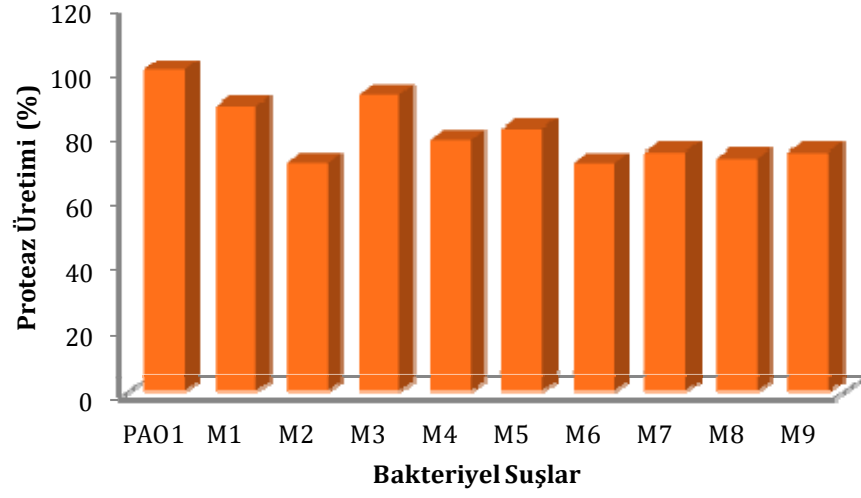
Şekil 4. 29. U65, U77, U92 nolu kimyasalların 1,5 mM derişiminin *P. aeruginosa* M5 klinik izolatında kayma hareketi üzerine etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir



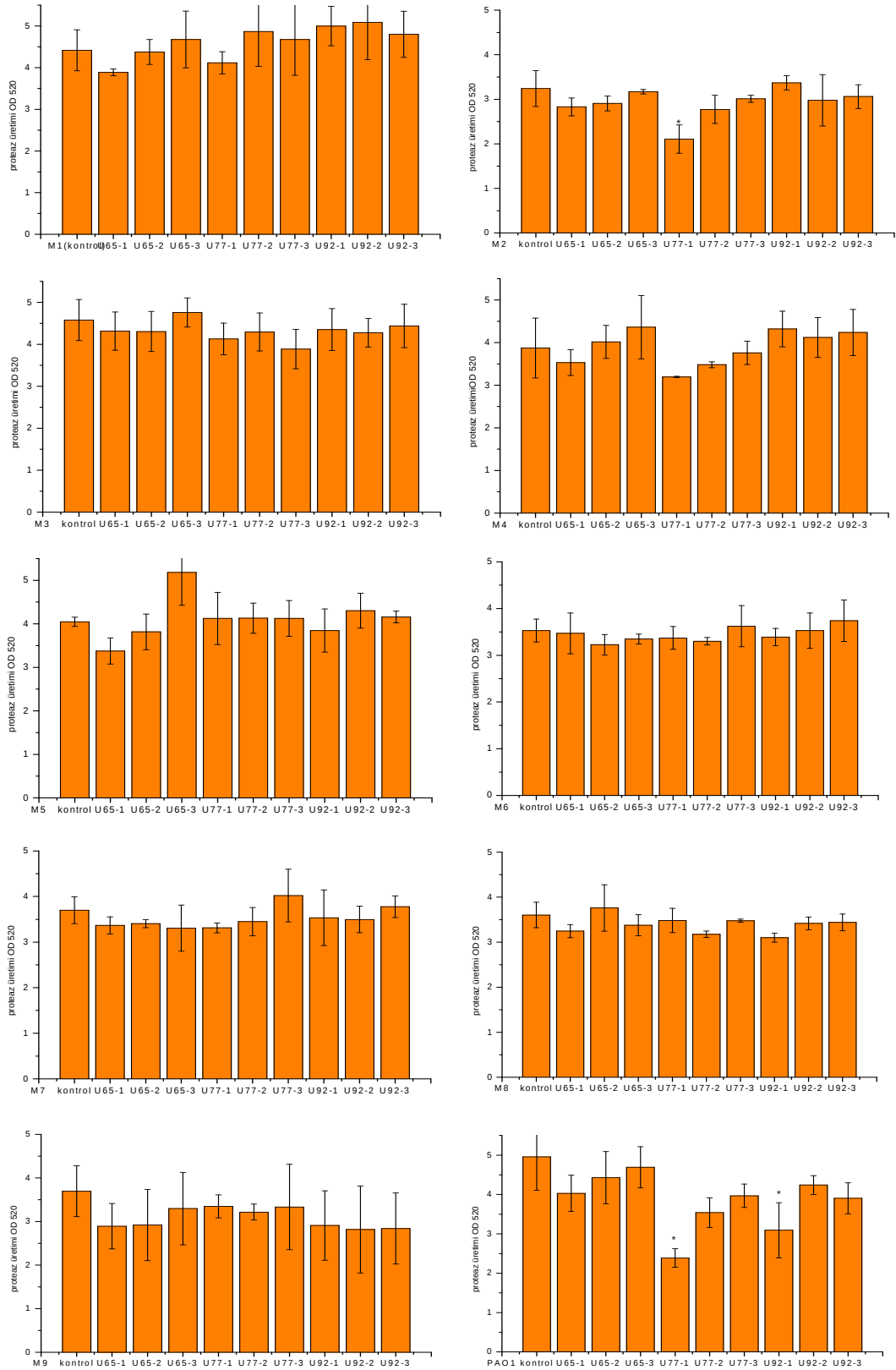
Şekil 4. 30. (A). PA0-JP2 negatif kontrol, (B). M7 klinik izolatı kayma hareketi

4.9. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Proteaz Üretimi Etkisi



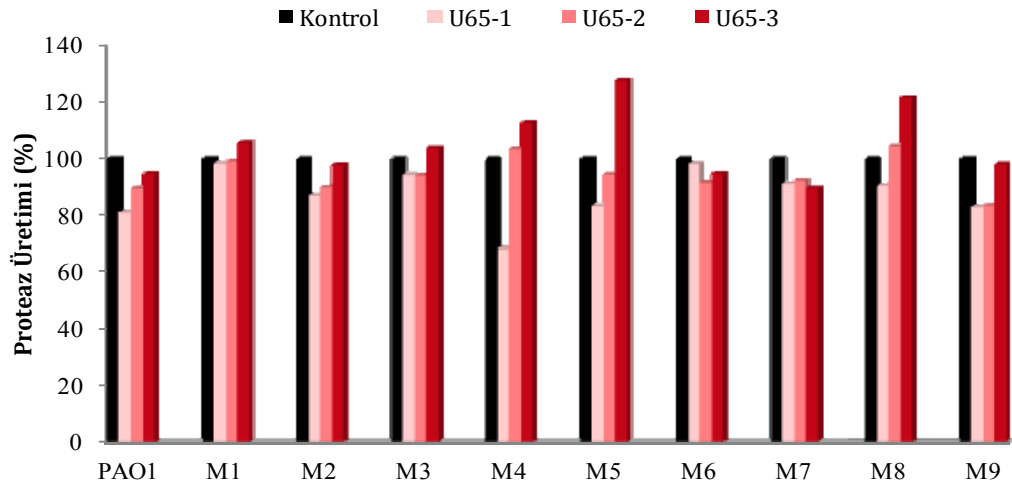
Şekil 4. 31. *P. aeruginosa* PA01 ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında proteaz üretimi (%)

P. aeruginosa PA01 suşunun proteolitik aktivitesi %100 olarak kabul edilerek diğer klinik izolatların proteolitik aktivitesi kıyaslandığında gösterdikleri aktivitenin % 71 ve % 92 oranında olduğu tespit edilmiştir.

