

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

**BAZI BORONİK ASİT TÜREVLERİNİN
Pseudomonas aeruginosa'da VİRÜLENS FAKTÖRLERİNİN
ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ramadan Bilgin AKALIN

**Danışman
Doç. Dr. Seyhan ULUSOY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2014**

© 2014 [Ramadan Bilgin AKALIN]

TEZ ONAYI

Ramadan Bilgin AKALIN tarafından hazırlanan "**Bazı Boronik Asit Türevlerinin *Pseudomonas aeruginosa*'da Virülens Faktörlerinin Üretimine Etkisinin Araştırılması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Doç. Dr. Seyhan ULUSOY**

 Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Fatma GÜRBÜZ**

 Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyesi **Yrd. Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY**

 Süleyman Demirel Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Prof.Dr.Ahmet ŞAHİNER**

TAAHHÜTNAME

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

Ramadan Bilgin AKALIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Çevreyi Algılama Sistemi (Quorum Sensing).....	4
2.1.1. Gram negatif bakterilerde görülen AHL aracılı (LuxI/LuxR Tipi) çevreyi algılama sistemi	6
2.1.2. Çevreyi algılama sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri	9
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın genel özellikleri.....	10
2.2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın epidemiyolojik özellikleri.....	12
2.2.3. <i>P. aeruginosa</i> enfeksiyonlarının patogenezi	13
2.2.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virülens faktörleri	13
2.2.5. Biyofilm oluşturma.....	16
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve Çevreyi Algılama Sistemi.....	17
2.4. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitörleri	19
2.5. Quorum Sensing Sisteminin İnhibisyon Mekanizması	21
2.5.1. AHL sentezinin engellenmesi.....	22
2.5.2. AHL sinyal molekülünün yıkılması	22
2.5.3. AHL sinyal molekülünün alınmasının önlenmesi.....	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	24
3.1. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Yapıları.....	24
3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları.....	26
3.3. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özelliklerinin Test edilmesi.....	28
3.3.1. QSI1 (QS için seçici suş 1) Testi.....	28
3.3.2. Çalışılan boronik asit türevi moleküllerin <i>Chromobacterium violaceum</i> 'da viyolasin üretimine etkisi	29

3.4. Çalışılan Boronik Asit türevi Moleküllerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MİK)	29
3.5. Büyüme ve Gelişme Eğrileri.....	30
3.6. Virülens Faktörleri Üretim Testleri	31
3.6.1. Elastaz testi	31
3.6.2. Piyosiyanın testi.....	31
3.7. Biyofilm Testi	32
3.8. Kayma Hareketi Testi.....	33
3.9. Verilerin Değerlendirilmesi	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
4.1. Boronik Asit Türevi Moleküllerinin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özellikleri.....	34
4.1.1. QSI1(QS için seçici suş 1) test bulguları	34
4.1.2. Çalışılan boronik asit türevi moleküllerin <i>C. violaceum</i> 'da viyolasin üretimine etkisi	34
4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenen Örnekler	35
4.3. Gelişme Eğrileri	36
4.4. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Elastaz Üretimine Etkisi.....	40
4.5. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Piyosiyanın Üretimine Etkisi	43
4.6. Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Biyofilm Oluşturulmasına Etkisi.....	46
4.7. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Kayma Hareketine Etkisi	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	56
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BORONİK ASİT TÜREVLERİNİN *Pseudomonas aeruginosa*'da VİRÜLENS FAKTÖRLERİNİN ÜRETİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ramadan Bilgin AKALIN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Seyhan ULUSOY

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, *Pseudomonas aeruginosa*'da üretimi çevreyi algılama (QS) sistemi tarafından düzenlenen virülens faktörleri üzerine boronik asit türevi moleküllerin potansiyel inhibitör etkisinin araştırılmasıdır.

Yöntem ve Bulgular: 2-Nitrofenilboronik asit (2-NFBA), 4-Bromofenilboronik asit (4-BFBA), 4-Klorofenilboronik asit (4-KFBA), 4-Fluorofenilboronik asit (4-FLFBA), 4-Formilfenilboronik asit (4-FFBA), 4-Metoksifenilboronik asit (4-MFBA), Metilboronik asit (MBA) ve Fenilboronik asit (FBA) moleküllerinin, potansiyel QS inhibitör etkileri QS inhibitor seçici suş 1 (QSI1) incelenmiştir. Potansiyel inhibitör olduğu tespit edilen moleküllerin QS üzerine etkileri, *Chromobacterium violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 biyosensör suşları kullanılarak test edilmiştir. Ayrıca bu moleküllerin *P. aeruginosa* PA01 suşu, *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK04 izolatlarında elastaz ve piyosiyanın üretimi, biyofilm oluşumu ve kayma hareketi üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda QS inhibitörü olarak en aktif molekülün 4-BFBA olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: 2-NFBA, 4-BFBA, 4-KFBA ve 4-FLFBA moleküllerinin viyolasin, elastaz ve piyosiyanın üretimini, kayma hareketi ve biyofilm oluşumunu önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. İnhibitör etkisi en yüksek olan 4-BFBA molekülünün, *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* PAK01, PAK02, PAK04 klinik izolatlarında sırasıyla elastaz üretimini % 44-73, piyosiyanın üretimini %54-74, biyofilm oluşumunu %18-39 kayma hareketini %34-88 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir.

Çalışmanın Önemi: Bu çalışmanın sonuçları *P. aeruginosa* virülensini azaltmak için boronik asit moleküllerinin potansiyel etkinliklerini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, çevreyi algılama sistemi, boronik asit

2014, 71 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME BORONIC ACID DERIVATIVES ON VIRULENCE FACTOR PRODUCTION OF *Pseudomonas aeruginosa*

Ramadan Bilgin AKALIN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Seyhan ULUSOY

Objective: The aim of this study was to investigate the potential inhibitory effect of the boronic acid molecules on the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* regulated by the quorum sensing (QS) system.

Method and Findings: QS inhibitor selector strain1 (QSI1) was used as the first screen to evaluate the potential QS inhibitory effect of boronic acid molecules 2-Nitrophenylboronic acid (2-NPBA), 4-Bromophenylboronic acid (4-BPBA), 4-Chlorophenylboronic acid (4-CPBA), 4-Fluorophenylboronic acid (4-FLPBA), 4-Formylphenylboronic acid (4-FPBA), 4-Methoxyphenylboronic acid (4-MPBA), Methylboronic acid (MBA) and Phenylboronic acid (PBA). We have tested boronic acid molecules as quorum sensing inhibitor by using *Chromobacterium violaceum* CV026 and *C. violaceum* VIR07 as biosensor strains. And QS inhibitory activity of the chosen substances further investigated on elastase, pyocyanin production, biofilm formation and swarming motility in *P. aeruginosa* PA01 strain, *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa*, PAK02, *P. aeruginosa* PAK04 isolates. Our results have demonstrated that the most active molecule was 4-BPBA as a QS inhibitor.

Conclusion: 2-NPBA, 4-BPBA, 4-CPBA and 4-FLPBA caused a significant inhibition of violacein, elastase and pyocyanin production, swarming motility and biofilm formation. The most active molecule was 4-BPBA caused a substantial decrease in elastase production (44-73% decrease), in pyocyanin production (54-74% decrease), in biofilm formation (18-39% decrease) and in swarming motility (34-88% decrease) in *P. aeruginosa*.

Significance of the Study: The results of this study highlight the potential effectiveness of boronic acid molecules in attenuating the virulence of *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, boronic acid

2014, 71 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinin imkânlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen Sayın Müdürümüz Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a ve karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNEM ve Yük. Fizikçi Neslihan KAYA KINAYTÜRK'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışma arkadaşlarım sevgili Halime ÇEVİKBAŞ, Erdi DOĞRU, Kübra ÇEVİK, Pınar OLGUNSOY ve Burak KÜÇÜKİĞCI'ye destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

3541-YL1-13 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.

Ramadan Bilgin AKALIN
ISPARTA, 2014

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kalamar balığının ışık organında meydana gelen biyoışma faaliyeti	5
Şekil 2.2. <i>Vibrio fischeri</i> 'de yüksek hücre yoğunluğunda farkedilebilir biyoışma faaliyetinin gerçekleşmesi	6
Şekil 2.3. <i>V. fischeri</i> 'de luxI geninin ürettiği N-(3-okzohekzanoyil)-L-homoserin lakton (OHHL) sinyal molekülü.....	7
Şekil 2.4. <i>V. fischeri</i> 'de LuxI/LuxR quorum sensing sistemi	8
Şekil 2.5. <i>P. aeruginosa</i> 'nın morfolojik yapısı	11
Şekil 2.6. Biyofilm oluşum basamakları; 1-Yüzeğe tutunma, 2-Geri dönüşümsüz tutunma, 3-Olgunlaşma fazı-1, 4-Olgunlaşma fazı-2, 5-Ayrılma, kopma	17
Şekil 3.1. Elastaz testinde süpernatantların mikropalakadaki görüntüsü.....	31
Şekil 3.2. Ekstrakte edilen piyosiyenin mikropalakadaki görüntüsü	32
Şekil 4.1. Boronik asit türevi moleküller (0,1 M) için QGIS1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü (1) 2-NFBA, (2) 4-BFBA, (3) 4-KFBA, (4) 4-FLFBA, (5) 4-FFBA, (6) 4-MFBA, (7) MBA, (8) FBA ve pozitif kontrol (K) Patulin.....	34
Şekil 4.2. (1) 2-NFBA, (2) 4-BFBA, (3) 4-KFBA, (4) 4-FLFBA, (5) 4-FFBA, (6) 4-MFBA, (7) MBA, (8) FBA moleküllerinin <i>C. violaceum</i> CV 026'da pigment üretimine etkisinin agar üzerindeki görüntüsü (K) Patulin	35
Şekil 4.3. Çalışılan boronik asit türevi moleküllerin <i>P.aeruginosa</i> PA01 suşunun gelişimi üzerine etkisi. a) 2-NFBA, b) 4-BFBA, c) 4-KFBA, d) 4-FLFBA, e) 4-FFBA, f) 4-MFBA, g) MBA, h) FBA.....	40
Şekil 4.4. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunun elastaz üretimi.....	41
Şekil 4.5. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 izolatının elastaz üretimi	42
Şekil 4.6. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 izolatının elastaz üretimi	42
Şekil 4.7. <i>P. aeruginosa</i> PAK04 izolatının elastaz üretimi	43
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunun piyosiyenin üretimi	44
Şekil 4.9. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 izolatının piyosiyenin üretimi	45
Şekil 4.10. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 izolatının piyosiyenin üretimi.....	45
Şekil 4.11. <i>P. aeruginosa</i> PAK04 izolatının piyosiyenin üretimi.....	46
Şekil 4.12. <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunun biyofilm oluşumu	47
Şekil 4.13. <i>P. aeruginosa</i> PAK01 izolatının biyofilm oluşumu	48
Şekil 4.14. <i>P. aeruginosa</i> PAK02 izolatının biyofilm oluşumu	48
Şekil 4.15. <i>P. aeruginosa</i> PAK04 izolatının biyofilm oluşumu	49
Şekil 4.16. a) <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunun kayma hareketi petri görüntüleri b) <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşunun kayma hareketi	51
Şekil 4.17. a) <i>P. aeruginosa</i> PAK01 izolatının kayma hareketi petri görüntüleri b) <i>P. aeruginosa</i> PAK01 izolatının kayma hareketi.....	52
Şekil 4.18. a) <i>P. aeruginosa</i> PAK02 izolatının kayma hareketi petri görüntüleri b) <i>P. aeruginosa</i> PAK02 izolatının kayma hareketi.....	54
Şekil 4.19. a) <i>P. aeruginosa</i> PAK04 izolatının kayma hareketi petri görüntüleri b) <i>P. aeruginosa</i> PAK04 izolatının kayma hareketi.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Çevreyi algılama sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri.....	9
Çizelge 3.1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Seçilen Moleküller	24
Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan bakteri suşları ve özellikleri.....	27