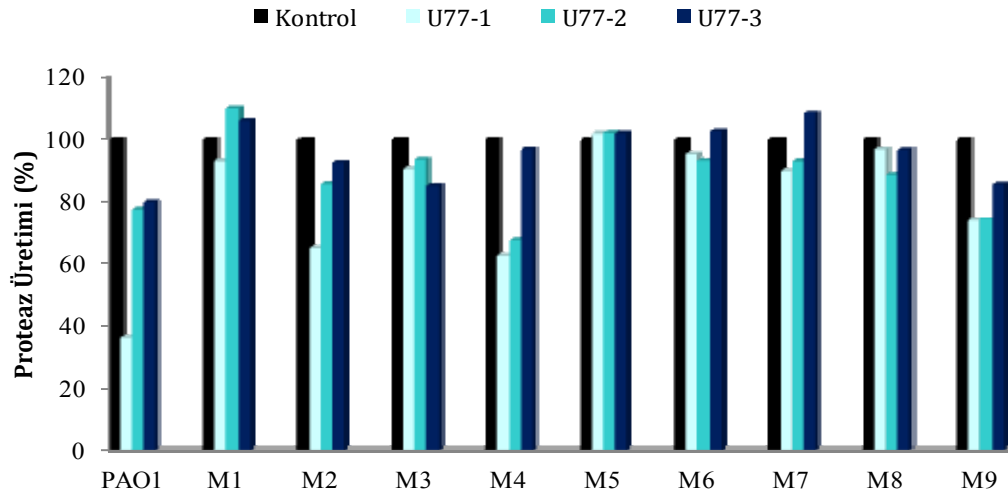


Şekil 4. 32. U65, U77, U92 nolu moleküllerin 1,5 mM derişimi için M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında ve PAO1 suşunda proteaz üretimine etkisi.

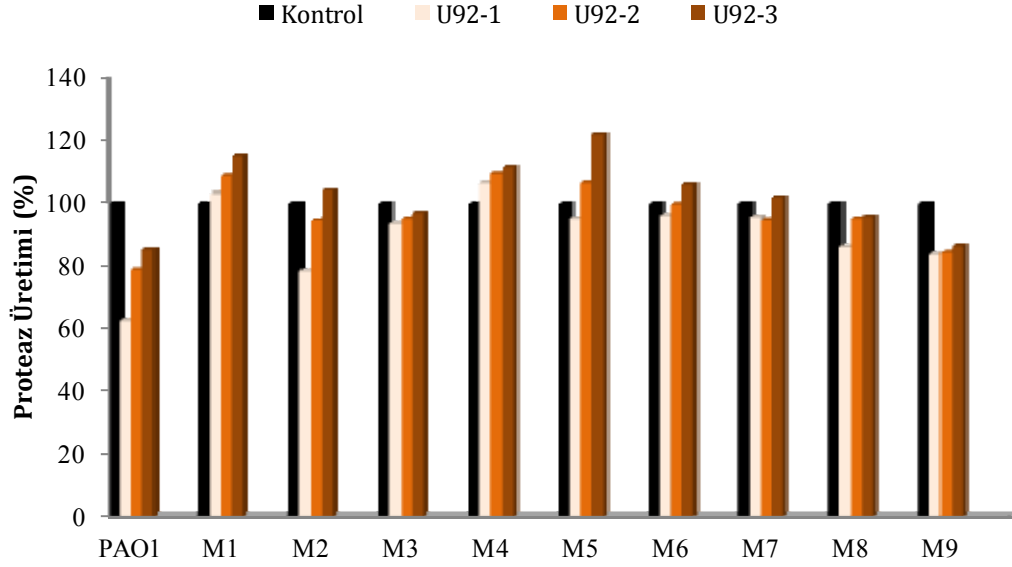
* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.



Şekil 4. 33. U92 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (%).



Şekil 4. 34. U77 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (%).



Şekil 4. 35. U92 Molekülünün 3 mM, 1,5 mM ve 0,75 mM derişimlerinin proteaz üretimi üzerine etkisi (%).

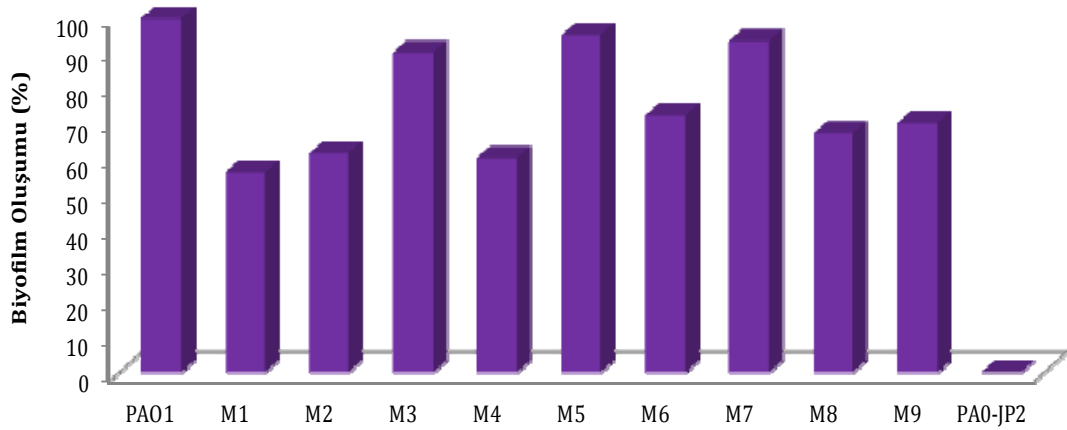
P. aeruginosa PA01 suşunda ve M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında görülen ve kontrolü çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen proteaz üretimi üzerine inhibitör adayları olarak tasarlanan U65, U77 ve U92 moleküllerinden; sadece U77 ve U92 moleküllerinin 3 mM derişimi PA01 suşu üzerinde inhibitör etki göstermiştir. U77 molekülünün 3 mM derişimde *P. aeruginosa* PA01 suşunda proteaz üretimine inhibisyon etkisi % 64 olarak tespit edilmiş ve bu sonuç istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4. 32).

U92 molekülünün 3 mM derişimde *P. aeruginosa* PA01 suşu üzerindeki inhibisyon yüzdesi ise % 38 olup bu oran istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4. 32).

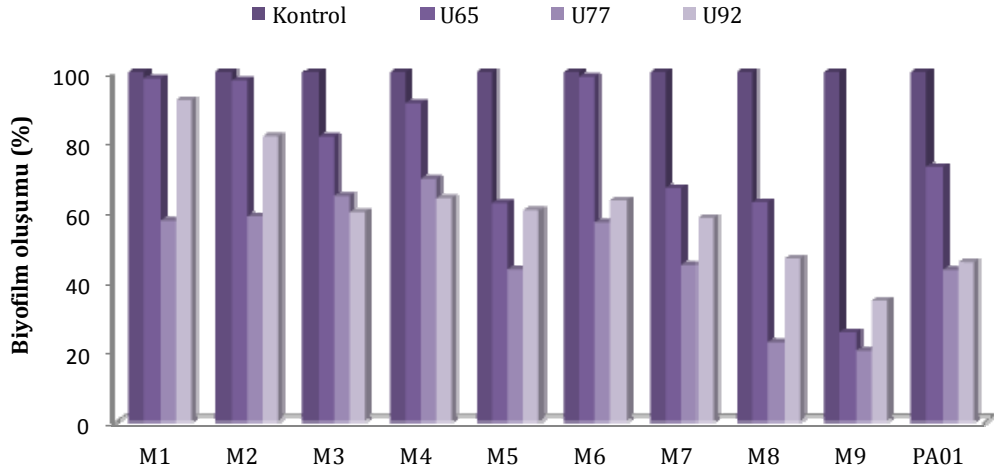
Diğer klinik izolatlar üzerinde U65, U77 ve U92 molekülünün 3 farklı derişiminin (3 mM, 1,5 mM, 0,75 mM) inhibisyon yüzdeleri % 0 ile % 28 arasında değişiklik göstermiş olup, bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı değildir (Şekil 4. 32).

4.10. U65, U77, U92 Moleküllerinin Bakteriyel Suşlardaki Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Biyofilm oluşumunu testi sonuçlarına göre çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5 M6, M7, M8, M9, klinik izolatlarının tamamının biyofilm oluşturma özelliğinin olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturma aktivitesi % 100 olarak kabul edilen *P. aeruginosa* PA01 ile kıyaslandığında ise en fazla biyofilm oluşturma yeteneğinin % 95 ile M5 klinik izolatında olduğu, bunu en yakın % 93 ile M7 izolatının takip ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca M3 klinik izolatının % 90, M6 klinik izolatının % 72, M9 klinik izolatının ise % 70 oranında biyofilm oluşturma özelliği görülmüştür. Bunları takiben M8 izolatının % 68, M2 izolatının % 62, M4 izolatının % 61 ve M1 izolatının % 57 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4. 36. *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında biyofilm oluşumu (%)



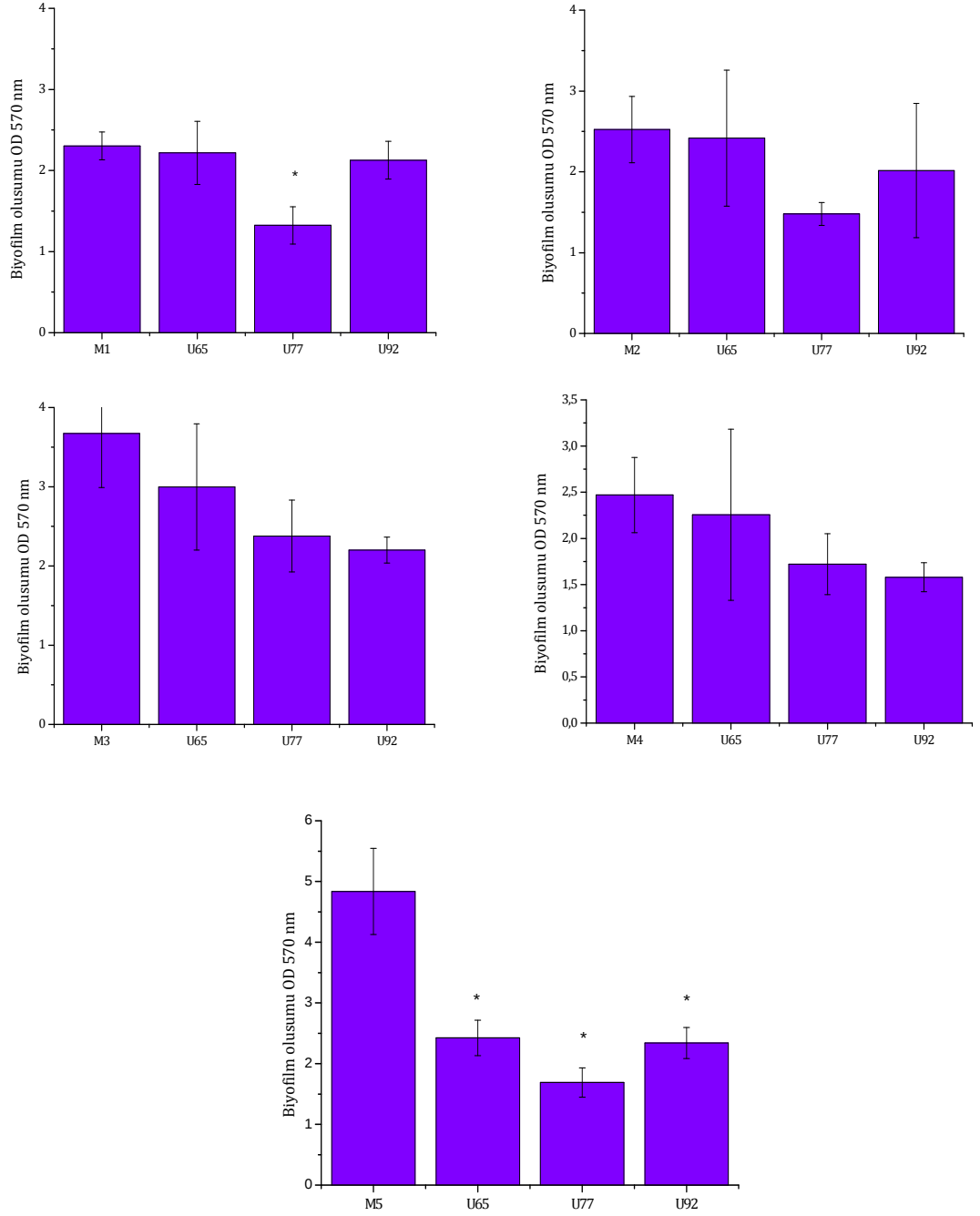
Şekil 4. 37. U65, U77, U92 Moleküllerinin 3 mM derişiminin, *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna etkisi (%)

P. aeruginosa PA01 ve *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna U65, U77, U92 moleküllerinin inhibitör etkisi üç molekülün 3 mM derişimlerinde araştırılmış ve U65 molekülünün M5 klinik izolatında % 50, M9 klinik izolatında ise % 74 inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen inhibisyon yüzdeleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). (Şekil 4.39, Şekil 4.40).

U77 molekülünün M2, M3, M4 klinik izolatlarında biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi % 9, % 27, % 33 olarak tespit edilmiş fakat bulunan inhibisyon yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer klinik izolatlarda görülen inhibisyon yüzdeleri ise, M1 % 43, M5 % 65, M6 % 43, M7 % 55, M8 % 77, M9 % 80 ve *P. aeruginosa* PA01 % 56 olarak tespit edilmiştir. M1, M5, M6, M7, M8, M9, *P. aeruginosa* PA01 da görülen inhibisyon yüzdeleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). (Şekil 4.39, Şekil 4.40).

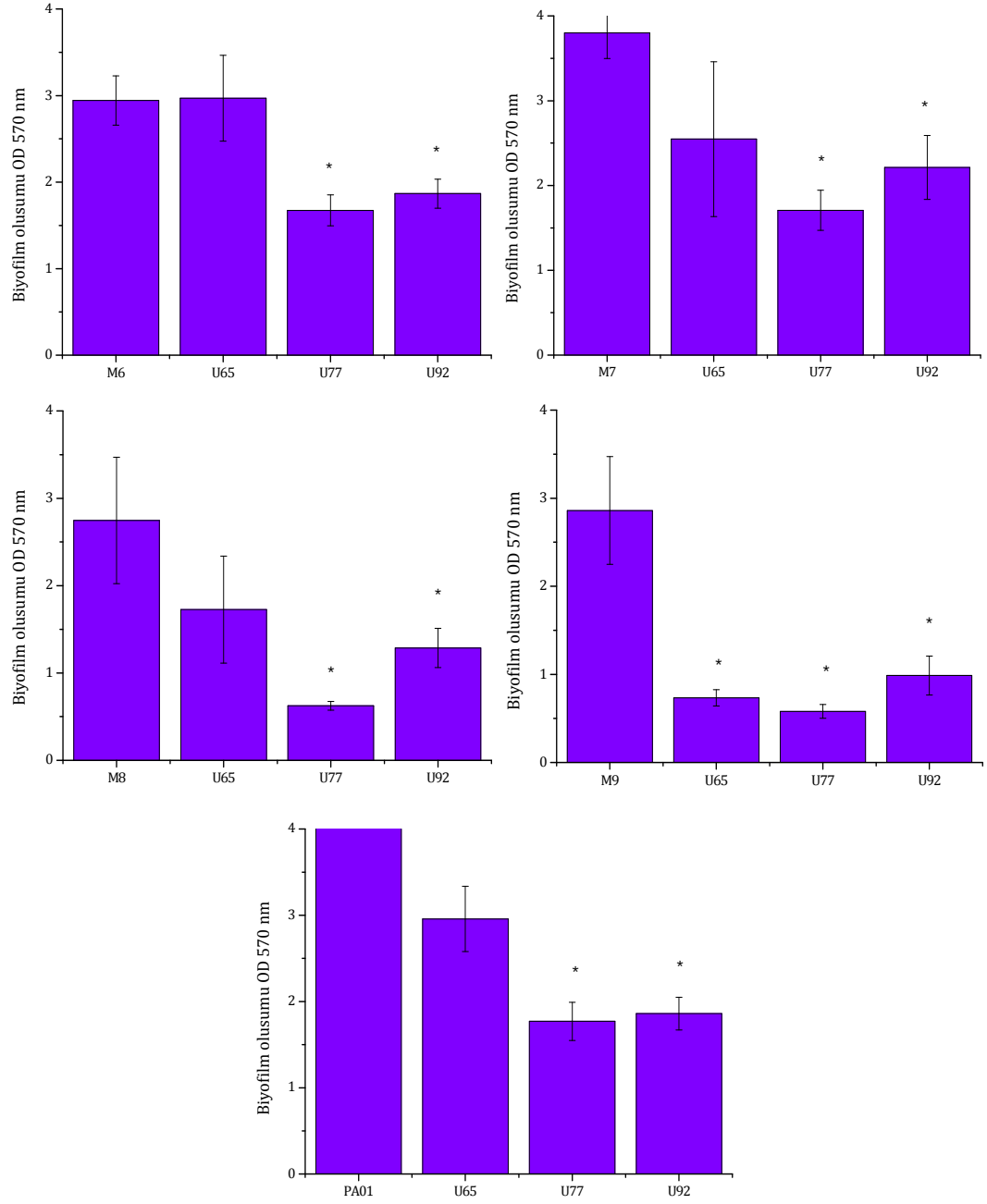
U92 molekülünün 3 mM derişiminin biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi M1, M2, M3 ve M4 suşlarında % 8, % 18, % 36, % 39 olarak tespit edilmiş ve bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. M5 klinik izolatında % 52, inhibisyon gözlenirken M6 klinik izolatında % 37, M7 klinik izolatında % 42, M8 klinik izolatında % 53, M9 klinik izolatında % 66 ve *P. aeruginosa* PA01 suşunda %

54 inhibisyon oranı gözlenmiştir. U92 molekülünün bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.40).