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHL	Açıl homoserin lakton
BHL	N-butanoyil-L-homoserin lakton
C4-HSL	N-butanoyil-L-homoserin lakton
ECR	Elastin Kongo Red
HHL	N-hekzanoyil-L-homoserin lakton
LB	Luria-Broth
M	Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
OdDHL	N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton
QS	Quorum Sensing
tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
X-gal	5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid
μ l	mikrolitre

1. GİRİŞ

Bakteriler gelişip bölünerek çoğalan ve ürettikleri özel sinyal molekülleri ile ortama uyum sağlayabilen tek hücreli organizmalardır. Bakteriler tek bir hücre olarak yaşamlarını devam ettirebilmelerine rağmen, virülens faktörlerinin üretimi, biyofilm oluşturma, biyoışma faaliyetinin gerçekleştirilmesi, gibi birlikte hareket etmeği gerektiren faaliyetleri gerçekleştirmek için diğer bakterilerle birlikte koordineli olarak çalışmaları gerekir (Solano vd., 2014). Çevreyi algılama/Çoğunluğu algılama (QS) olarak bilinen haberleşme sistemi yardımıyla pek çok mikroorganizma topluluk halinde gerçekleştirilmesi gereken faaliyetleri düzenlerler (Ni vd., 2009).

Bakterilerde hücreler arası iletişim otoindükleyici denilen hücre dışı sinyal moleküllerinin alışverişi yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu işlem bakteri popülasyonlarının gen ifadelerini düzenlemesine imkan sağlar (Chen vd., 2002). N-acil homoserin lakton moleküllerini (AHL) kullanan QS sistemleri en iyi gram negatif bakteriler içerisinde anlaşılır. Bu sistem 30'dan fazla Gram negatif bakteride tespit edilmiş ve ilk olarak bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*'de çalışılmıştır (Veselova, 2010).

Çoğu zaman, Gram-negatif bakteriler AI-1 olarak bilinen otoindükleyici açıl homoserin laktonları (AHL) kullanırken (Camilli ve Bassler, 2006), Gram-pozitif bakteriler iletişim kurmak için otoindükleyici olarak peptidleri (AIP) kullanmaktadırlar. Otoindüktör-2 (AI-2) hem Gram-pozitif bakterilerde hem de Gram-negatif bakterilerde çevreyi algılama sisteminde kullanılmasından dolayı evrensel otoindüktör olarak adlandırılır (Ni vd., 2008).

Pseudomonas cinsi bakteriler, çeşitli besin kaynakları kullanabilme ve farklı çevre koşullarında büyüebilme yetenekleri sayesinde doğada yaygın olarak bulunan Gram negatif bakterilerdir (Veselova, 2010).

Pseudomonas türleri arasında QS sistemini en çok kullanan fırsatçı insan patojeni *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* insanlar, hayvanlar ve bitkiler için

patojendir ve hem topraktan hem de sudan izole edilebilmektedir. *P. aeruginosa* İnsanlarda şiddetli solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilir. *P. aeruginosa* ekzoenzimler (elastaz, alkalın proteaz v.b.), ikincil metabolitler (piyosianin, hidrojen siyanür, pyoverdin, v.b.) ve toksinler (ekzotoksin A) gibi hücre dışı hastalık oluşturma faktörlerinin ekspresyonunu ve ayrıca biyofilm oluşumunu QS sistemi ile kontrol eder (Venturi, 2006).

Bakteriyel çevreyi algılama sistemi biyofilm oluşumu ve bakteriyel virülens gibi çeşitli patolojik olaylarla ilgili olduğundan, çevreyi algılama sistemi inhibitörleri değerli araştırma araçları ve potansiyel antimikrobiyal ajanlar olabileceğini varsaymak mantıklıdır. Bu nedenle, QS inhibitörü geliştirmekte, artan bir ilgi olmuştur (Ni vd., 2009). Buna ek olarak, çevreyi algılama sistemi inhibitörleri QS sisteminin bakterideki rolünün anlaşılmasında etkili bir araştırma aracı olmuştur.