Şekil 4. 38. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3 mM derişimi için *P. aeruginosa* M1, M2, M3, M4, M5 klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.



Şekil 4. 39. U65, U77, U92 nolu kimyasalların (1):3 mM, derişimi için *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* M6, M7, M8, M9, klinik izolatlarında biyofilm oluşumuna etkisi.

* ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde önemlidir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakteriyel enfeksiyonlarda antibiyotikler ile gerçekleştirilen mücadele, bakterinin her geçen gün geliştirdiği mutasyonlar sonucu gösterdiği direnç sebebiyle gittikçe zor hale gelmekte ve mikroorganizmalarla mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir.

1970’li yıllarda ilk kez *V. fisheri*’de mikroorganizmaların sosyal bir davranış sergiledikleri birbirleri ile iletişim kurdukları, sinyal molekülleri olarak ifade edilen bazı moleküller aracılığı ile yeterli çoğunluğa ulaştıklarının farkına varabildikleri ve yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda da çeşitli fizyolojik işlemleri gerçekleştirebildiklerinin keşfi, daha sonraki çalışmalara ışık tutmuş ve patojen mikroorganizmalarda bu sistemin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. *V. fisheri*’de bu iletişim sonucu ortaya çıkan ışık üretimi herhangi bir tehdit unsuru olmazken patojen mikroorganizmalarda görülen virülans faktörlerinin bu sistem aracılığı ile sentezi enfeksiyon hastalıklarının oluşmasında insanlık için önemli bir tehdit unsurudur.

Patojen mikroorganizmalarda, hastalığın ortaya çıkmasında etkili olan virülens faktörlerinin, keşfedilen çevreyi algılama sisteminin kontrolü ile gerçekleştiğinin anlaşılması, patojen mikroorganizmalarla mücadelede bu sistemin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmaların yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Çünkü bakterilerin birçok antibiyotiği tanıyor olması ve her geçen gün farklı bir mekanizma ile direnç geliştirmesi bakterileri öldürmek yerine hastalık yapma yeteneklerinin baskılanarak bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede yeni ve etkili bir strateji olarak düşünülmektedir.

Bu amaçla çalışmamızda çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak tasarlanıp sentezlenen moleküllerin önemli bir fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa*’da çevreyi algılama sistemi kontrolünde üretilen elastaz, piyosiyanın, proteaz gibi virülens faktörleri ile kayma hareketi ve biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Yaptığımız çalışma kapsamına kan, balgam, idrar gibi örneklerden izole edilen 9 adet *P. aeruginosa* klinik izolatu ve standart suş olarak da *P. aeruginosa* PA01 suşu dahil

edilmiştir. Ayrıca klinik izolatlar ve *P. aeruginosa* PA01 suşunda, çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak tasarlanan ve U65, U77, U92 olarak adlandırılan moleküller de çalışma kapsamına dahil edilen diğer önemli bileşenlerdir.

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar bu sistemin inhibisyonunun AHL olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin sentezinin engellenmesi ile gerçekleştirilebileceğini, ya da sentezlenmiş bir AHL sinyal molekülünün yıkılması ile sistemin bloke edilebileceğini, üçüncü bir yaklaşım olarak da AHL reseptör proteininin sinyal molekülü ile kompleks oluşturmalarının engellenmesi ile gerçekleştirilebileceğini göstermişlerdir (Hentzer ve Givskov, 2003). AHL sinyal molekülünün sentezinin engellenmesine yönelik çalışmalar özellikle S-adenozil metiyonin analoglarının üretimi üzerine olmuştur. Çünkü S-adenozil metiyonin (SAM) AHL sinyal molekülü üretim reaksiyonunda sinyal molekülünün lakton halkasında amino verici olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle SAM'in analogları AHL sinyal molekülünün sentezinin önlenmesinde potansiyel olarak düşünülmüştür. Parsek vd. (1999), yaptıkları çalışmada SAM analogu S-adenozil-homosistein, S-adenozilsistein ve sinefungin moleküllerinin RhII aktivitesini inhibe ederek sinyal molekülünün sentezinin engellediğini tespit etmişlerdir. Tateda vd.(2001), ise bazı makrolit antibiyotiklerin büyümeyi engelleyen en düşük dozda kullanıldığında *P. aeruginosa* PA01 suşunda AHL sentezini baskıladığını görmüşlerdir.

Açıl homoserin lakton sinyal moleküllerinin yıkımı ya da yayılmasının engellenmesi üzerine yapılan çalışmalarda bazı bakteriler tarafından üretilen enzimlerin AHL sinyallerini indirgediklerinin keşfi oldukça dikkat çekici olmuştur. Dong vd. (2000) yaptıkları çalışmada *Bacillus* cinsi bakterinin ürettiği AiiA enziminin AHL hidrolizini gerçekleştirerek bitki patojeni *Erwinia carotovora*'nın sebep olduğu yumuşak kök hastalığı semptomlarının azaldığını gözlemlemişlerdir.

Çevreyi algılama sistemi ve bunun sonucu olarak virülens faktörlerinin üretiminin engellenmesinin üzerine doğal ve sentetik moleküllerle çok fazla çalışma yapılmış olup benzer bir çalışma Reimman, vd.,(2002) tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha önce çevreyi algılama sistemi inhibitörü olarak rapor edilen aiiA geninin homoloğu olan bir geni iki *Bacillus* sp türünde izole etmişler ve *P. aeruginosa* PA01suşunda

AHLsinyal molekülünün *aiiA* geninin homoloğu olan gen tarafından sentezlenen AHL laktonaz tarafından yıkılarak elastaz üretimini baskıladığını görmüşlerdir.

Açıl homoserin lakton molekülünün çevreyi algılama sistemi kontrolünde düzenlenen gen transkripsiyon mekanizmasının ön basamağı olan reseptör proteine bağlanmasının engellenmesi çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda geniş bir yer tutmakta ve bu sistem üzerine pek çok doğal ya da sentetik AHL molekülü ile rekabete girecek moleüller denenmekte ve sentezlenmektedir. AHL ile rekabete giren moleüller yapısal olarak AHL' ye benzemekte ve AHL bağlanma bölgesi olarak iş görerek aktivatör proteinin aktive olmasını engellemektedir. Bu amaçla sentezlenen AHL analogu moleüller açıl yan zincirinin modifikasyonları şeklinde oluşturulmaktadır.

Yapılan bu çalışmada öncelikle çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak tasarlanan 20 farklı benzimidazol türevi molekül farklı çözücülerde çözündürülmeye çalışılmış ve sadece 1,3-dihidro-2*H*-benzimidazol-2-on (U65), 5-metil-1,3-dihidro-2*H*-benzimidazol-2-on (U77) ve 1,3-Diasetil-1,3-dihidro-2*H*-benzimidazol-2-on (U92) moleülleri dimetil sülfoksitte (DMSO) çözülebilmıştır. U65, U77, U92 moleüllerinin daha sonra çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör etkisi Q_{SIS1} kullanılarak test edilmiştir. Ayrıca *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 suşları ile de inhibitör etkileri araştırılmıştır. Her iki yöntem birbirleri ile paralel sonuçlar vermiş ve U65, U77, U92 moleüllerinin çevreyi algılama sistemi üzerinde potansiyel inhibitör etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör etkisi olan U65, U77, U92 moleülleri doğal homoserin lakton molekülüne yapısal olarak benzeyen ve çevreyi algılama sistemi üzerinde inhibitör etki gösterme aktivitesine sahip 2(3*H*)-benzoksazon halkasının ve klorzoksazon'un (5-kloro-2(3*H*)-benzoksazon) biyoizosteri olarak sentezlenmiş moleüllerdir. 2(3*H*)-benzoksazon halkası, doğal homoserin lakton molekülüne yapısal olarak benzemekte, aralarındaki fark, kaynaşmış bir benzen halkası ve halkada azot atomunun bulunmasından kaynaklanmaktadır. Biyoizoster moleüller sentezlenirken değişen gruplar ya da atomlar hemen hemen aynı büyüklüktedir ve şekil, valans değeri ve aromatiklik gibi aynı özelliklere sahiptir. Bu çalışmada kullanılan ve homoserin lakton molekülünden

yola çıkarak sentezlenen moleküllerde, homoserin lakton molekülündeki oksijen yerine azot bulunmaktadır.