Yapılan bazı çalışmalar; bor bileşiklerinin bakteri, küf, maya ve virüslere karşı bakteristatik, bakterisidal, fungistatik, fungisidal ve antiviral etkilerinin olduğunu ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceklerini göstermektedir (Kahyaoğlu vd., 2009). Son zamanlarda yeni tanımlanan antibakteriyel bileşik olan boronik asit pikolinat esterlerinden AN0128'in (3-hidroksipridin-2-karbonilos-bis (3-kloro-4-metilfenil borat) hem antibakteriyel hem de anti-inflamatuvar aktivite özelliği gösterdiği belirtilmektedir (Baker ve vd., 2006).

Borik asit esterlerinin, mikroorganizmalara ait pek çok esansiyel enzimi inhibe ettikleri gösterilmiştir. Gram negatiflerde bulunan, DNA metiltransferaz ve Gram-pozitiflerde bulunan menakinonemetiltransferaz, HIV-1 proteaz, *Streptomyces griseus*'a ait NAD-glikohidrolaz ve ADP-ribosiltransferaz başlıca örneklerdir (Groziak, 2001). Boronik asitler, açıl gruplarının transferinde rol alan enzimleri, özellikle de hidrolazları; kimotripsin, tripsin, trombin ve diğer proteazları inhibe ederler. Bu etkiyi, proteazların aktif bölgesine, özellikle de serin rezidülerine bağlanarak gösterirler (Myung vd., 2001).

Bakteri kökenli enfeksiyonlarda enfeksiyona neden olan virülens faktörlerinin çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol ediliyor olması, çalışmaları bu sistemin inhibisyonu üzerine yoğunlaştırmıştır. Bu çalışma kapsamında 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin, fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'da kontrolü çevreyi algılama sistemi tarafından gerçekleşen virülens faktörlerinin (elastaz ve piyosiyenin) üretimi, biyofilm oluşmu ve kayma hareketi faaliyeti üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış ve ilk kez *P. aeruginosa*'da etkisi araştırılan bu moleküllerin çevreyi algılama sisteminin inhibisyonuna ve bu konudaki çalışmalara önemli katkılar sağlaması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Çevreyi Algılama Sistemi (Quorum Sensing)

Bakterilerin izole olarak yaşamadıkları, değişen ortam koşullarına daha rahat uyum sağlayabilmek için hücreler arası haberleşme sistemleri kullanan topluluklar halinde buldukları giderek artan bir yaygınlıkla kabul edilmektedir. Bu tip hücreler arası haberleşmenin iyi karakterize edilmiş bir örneği, çevreyi algılama (Quorum Sensing) sistemidir. Çevreyi algılama sistemi, bir bakteriye kendi hücre popülasyonu yoğunluğunu algılamasına imkan sağlayan otoindüktör veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağlıdır. Değişik bakteri türlerinde, çeşitli fizyolojik işlemler, çevreyi algılama ile regüle edilir. Bu işlemlere örnek olarak, biyofilm oluşumu, konjugasyon, hayvan ve bitki patojenleri tarafından oluşturulan virülens etmenlerinin üretimi verilebilir (Hardman vd., 1998; Boşgelmez-Tınaz, 2003).

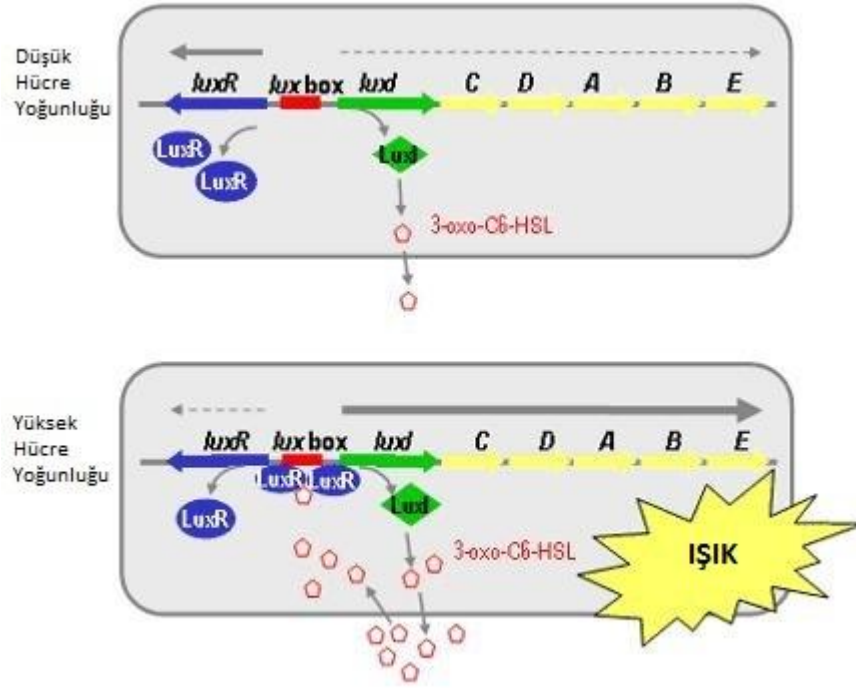
“Quorum” kelimesi Latince kökenli bir kelime olup “minimum popülasyon birimi” anlamına gelmektedir. Dolayısıyla “quorum sensing” (QS) kavramı “minimum popülasyon birimini algılama” olarak ifade edilebilir. Bu kavram ilk defa Fuqua vd. (1994), tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar, *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri* olmak üzere iki deniz bakterisinin bir balığın ışık organında yüksek yoğunlukta oldukları zaman biyofilm oluşumunu gerçekleştirdiklerini saptamışlardır (Şekil 2.1). Bu bakteriler deniz suyunda mililitrede yaklaşık 100 adet bulunurken, biyofilm oluşumunu gerçekleştirdikleri ışık organında yaklaşık 10^{10} - 10^{11} adet civarında bulunabilmektedir. Dolayısıyla bakterilerin oluşturdukları ışık sadece yüksek yoğunluklarda olduklarında saptanabilmektedir. Araştırmacıların gözlemlerine göre, bakteriler ortamdaki yoğunluklarını bir molekülün ortamdaki yüksek konsantrasyonu ile algılamaktaydılar ve bu molekülün yüksek miktarda olması bakteri yoğunluğu ile paralellik göstermekteydi (Fuqua vd., 1994). Bu gözlemden sonra QS konusundaki araştırmalar insan patojenleri ile devam etmiş ve özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde yapılan pek çok