P. aeruginosa suşunun, çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında olan elastaz, proteaz enzim aktivitesi, piyosiyanın pigmenti ve kayma hareketi ile biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi test edilen moleküllerin inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla yapılacak testlerden önce, bakterilerde gelişimin baskılanmadığı derişimi hesaplayabilmek için MIK değerleri tespit edilerek büyüme gelişme eğrileri sonucunda uygun derişimleri saptanmıştır. 600 nm değerinde yapılan ölçüm sonuçlarına göre son konsantrasyonları her molekül için 3mM, 1,5mM, 0,75mM olacak şekilde ayarlanan derişimlerin bakteri hücre sayısında azalmaya sebep olmadığı gözlenmiştir.

Müh vd., (2006), çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak çok sayıda sentetik molekül denemişler ve bunlardan PD-12 ve V-06-018 olarak adlandırdıkları iki molekülü potansiyel inhibitör olarak bulmuşlardır. PD-12 molekülü 3OC12-HSL deki C12 alkil kuyruğuna tetrazol eklenmesi ile oluşturulmuş olup, ikinci molekül V-06-018 ise C12 alkil kuyruğuna fenil halkasının eklenmesi ile oluşturulmuştur. LasR tarafından düzenlenen virülens faktörlerinden elastaz ve piyosiyanın üretimine inhibitör etkilerini *P. aeruginosa* PA01 üzerinde araştırmışlar ve V-06-018 molekülü piyosiyanın pigment üretimi üzerinde % 90 inhibisyon gösterirken, PD-12'nin % 40 inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise *P. aeruginosa* PA01 suşunda piyosiyanın pigment üretimine U65 molekülünün 3 mM derişiminin % 69, U77 molekülünün %61 ve U92 molekülünün %49 inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *P. aeruginosa* PA01 suşunda elastaz üretimine U65 molekülü % 45, U77 molekülü ise % 40 inhibisyon etki göstermiştir. U92 molekülünün *P. aeruginosa* PA01 suşu üzerinde elastaz üretimine inhibisyon etkisi % 25 olarak tespit edilmiştir. Üç molekül için kullanılan 3 mM derişim bakterilerin gelişimi üzerinde inhibisyon etki göstermemiştir. Çevreyi algılama sistemi inhibisyonu üzerine yapılan araştırmalarda klinik izolatlarla yapılan çalışmalar çok az olup, birçok çalışmada inhibisyon etki sadece yabancıl tip olan *P. aeruginosa* PA01 suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hodgkinson vd., (2012) tarafından yapılan benzer bir çalışmada yeni sentezlenen AHL türevleri ile LasR çevreyi algılama sistemi inhibisyonu üzerine denemeler yapılmıştır. AHL moleküllerinin (BHL, OdDHL) baş ve kuyruk kısımlarında modifikasyonlar yaparak sentezledikleri AHL türevlerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunda piyosiyanın üretimi üzerine inhibisyonunu araştırmışlardır. Sonuçta sentezledikleri 15 kadar AHL türevinin iki tanesinde 200 µM derişimlerinde piyosiyanın pigment üretimi üzerine % 73 ve % 90 olmak üzere inhibisyon değerleri saptamışlar ve bu çalışmada da moleküllerin bakteri gelişimine baskılayıcı etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Çalışmada ayrıca bu iki molekülün *P. aeruginosa*'da elastaz üretimi üzerine inhibisyon etkisini araştırmışlar ve %34 ve % 63 oranında inhibisyon gözlemişlerdir.

Yapılan bu çalışmada ise AHL türevi olarak sentezlenen moleküllerden U65, U77 ve U92 moleküllerinin klinik izolatlardaki inhibisyon sonuçlarında elastaz üretim özelliği *P. aeruginosa* PA01 suşundan fazla olan M5 klinik izolatında U65 molekülü % 54 inhibisyona neden olurken, M9 klinik izolatında % 43 inhibisyona neden olmuş ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. U77 molekülü PA01 yanında M5 ve M9 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine 3 mM ve 1,5 mM derişimlerde anlamlı inhibisyon sonuçları göstermiştir. Bu sonuçlara göre U77; M5 klinik izolatının 3 mM ve 1,5 mM derişimlerinde sırasıyla % 54 ve % 34 inhibisyona sebep olmuştur. M9 klinik izolatında ise 3 mM ve 1,5 mM derişimlerinde sırasıyla % 46 ve % 34 inhibisyona neden olmuştur. U92 molekülü diğer iki moleküle benzer sonuçlar göstermiş ve M5, M9 klinik izolatlarında 3 mM ve 1,5 mM derişimlerinde anlamlı inhibisyon sonuçları vermiştir. Bu sonuçlara göre M5 klinik izolatında % 44 ve % 36 olan inhibisyon yüzdeleri, M9 klinik izolatında % 55 ve % 24 olarak tespit edilmiştir. İki klinik izolatta tespit edilen sonuçlar birbirine yakınlık gösterse de izole edildikleri vücut sıvıları birinde balgam iken diğerinde kandır. Aynı vücut dokularından elde edilen izolatlarda farklı şiddette virülens faktörlerinin üretildiği yapılan bazı çalışmalarla desteklenmektedir.

Elastaz üretimi üzerine inhibisyon etki, yapılan bir başka çalışmada azitromisin kullanılarak araştırılmış ve azitromisinin 2 µg'ının *P.aeruginosa* PA01 üzerinde elastaz üretimine % 65 civarında inhibisyona neden olduğu görülmüştür. Fakat bu inhibisyonun sinyal molekülü ile rekabete girerek değil azitromisinin sinyal

molekölü sentezini engelleyerek bu inhibisyonu gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Tateda vd., 2001).

Aynı etkiyi gösteren doğal bileşiklerle yapılan bir çalışmada elastaz üretimi üzerine inhibisyon etki *Canocarpus erectus*, *Callistemon viminalis* bitki ekstraktları ile çalışılmış ve *C. erectus*'un *P. aeruginosa* PA01 suşu üzerinde elastaz üretimine inhibisyon etkisi % 65, *C.viminalis*'in ise % 63 olarak tespit edilmiştir (Adonizio vd., 2007)

AHL analogu inhibitörlerin sentezi üzerinde yapılan çalışmaların çoğu farklı yollarla açıl yan zincirin modifikasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu çalışmalar göstermiştir ki yan zincirin uzunluğu inhibisyonda önemli rol oynamaktadır.

E. carotovora da çevreyi algılama sistemi inhibisyonu üzerine yapılan bir çalışmada kullanılan sentetik AHL analogunun açıl yan zincirinin uzunluğunun bir metil artırılması sonucu aktivitenin % 50 azaldığı 2 ünite uzatıldığı takdirde % 90 azaldığı gözlenmiştir. Bir metil ünitesi eksiltildiğinde ise % 10 azalma görüldüğü tespit edilmiştir (Hentzer ve Givskov, 2003).

Frei vd.,(2011), yaptıkları çalışmada bromogeliferin, 3-indolasetonitril ve resveratrol doğal molekülleri üzerinde yaptıkları modifikasyonlarla özellikle 2-aminobenzimidazol türevi moleküller sentezlemişlerdir. Sentezledikleri moleküllerden 2 tanesinde *P. aeruginosada* biyofilm oluşumu üzerine % 56 ve % 48 oranında inhibisyon tespit etmişlerdir. Sentezledikleri moleküllerden uzun zincirli türevlerde etkili bir inhibisyon sonucu gözlenmezken ana halka içeren moleküllerde inhibisyon görülmesi bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Malender vd.,(2009), yaptıkları benzer bir çalışmada ise doğal deniz ürünlerinin analogu moleküller tasarlamış ve özellikle 2-aminoimidazol (2-AI)'ün Gram negatif bakterilerde, 5-amido yada 5-imido-2-aminobenzimidazol (2-ABI) türevlerinin Gram pozitif bakterilerde antibiyofilm aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır.