çalışma ile bu iki bakterideki QS sistemleri çözümlenmeye çalışılmıştır (Swift, 2001).



Şekil 2.1. Kalamar balığının ışık organında meydana gelen bioışım faaliyetini (http1)

QS sisteminde kilit rol otoindükleyiciye aittir. Hücre içinde sentezlenen otoindükleyici ekstraselüler ortama salınır. Bu otoindükleyici komşu hücre membranındaki reseptörlerle algılanır. Bu algılama ise hücre içinde gen transkripsiyonuna kadar giden bir sinyal iletimini başlatır. Meydana gelen gen ekspresyonu ile de hücre topluluğu ortak bir yanıt geliştirmiş olur. QS'nin gerçekleşmesi için ekstraselüler ortamdaki otoindükleyicinin yeterli düzeye ulaşması gerekir. Bunun içinde hücre sayısının artarak belli bir yoğunluğa ulaşması gereklidir. Hücre sayısı yeterli yoğunluğa ulaşmadan QS gerçekleşmez (şekil 2.2). QS sistemi temel olarak Gram negatif bakterilerde bir çift regülatör protein (LuxI ve LuxR vd.) ve bir otoindükleyiciden (AHL vd.), Gram pozitif bakterilerde ise bir öncü peptid, ondan oluşan otoindükleyici peptid ve otoindükleyici peptidi algılayabilmek için hücre membranında bulunan histidin kinaz reseptörlerinden oluşur (Schaber vd., 2004).



Şekil 2.2. *Vibrio fischeri*'de yüksek hücre yoğunluğunda farkedilebilir biyoışığa faaliyetinin gerçekleşmesi (http 2)

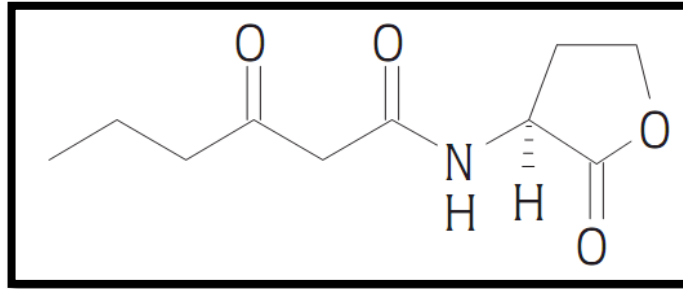
Bakterilerde çevreyi algılama sistemi olarak görülen üçüncü tip sistem hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde görülüp, 'Hibrit Sistem' olarak adlandırılmaktadır (Bassler, 1999).

2.1.1. Gram negatif bakterilerde görülen AHL aracılı (LuxI/LuxR Tipi) çevreyi algılama sistemi

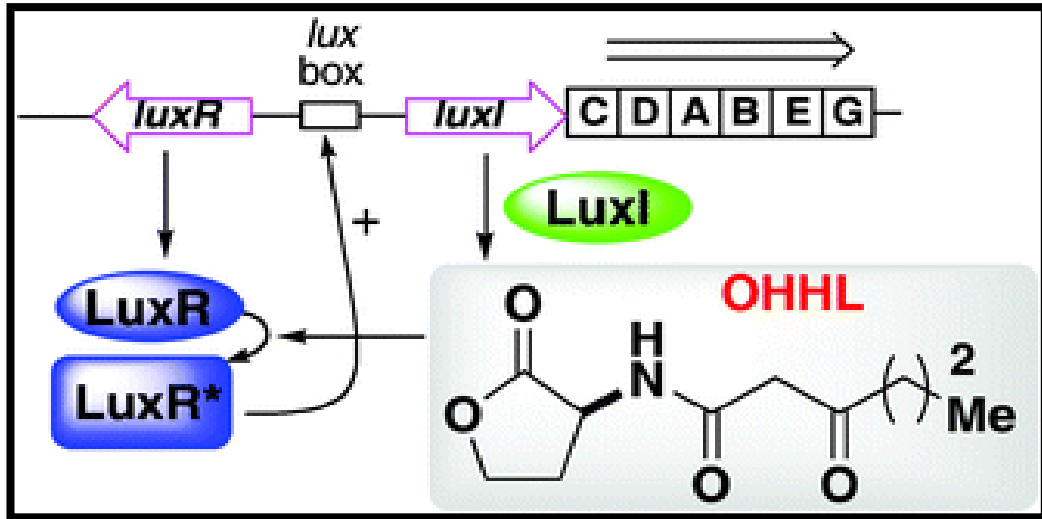
Çevreyi algılama sistemi kısaca ifade edilecek olunursa dört farklı komponentin sirkülasyonu ile gerçekleşir. AHL sinyal molekülü, LuxI tip sentaz, LuxR tip reseptör ve hedef gen (Hentzer ve Givskov, 2003).