Son yıllarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde biyofilm oluşumu önemli rol oynamakta ve nozokomiyal enfeksiyonlarda gittikçe artan morbitide ve mortaliteye sebep olmaktadır. Bakteriyel biyofilmler özellikle diş çürükleri,

osteomyelit, kistik fibroz gibi birçok enfeksiyondan sorumludur. Bakteriye biyofilmlerin planktonik hücrelerle kıyaslandığında antibiyotiklere karşı bin kat daha fazla toleranslı olması biyofilm kaynaklı enfeksiyonların ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu yönüyle biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda antibiyotiklerle tedavinin zor olması biyofilm oluşumunun engellenmesi, doğal olarak da biyofilm oluşumundan sorumlu olan çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur.

Sambanthamoorthy vd.(2011), yaptıkları çalışmada çevreyi algılama sistemi inhibitörü olarak tasarladıkları ve ABC-1(Antibiyofilm bileşiği-1), ABC-2 olarak adlandırdıkları benzimidazol türevi moleküllerin *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'ta biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkilerini araştırmışlar ve nanomolar seviyede biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini ve aynı zamanda bakteri gelişimini de baskılamadığını bulmuşlardır. ABC-1(5 metoksi-2-[(4- metil benzil)sülfanil]- 1H-benzimidazol) molekülü %95' varan biyofilm inhibisyon oranları göstermiş ve çalışmanın bir bölümünde medikal silikon kataterler üzerinde biyofilm oluşumunun inhibisyonunu araştırmışlardır. Sonuçta *P. aeruginosa* PA01 ile yaptıkları denemede ABC-1 in uygulanmadığı kataterlerde *P. aeruginosa* PA01'in güçlü biyofilm oluşumu gösterdiği, 100 µM ABC-1 varlığında ise biyofilm oluşumunu gözlenmediğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızın devamında anti biyofilm özelliği gösteren moleküllerin bu çalışmada kullanılan medikal materyallere yapılan denemelerin benzerinin yapılması da düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında *P. aeruginosa* PA01 suşu üzerinde U77 ve U92 moleküllerinin 3 mM derişimleri biyofilm oluşumuna % 56 ve % 54 inhibisyon etki göstermiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan klinik izolatların 5 tanesinde (M5, M6, M7, M8, M9) biyofilm oluşumu üzerine U77 ve U92 moleküllerinin 3 mM derişimde inhibisyon etkileri anlamlı bulunmuştur. Klinik izolatlarda görülen inhibisyon sonuçlarından U65 molekülünün sadece M9 üzerindeki % 74 inhibisyon oranı ile M5 klinik izolatındaki % 50 inhibisyon oranı anlamlı bulunmuştur.

U77 molekülü *P. aeruginosa* PA01 ile 6 adet klinik izolatta (M1, M5, M6, M7, M8, M9) anlamlı olarak değerlendirilen inhibisyonlara neden olmuştur. *P. aeruginosa* PA01' de % 56 inhibisyon gözlenirken, M9 klinik izolatında % 80 en yüksek

inhibisyon oranı gözlenmiş, bunu sırasıyla M8 izolatında % 77, M5 izolatında % 65, M7 izolatında % 55, M1 ve M6 izolatlarında ise % 43 oranındaki inhibisyon yüzdeleri takip etmiştir. Klinik izolatlar ve oluşturdıkları biyofilm özellikleri ve izole edildikleri yer açısından sonuçlar kıyaslandığında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

U92 molekülünün klinik izolatlarda biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi U77 molekülü ile paralellik göstermiştir. U92 molekülünün tespit edilen inhibisyon sonuçları % 37 ile % 66 arasında değişkenlik göstermiştir. En fazla inhibisyon % 66 ile M9 klinik izolatı üzerinde görülürken bunu sırasıyla, M8 % 53, M5 % 52, M7 % 42, M6 % 37 yüzde inhibisyon değerleri takip etmiştir. Bu sonuçlara göre U77 molekülü ile U92 molekülünün klinik izolatlarda biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi U65 molekülüne oranla daha fazla olmuştur.

Çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen kayma hareketinin inhibisyonu üzerine doğal ve doğal olmayan AHL analogları ile yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Krishan vd., (2012) karanfil bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının kayma hareketi üzerine inhibisyon etkisini araştırmışlar. Kloroform ve metanol ile hazırlanan ekstraktların kayma hareketi üzerine inhibisyon etkisini gözlemlemişlerdir. Karanfil ile yapılan bir başka çalışmada Khan vd. (2009), karanfil yağının *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşunda kayma hareketi üzerinde inhibitör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Kayma hareketi üzerine AHL analogları kullanılarak yapılan bir çalışmada ise; Morohoshi vd.,(2007), açıl yan zincir uzunluğu 4-12 arasında değişen *N*- açıl siklopentilamid (CnCPA) molekülleri sentezlemişler ve çalışmanın sonucunda C₉CPA molekülünün gram negatif bir bakteri olan *Serratia marcescens* de kayma hareketi ve biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etki gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca buldukları inhibisyon oranlarının halojenlenmiş furanonların gösterdiği inhibitör etkiden daha fazla olduğunu da rapor etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada kayma hareketi üzerine inhibisyon etkileri araştırılan U65, U77, U92 moleküllerinin test sonuçlarında *P. aeruginosa* PAO1 suşu ve klinik izolatlarında kayma hareketi üzerine dikkate değer inhibisyon yüzdeleri bulunmuştur.

Özellikle *P. aeruginosa* PA01 suşunda U65, U77, U92 molekülleri sırasıyla % 74, % 80, % 74 oranında önemli inhibisyon yüzdeleri göstermişlerdir. Kayma hareketi özelliğine sahip olmayan M7 dışında, moleküller sadece M3 ve M8 klinik izolatlarında inhibisyona neden olmazken diğer izolatlarda kayma hareketi üzerine inhibisyon etki göstermiş ve bu sonuçlar istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışma sırasında kullanılan toplam 9 adet *P. aeruginosa* klinik izolatının PCR yöntemiyle araştırılan çevreyi algılama sistemi genleri olan *lasI* (605 bp), *lasR* (725 bp), *rhlI* (625 bp), *rhlR* (730 bp) genlerinin 9 klinik izolatın tamamında mevcut olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu sonuçlara rağmen klinik izolatlar ve *P. aeruginosa* PA01 suşunda görülen virülens faktörleri üretimleri arasındaki farklılık yapılan bazı çalışmalarda da tespit edilmiş ve Hamood, vd.,(1996) yaptıkları çalışmada izolasyon bölgesi ne olursa olsun bazı *P. aeruginosa* izolatlarında elastaz üretiminin olmadığını, bazılarının daha düşük üretim gösterdiğini, bazılarının ise çok yüksek düzeylerde elastaz üretimi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu konu ile alakalı literatürde çok fazla çalışma olmasa da yapılan çalışmalar bizim elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir.

U65, U77, U92 moleküllerinin proteaz üretimine inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışma sonuçları ise diğer testlerle paralellik göstermemiş olup sadece *P. aeruginosa* PA01 suşu üzerinde U77 molekülünün sebep olduğu % 64'lük inhibisyon ile U92 molekülünün sebep olduğu % 38'lik inhibisyon istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur.

Çalışma kapsamında kullanılan klinik izolatların Gram negatif bakterilerde etkili olan 14 farklı antibiyotik ile yapılan antibiyotik hassasiyet test sonuçlarına göre izolatların büyük çoğunluğu antibiyotiklere duyarlı (S) profil sergilemiş sadece M3 klinik izolatı; Aztreonam, Kolistin ve Seftazidime dirençli (R) olarak bulunmuştur.

Yaptığımız tez çalışmasında bulunan sonuçlar, çevreyi algılama sistemi inhibisyon çalışmalarında en çok kullanılan kontrol suş mutant *P. aeruginosa* PA01suşu üzerinden özetlenecek olursa; U65 molekülünün 3 mM derişiminin PA01'deki elastaz üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 45, piyosiyanin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 69, kayma hareketi üzerine inhibisyon etkisi % 74 olarak tespit

edilmiş ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak biyofilm oluşumu U65 molekülünün gösterdiği % 27 inhibisyon oranı ile proteaz üretimi üzerine gösterdiği % 19 inhibisyon oranı istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır.

U77 molekülünün ise 3 mM derişiminin PA01'deki elastaz üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 37, piyosiyanin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 61, kayma hareketi üzerine inhibisyon etkisi % 80, biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi % 56 proteaz üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 64 olarak tespit edilmiş ve bulunan tüm inhibisyon yüzdeleri istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur.