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.

V. fischeri'de biyoluminesanstan sorumlu genler karakterize edilmiş ve iki operonda organize olmuş yedi gen (*luxR*, *luxI*, *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* ve *luxE*) tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu genlerden *luxA* ve *luxB* genleri lusiferaz enziminin alfa ve beta alt birimlerini kodlar. *lux C, D* ve *E* genleri ise lusiferaz enzimi sentezinde gerekli olan aldehid substratların sentezi ve geri kazanılmasında görev alır. *luxI*, AHL sentezinde gerekli olan bir gen iken, *luxR*, AHL transkripsiyonunu kontrol eden bir regülatörü kodlar. *luxI* mutantlarına AHL sağlanması, kaybolmuş olan fonksiyonu düzeltir, ancak AHL sentez edilemez. Buna karşılık *luxR* mutantlarına AHL sağlanması fonksiyonu düzeltmez ve ölçülebilir düzeyde AHL sentezi de gerçekleşemez. LuxR proteini ile AHL'nin birleşmesi LuxR'nin üç boyutlu yapısında değişikliğe, DNA'ya bağlanabilmesine ve lux operonunun (*luxCDABE*) ve *luxI*'nin transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlayarak lusiferaz üretimine neden olur. Lux operonunun ve *luxI* geninin aktive olması daha fazla AHL (OHHL) üretimini doğurur (Şekil 2.3). Üretilen AHL'nin LuxR ile birleşmesi, bir pozitif geri besleme sağlayarak ışımda hızlı bir artışa neden olur. Bu bilgiler ışığında *V. fischeri*'nin esas alındığı örnek bir AHL sistemi Şekil 2.4.'de özetlenmiştir (Raffa vd., 2005).



Şekil 2.3. *V. fischeri*'de *luxI* geninin ürettiği N-(3-oksoheksanoyl)-L-homoserin lakton (OHHL) sinyal molekülü (Williams vd., 2000)



Şekil 2.4. *V. fischeri*'de LuxI/LuxR quorum sensing sistemi (Welch vd., 2005)

Gram negatif bakterilerde pek çok tip sinyal molekül ailesi tanımlanmış olmakla birlikte, üzerinde en fazla durulan N-açıl homoserin lakton ailesine ait olundırı (Fuqua vd., 2001). Özellikle fırsatçı insan patojenleri olan *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Serratia marcescens* gibi bakterilerin AHL ürettikleri saptanmıştır. Lakton siklik bir moleküldür. Aynı molekül içinde karboksil grubun hidroksil grup ile ester oluşturması sonucu oluşur. Bu siklik yapıya bir amid bağı ile açıl yan zinciri eklenir. Yan zincirin ucu değişken uzunlukta olup, şimdiye kadar 4-14 karbon uzunluğunda AHL'ler tanımlanmıştır (Stock vd., 2000; Whitehead vd., 2001). AHL pek çok Gram negatif bakteride bulunmasına rağmen, AHL dışında farklı sinyal molekülleri üreten Gram negatif bakterilerde vardır. Örneğin *P. aeruginosa*'da AHL'ye ek olarak "Pseudomonas kinolon sinyal molekülü" (PQS) bulunur. Bu molekül yapısal olarak kinolon grubu antibiyotiklere benzemekte ve *P. aeruginosa*'da AHL'ye bağlı QS sistemini modüle etmektedir (Pesci vd., 1999). Buna ek olarak pek çok Gram negatif bakteride siklik dipeptidler sinyal molekülü olarak kullanılır. Bu dipeptidlerin fizyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber AHL'lerin antagonisti oldukları düşünölmektedir. AHL üretimi birçok Gram negatif bakteride bulunmakla beraber, insan patojenleri olan *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Salmonella* gibi bakterilerde AHL oluşumu gözlenmemiştir (Michael vd., 2001; Wither vd., 2001).

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

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 bulunmaktadır ve sistem son ürünü ışımaya olmayıp (Çizelge 2.1) örneğin *P. aeruginosa* da olduğu gibi virülens faktörlerinin üretimi olabilmektedir (Bassler, 1999).