U92 molekülünün 3 mM derişiminin PA01 deki elastaz üretimi üzerine inhibisyon etkisi ise % 25 olarak tespit edilmiştir. Diğer sonuçlar ise piyosiyanin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 50, kayma hareketi üzerine inhibisyon etkisi %74, biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi % 54 proteaz üretimi üzerine inhibisyon etkisi % 38 olarak tespit edilmiş ve bulunan inhibisyon yüzdeleri elastaz üretimi üzerinde görülen % 25 lik oran dışında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurularak PA01 tarafından üretilen virülens faktörlerinin inhibisyonu üzerine U77 molekülünün elastaz, piyosiyanin, proteaz üretimi ile, kayma hareketi ve biyofilm oluşumu üzerinde anlamlı inhibisyon sonuçlarına sebep olduğu görülmektedir. Diğer iki molekülde de benzer sonuçlar bulunmuş olup, sonuçlar açısından aralarında çok büyük farklılıkların olmadığı görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda bu üç molekülün in vivo çalışmalarla desteklenmesi, toksisite özelliklerinin belirlenmesi ya da farklı bakterilerde çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen fizyolojik olayların baskılanması çalışmalarında kullanılması düşünülebilir.

Sonuç olarak yaptığımız tez çalışması kapsamında çevreyi algılama sistemi üzerine inhibisyon etkisi tespit edilen benzimidazol türevi moleküller daha önce çevreyi algılama sistemi üzerinde inhibisyon aktivitesi rapor edilmemiş olup ilk kez tarafımızdan denenmiş ve sonuçları pozitif olarak gözlenmiştir. Bakterilerin her geçen gün antibiyotiklere gösterdikleri direnç ve özellikle bu direncin bakterilerde

görülen bazı mekanizmalar dışında biyofilmoluşumu ile de artıyor olması bakterilerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Biyofilm oluşumunun enfeksiyon hastalıkların % 80 inden sorumlu olması ve etkin bir tedavinin gerçekleştirilmesini engellemesi yapılan çalışmaları çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen biyofilm oluşumunun inhibisyonu üzerine yoğunlaştırmıştır. Özellikle *P. aeruginosa*'nın yapmış olduğu biyofilm akciğer enfeksiyonu olan hastalarda özellikle de kistik fibrozlu hastalarda ölümlere neden olmaktadır. Bunun yanında AIDS hastalarında, medikal implant uygulaması görülen hastalarda mortaliteyi arttırmaktadır. Doku veya organ işlevlerini yerine getirmek üzere insan vücuduna implante edilen cihazların uzun süre kullanımını etkileyen nedenlerin başında, biomalzemedan kaynaklanabilecek enfeksiyon olasılığı gelmekte ve bu enfeksiyonların nedeni, bakterilerin implante edilen cihazların yüzeyine tutunup üremeleri ve kolonize olarak biyofilm tabakası oluşturmalarıdır. Bu ciddi durum karşısında şimdiye kadar çevreyi algılama sistemi inhibisyonu üzerine yapılmış çok fazla çalışma bulunmakta ve sistem üzerine inhibisyon etki gözlemek üzere binlerce yüzbinlerce bitki ya da sentetik moleküller denenmektedir. Bu çalışma ile çevreyi algılama sistemi inhibitörü olduğu tespit edilen moleküllerin daha sonraki çalışmalarda yeni çevreyi algılama sistem inhibitör adaylarının sentezlenmesinde öncü olabileceği, klinik öneme sahip diğer patojen mikroorganizmalarda da etkili olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P., 1992. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochemical Journal*, 15, 997-1004.
- Bandara, M.B.K., Zhu, Hua., Sankaridurg, P.R., Willcox, M.D.P., 2006. Salicylic Acid Reduces the Production of Several Potential Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Microbial Keratitis IOVS, 47,10,4453-4459.
- Barbieri, J.T., Sun, J., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 152, 79-92
- Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion Microbiology*, 2, 582-587
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Rasmussen, T.B., et al. 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151, 3873–3880.
- Bjarnsholt, T., Gennip M.V., Jakobsen TH., Christensen L.D., Jensen P.Ø., Givskov M., 2010. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature Publishing Group*, 5(2), 282-293.
- Bratu, S., Gupta, J., Quale, J., 2006. Expression of the las and rhl quorum-sensing system in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* does not correlate with efflux pump expression or antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1250-1253.
- Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran S., Bycroft B.W., Chet, L., Williams P., 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Bacteriology*, 180, 4435-4441.
- Cody, W.L., Pritchett, C.L., Jones, A.K., Carterson, A.J., Jackson, D., Frisk, A., Wolfgang, M.C., Schurr, M.J., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Controls Cyanide Production in an AlgZ-Dependent Manner. *Bacteriology*, 191(9), 2993-3002
- Çepni, G., Gürel, F., 2011. Bitkilerden Elde Edilen Anti Quorum Sensing Bileşikleri ve Yeni İlaç Geliştirmedeki Potansiyelleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41(4), 131-138.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B.H., 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Apply Environment Microbiology*, 67(4), 1865-73.

- Devine, J.H., Shadel, G.S., Baldwin, T.O., 1989. Identification of the operator of the lux regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. Proceedings of the National Academy, 86, 5688-5692.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H., 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proceedings of the National Academy, 97, 3526–3531.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F. & Zhang, L. H., 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature, 411, 813–817.
- Donabedian, H., 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. Journal of Infection, 46, 207-214.
- Dur'an, N., Rettori, D., 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. World Journal of Microbiology & Biotechnonology, 14, 685-688
- Eberhard, A., 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. Journal of Bacteriology, 109, 1101-1105.
- Efros, L. S., Porai-Koshits, B.A., Farbenshtein, S.G., 1953. “Imidazole derivatives. XI. Condensation of phthalic anhydride with derivatives of benzimidazole” : Zhurnal Obshechi Khimii, 23, 1691-6.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., Crawford, I., 1990. Identification and Characterization of genes for a second anthranilate synthase in *P. aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. Journal of Bacteriology, 172, 884-900.
- Farrand, S. K. 1998. Conjugal plasmids and their transfer, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands. 199–233.
- Frezza, M., Soulere L, Deshayes C, Reverchon S, Guiliani N, Jerez C, Queneau Y *et al.* 2008. Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. Bioorganisms Medical Chemistry, 16, 3550–3556
- 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(2), 269-275.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2001. Regulation of gene expression by cell to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annual Review of Genetic, 35, 439–468.

- Fuqua, C., Greenberg, E.P., 2002. Listening In On Bacteria: Acyl-Homoserine Lactone Signalling. *Molecular Cell Biology*, 2, 683-695. Erişim tarihi:12.02.2013. http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n9/fig_tab/nrm907.
- Gambello, M.J., Iglewski, B.H., 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology*, 173, 3000-3009.
- Gambello, M.J., Kaye, S., Iglewski, B.H., 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and Immunity*, 61, 1180–1184.
- Gray, K., M. & Garey, J. R. 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* 147, 2379–2387.
- Greenberg, E.P., 1997. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*, 63, 371-377.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 995-980.
- Hartman, G., Wise, R., 1998. Quorum sensing: potential means of treating gram-negative infections? *Lancet*. PubMed. 351:848–849.[]
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, 14(11), 648-656.
- Hentzer, M., Givskov, M., 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1300-1307.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby, N., Givskov, M., 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO Journal*, 22 (15), 3803-3815.
- http 1: <http://www.microbelibrary.org>. Erişim tarihi: 11.01.2013
- http 2: <http://www.tumblr.com/tagged/euprymna>. Erişim tarihi: 11.01.2013
- Huang, J.J., Han J.I, Zhang, L.H, Leadbetter, J.R., 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonas and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 5941–5949.
- Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H., Kato, Junichi., 2007. Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N- Acyl Cyclopentylamides. *Applied Environmental Microbiology*, 3183-3188.