Çizelge 2.1. Çevreyi algılama sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri

ORGANİZMA	SİNYAL MOLEKÜLÜ	REGÜLATÖR PROTEİNLER	FENOTİP
<i>Vibrio fischeri</i>	(3-Okzo -C6-HSL) N-(3-okzoheksanoyl)-HSL	LuxI/LuxR	Biyoişımaya
<i>Vibrio harveyi</i>	3-Hidroksi-BHL	LuxLM/LuxN	Biyoişımaya
<i>Vibrio anguillarum</i>	3-Okzo-C10-HSL	VanI/VanR	
<i>P. aeruginosa</i>	a)N-(3- Okzo dodekanoyil)-HSL (3-Okzo -C12-HSL) b)N-butiril-HSL (BHL)	a)LasI/LasR b)RhII/RhIR	a)Hucre dışı enzimler ve biyofilm üretimi (b) lasB, rhlAB (ramnolipid üretimi), rpoS
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	N-heksanoyil-HSL (C6-HSL)	PhzI/PhzR	Fenazin antibiyotiğinin üretimi
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N-(3-okzooktanoyil)-HSL 3-Okzo-C8-HSL	TraI/TraR	Ti plasmit konjugasyonu
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	N-(3-Okzoheksanoyil)-HSL (3-Oxo-C6-HSL)	ExpI/ExpR CarI/CarR	Ekzoenzimler ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	N-(3-Okzoheksanoyil)-HSL (3-Okzo-C6-HSL)	ExpI/ExpR	Pektat liyaz
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	C6-HSL	RhiiI/RhiR	RhiABC rhizosphereexpressed genes, nodulation
<i>Chromobacterium violaceum</i>	N-heksanoyil-HSL (C6-HSL)	CviI/CviR	Ekzoenzimler, antibiyotik ve viyolesin üretimi

Çizelge 2.1. Çevreyi algılama sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri (Devam)

ORGANİZMA	SİNYAL MOLEKÜLÜ	REGÜLATÖR PROTEİNLER	FENOTİP
<i>Burkholderia cepacia</i>	N-oktanoyil-HSL	(C8-HSL) CepI/R	Proteaz ve siderofor üretimi
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BHL N-butanoyil-HSL	AhyI/AhyR	Ekzoproteaz üretimi
<i>Aeromonas salmonicida</i>	BHL N- butanoyil-HSL	AsaI/AsaR	Hucre dışı proteaz üretimi
<i>Ralstonia solanacearum</i>	N-oktanoyil -HSL (C8-HSL)	SolI/SolR	tanımlanmamıştır
<i>Serratia liquifaciens</i>	N- butanoyil -HSL (BHL)	SwrI/SwrR	Hucre dışı proteaz üretimine kayma hareketinin kontrolü
<i>Yersinia enterocolitica</i>	N- heksanoyil-HSL, (C6-HSL)	YenI/YenR	tanımlanmamıştır
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	(a) N-(3-okzo heksanoyil)-HSL (b) N- oktanoyil -HSL	(a) YpsI/YpsR (b) YtbI/YtbR	Bakteriyal kumeleşme ve hareketliliğinin kontrolü

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1. *P. aeruginosa*'nın genel özellikleri

P. aeruginosa 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda olabilen basil veya kokobasil morfolojisinde bakterilerdir (Şekil 2.5). Düz veya hafif kıvrık olabilir. Spor oluşturmazlar. Gram negatif olarak boyanır. Tek polar flagellası ile hareketlidir. Diğer *Pseudomonas* türlerinde birden fazla flagella bulunabilir (Peabody vd., 2003).



Şekil 2.5. *P. aeruginosa*'nın morfolojik yapısı (http 3)

Zorunlu aerobtur, ancak oksijen yokluğunda da ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO_3 varsa yaşamını devam ettirebilir. En iyi 37°C 'de olmakla beraber, $20-42^\circ\text{C}$ arasındaki ısılarda üreyebilir. Tek karbon kaynağı olarak çok fazla sayıda substratı kullanabilmesi sayesinde birçok besiyerinde üreyebilir. Organik üreme faktörlerine gereksinimleri yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde kolayca üreyebildikleri için izolasyonları kolaydır. *P. aeruginosa* kolonileri üç farklı tipte olabilir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler küçük, kaba koloniler oluşturur. Klinik materyellerden izole edilenler ise iki tipte görülür. Birinci tip büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken virülensi daha yüksek olan ikinci tipte alginat üretimi sonucu mukoid tipte koloniler gözlenir. Kanlı basiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondülan yapıda koloniler oluşturur (Palleroni, 2003). Genellikle β hemoliz oluştururlar. Eozin Metilen Blue (EMB), McConkey agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar. Besiyerlerinde kendisine özgü bir kokusu vardır. Tatlımsı aromatik meyve, tatlı üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzeyen özel koku, 2-aminoasetofenon'a aittir ve *P. aeruginosa*'ya özgüdür (Deretic vd., 1995; Winn vd., 2006)

Karbonhidratları fermente etmez ama glukoz, fruktoz ve ksilozdan oksidatif metabolizma ile asit oluşturur, laktoz ve sükrozdan asit oluşturmaz. Oksidaz testi güçlü pozitifdir, 42°C 'de üreyebilmesi ile *P. fluorescens* ve *P. putida*'dan

ayrılır. Asetamid alkalinizasyonu pozitifdir, nitrat ve nitriti denitrifiye eder, Simmon's sitrat besiyerinde üreyerek pozitif reaksiyon verir, hidrojen sülfid üretimi negatiftir. L-arjinin dehidrolaz testi pozitif, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz testleri negatiftir. Polar yerleşimli flagellası sayesinde hareketlidir. Distile suda dahi üreyebilir. Düşük pH değerlerinde (pH<4,5) üreyemez.

2.2.2. *P. aeruginosa*'nın epidemiyolojik özellikleri

P. aeruginosa nemli ortamı sever. İnsanda perine, koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelere yerleşir. Solunum cihazları temizlik solüsyonları, ilaçlar dezenfektanlar, küvetler, paspaslar yerleşim yerleridir. Bulaş yüzme havuzu, jakuzi, sauna, kontak lens solüsyonları gibi hastane dışında su ile ilgili kaynaklardan da olabilir (Chiller vd., 2006).