- Karaboz, İ., Sukatar, A., 2004. Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları), Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 2(5), 23-32.
- Karaman, M., Yılmaz, O., Bayrakal, V., Bahar, İ.H., 2010. Gentamisin Ve İmipenem Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Yanıtları Ve Biyofilm Üretimi: İn-Vivo Modelleme. ANKEM Dergisi, 24(2), 76-81.
- Kidwai, M., Saxena, S., Mohan, R., 2005. "A new method for the synthesis of heterocycles from o-phenylenediamine" : Journal of the Korean Chemical Society, 49(3), 288-291; 2005.
- Kym, P., 1907. "Some Condensations with Urea and Urea as a Means of Forming Ammonia Derivatives" : Journal fuer Praktische Chemie (Leipzig), 75, 323-27.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, Simon., Bycroft Gordon, B.W. Stewart. S.A.B and Williams, P., 1997. Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Journal of Medical Microbiology, 143(12), 3703-3711.
- McGowan, S., Sebaihia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P.F., Bycroft, B., Stewart, G.S., Williams, P., Salmond, G.P., 1995. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. Microbiology, 141(5), 55-41-550.
- Karatuna, O., Yağcı, A., 2008. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 38, 42-51.
- Kempner, E. S., Hanson F. E., 1968. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. Journal of Bacteriology, 95, 975-979.
- Krishan, T., Yin, W.F., C, K.G., 2012. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Ayurveda Spice Clove (*Syzygium Aromaticum*) Bud Extract. Sensors, 12, 4016-4030.
- Kohler, Thilo., Curty, L.K., Barja, F., Delden C.V., Pecher, J.C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. Journal Of Bacteriology, 182(21), 5990-5996.
- Lazazzera, BA., Grossman, A.D., 1998. The ins and outs of peptide signalling. Trends Microbiol, 6, 288-294.
- Lerat, E., Moran, N.A., 2004. The Evolutionary History of Quorum Sensing Systems in Bacteria. Molecular Biology and Evolution, 21(5), 903-913.
- Lilley, BN., Bassler, BL., 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma. Molecular Microbiology, 36(4), 940-54.

- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Speert, D. P., 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 62, 596-605
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., et al., 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein *Microbiology*, 145, 283-291.
- McGowan, S., Sebahia, M., O'Leary, S., Hardie, K.R., Williams, P., Stewart, G.S.A.B., Bycroft, B.W., Salmond, G.P.C., 1997. Analysis of the carbapenem gene cluster of *Erwinia carotovora*: definition of the antibiotic biosynthetic genes and evidence for a novel β -lactam resistance mechanism. *Molecular Microbiology*, 26, 545-556.
- Midani, S., Rathore, M., 1998. *Chromobacterium violaceum* infection. *The Journal of Southern Medical*, 91, 464-466.
- Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K., Bassler, B.L., 2002. Parallel Quorum Sensing Systems Converge to Regulate Virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110 (3), 303-314. Erişim tarihi: 14.02.2013. <http://www.cell.com/retrieve/pii/S0092867402008292?cc=y>
- Milton, D., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, M., Williams, P., 2001. The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-Hydroxyhexanoyl) homoserine Lactone and N-Hexanoylhomoserine Lactone. *J Bacteriol*, 183, 3537-3547.
- Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, J., Ikeda, T., 2007. Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone. *Applied and Environmental Microbiology*, 6339-6344.
- Monroe, D., 2007. "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" *PLoS Biology*, 5, 11. Erişim tarihi. 14.02.2013. <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0050307>
- Müh, U., Schuster, M., Heim, R., Singh, A., Olson, E.R., Greenberg, E. P., 2006. Novel *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors Identified in an Ultra-High-Throughput Screen. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 50(11), 3674-3679.
- Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *Journal of Bacteriology*, 104, 313-322.
- Nicas, T., Bradley, I., Lochner, J. E., Iglewski, B. H., 1985. The role of exoenzyme S in infections with *P. aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 152, 716-721.

- 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.
- Olson, ME., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, AG., Read, RR., 2002. "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics". *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L, Cronan, J.E., Greenberg, E.P., 1999. Acyl homoserine lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy*, 96, 4360–4365.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P, Seed, P.C, Iglewski, B.H., 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179, 3127-3132.
- Piper, K.R., Farrand, SK.,2000. Quorum Sensing but Not Autoinduction of Ti Plasmid Conjugal Transfer Requires Control by the Opine Regulon and the Antiactivator TraM. *Journal Of Bacteriology*, 182 (4), 1080–1088 No. 4
- Piper, KR., Beck, VB., Hwang, S., Farrand, S.K.,1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol*, 32(5): 1077-1089.
- Praneenararat T., Beary T.M.J. , Breitbach, AS. , Blackwel H.E., 2011. Synthesis and application of an N-acylated L-homoserine lactone derivatized affinity matrix for the isolation of quorum sensing signal receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(17), 5054–5057. Erişim tarihi: 13.03.2013. <http://europepmc.org/abstract/MED/21592793/reload=0;jsessionid=4dla7yDhE7fYnLzycHFP.16>.
- Prince, A., 1992. Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microbial Pathogenesis*, 13(4), 251–260.
- Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., Terleckyj, O. D., Young, J. M., 2005. Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 417-423.
- Rasmussen, TB., Bjarnsholt, T., Skindersoe, ME.,Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kôte, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M., 2005. Screening for Quorum Sensing Inhibitors (QSI) by use of a Novel Genetic System, the QSI Selector. *Journal of Bacteriology*, 187, 1799-1814.

- Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., Défago, G., Haas, D., 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 148 (4), 923-932.
- Schaber J. A., Carty N. L., McDonald N. A., Graham E. D., Cheluvappa R., Griswold J. A., Hamood A. N., 2004. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 841–853.
- Scharmann, W., 1976. Cytotoxic Effects of Leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on Polymorphonuclear Leukocytes from Cattle. *Infection And Immunity*, 13 (3), 836-843
- Shankar, S., Ye, R., Schlichtman, D., Chakrabarty, A.M. 1995. Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* : enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol*, 70, 221–255.
- Shih, P.C., Huang, C.T., 2002. Effect of quorum sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 309-314.
- Smith, R.S., Iglewski, B.H., 2003. *P. aeruginosa* quorum –sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 56-60.
- Song, Z., Konga, K.F., Wub, H., Maricicc, N., Ramalingama, B., Priestapa, H., Schneperc, L., Quirkeb, J.M.E., Høiby, N., Matheea, K., 2010. Panax ginseng has anti-infective activity against opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing, a bacterial communication process critical for establishing infection. *Phytomedicine*, 17, 1040–1046.
- Şenyürek, I., Döring, G., Kalbacher, H., Deeg, M., Peschel, A., Wolz, C., Schitte, B., 2009. Resistance to dermcidin-derived peptides is independent of bacterial protease activity. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34, 86–90.
- Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B., Prince, A., 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infection and Immunity*, 64 (1), 37-43.
- Tateda, K., Matsumoto, T., Miyazaki, S., Yamaguchi K., 1999. Efficacy of β -lactam antibiotics combined with gentamicin against penicillin-resistant pneumococcal pneumonia in CBA/J mice *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 367–371
- Tateda, K., 2001. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 45, 1930–1933.

- Tınaz, B.G., Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria., 2003. Turk Journal Biology. 277; 85-93.
- Truchado, P., Galvez, F.L., Gil, M.I., Barberan, F.A.T., Allende, A., 2009. Quorum Sensing Inhibitory and Antimicrobial Activities of Honeys and the Relationship with Individual Phenolics. Food Chemistry, 01-065.
- Tunalı, Y.Y., Aksöz, N., 2005. Bakteriyel Kaynaklardan Elastaz Enziminin Üretilmesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3(4), 28-29.
- Wick, M. J., Hamood, A.N., Iglewski, B. H., 1990. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Molecular Microbiology., 4 (4), 527-535.
- Winson, M. K., Cámara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B., Williams, P., 1995. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy, 92, 9427–9431.
- Yu, D., Zhao, L., Xue, T., Sun, B., 2012. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an *icaR*-dependent manner. BMC Microbiology, 5(12), 288.
- Zhu, H., Thuruthyl, S.J., Willcox, M.D.P., 2002. Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. Journal of Medical Microbiology, 51, 1063–1070

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ebru ÖNEM

Doğum Yeri ve Yılı : Ankara, 1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ebruonem@sdu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise : Mersin 19 Mayıs Süper Lisesi, 1998

Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

Mesleki Deneyim

SDÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi 2000-2005

SDÜ Sağlık Hizmetleri MYO 2008-(halen)

Yayınları

Akçam, F.Z., Bosgelmez-Tinaz, G., Kaya, O., Tigli, A., Ture, E., Hosoglu, S. (2009). Evaluation of the methicillin resistance by the cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in the mecA positive *Staphylococcus aureus*, and compare mecA with femA, femB, femX positivities. Microbiological Research, 164 (4), 400-403

Önem., E, Ulusoy.,S, Boşgelmez-Tinaz.,G, DüNDAR.,Y. Benzimidazol Türevi Moleküllerin Bakteriyel İletişim Üzerine İnhibitör Etkileri. XXXV Türk Mikrobiyoloji Kongresi.3-7 Kasım 2012. S:376