Pseudomonas türleri insanların normal florasında yer alabilir (Chan ve Hadley, 2001). Deride %0,2, burun mukozasında %0-3,3, boğazda %0-6,6, dışkıda %2,6-24 oranında görülebilir. Hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artan bakteri, hastanede yatan yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sisteminde, antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcılığı olabilmektedir (Shannon ve French, 2004).

Hastane enfeksiyonuna yol açan suşların toplum kökenlilerden farkı; hastane ortamında yaşamlarını sürdürebilmeleri, hastane personelinin deri ve mukozalarında kolonize olmaları, çeşitli yüzeylerde canlılıklarını koruyabilmeleri ve antibiyotik tedavilerine bazende antiseptiklere direnç gösterebilmeleridir (Sasaki vd., 2004; Micek vd., 2007). Yapısal olarak dirençli olması ve yeni direnç mekanizmaları edinebilmesi, mikroorganizmaya hastane ortamında yaşamını sürdürebilmesi bakımından bir üstünlük sağlar (Esel vd., 2003).

2.2.3. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi

P. aeruginosa enfeksiyonları genellikle konak immün sisteminde bir defekte neden olan travma, cerrahi, yanık ya da katater uygulamaları gibi sekonder durumların normal cilt ya da mukozal yüzeylerin bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu durumlarda gelişmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, normal mukozal florayı baskılayabilir veya nötrojeni, kistik fibrozis, AIDS gibi durumlarda savunma mekanizmalarının bozulmasına neden olabilir. Bunların sonucunda bakteri kolonizasyon imkanı sağlayabilir (Van Delden ve Iglewski, 1998).

Kolonizasyon sonrasında üretilen birçok hücre dışı virülens faktörü doku hasarı, kan dolaşımına karışma ve yayılıma neden olur. İn vivo çalışmalarla ekzotoksin A, ekzoenzim S, elastaz ve alkali proteazın *P. aeruginosa*'nın virülensinin en yüksek seviyede sergilenebilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir.

2.2.4. *P. aeruginosa*'nın virülens faktörleri

2.2.4.1. bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülens faktörleri

Flajel: *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantıdır ve *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Flajel patogeneizde kritik bir role sahiptir, asiolaGM1 gibi yaygın membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak adezyonu sağlar. Flajel *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonunun başarısından sorumludur ve oldukça immünojeniktir (Feldman vd., 1998).

Pili (Fimbriae): *P. aeruginosa*'nın kısa filamantöz yüzey uzantılarıdır. Çoğunlukla çoklu pililer mevcuttur ve pililer *P. aeruginosa*'da titreme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. *P. aeruginosa*'nın pilileri bakteriyel harekette rol alan nadir prokaryotik piluslardandır. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Flajel gibi pililerde epitel hücre

yüzeyinde asialoGM1 yapılarına bağlanarak kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol alırlar (Gupta vd., 1994).

Lipopolisakkarit (LPS): *P. aeruginosa*'da dış membranın iç yüzü tipik çift katlı fosfolipid tabakaya benzese de, dış membranın dış yüzü başlıca lipopolisakkarit (LPS) tabakadan oluşmaktadır. LPS tabaka, fosfolipid ikili katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-spesifik polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. Farklı O-spesifik polisakkarit zincirleri, esas olarak *P. aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılır. Lipid A komponenti ise pek çok proinflamatuvar yolakta aktiftir (Wieland vd., 2002). LPS tabaka TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerinin tanınması ve asialoGM1 veya CFTR (cyclic fibrosis transmembrane conductance regulator) reseptörlerine bağlanması aracılığıyla adezyonda rol alan önemli bir virülens faktörüdür (Kipnis vd., 2006).

Aljinat: Aljinat, *P. aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapıdır. Tekrarlayan mannuronik asit ve glukronik ait polimerlerinden meydana gelir. Aljinat LPS gibi adezin fonksiyonu gösterir ve solunum epiteline *P. aeruginosa*'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar. Aljinatın aşırı üretimi *P. aeruginosa*'yı fagositozdan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Hentzer vd., 2001).

2.2.4.2. hücre dışına salgılanan virülens faktörleri

Elastaz: Elastaz, Las A (serine proteaz) ve Las B (çinko metalloproteaz) olarak iki formda bulunan ve *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastini sinerjistik olarak parçalayabilen enzimdir. Virülensle ilişkisi açık olan bu enzim elastin içeren dokularda ve akciğer parankiminde hasara neden olmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun yayılması ile ilişkili olarak hemorajik lezyonlardan (ektima gangrenozum) sorumludur. Bu enzimler (Las A ve Las B) kompanen bileşiklerini parçalayarak nötrofillerin kemotaksis ve fonksiyonlarını inhibe ederler. Böylece akut enfeksiyonlarda doku hasarına ve daha fazla yayılıma sebep olurlar (Erdem, 1999; Gillihan, 1995).

Alkali Proteaz: Elastaz benzeri bir protein olan alkali proteaz ise doku hasarına ve *P. aeruginosa* enfeksiyonunun yayılmasına katkıda bulunur. Aynı zamanda konağın immün cevabına engel olmaktadır. Her iki enzim (Elastaz ve Alkali proteaz) de, deride, akciğerde ve korneada nekrozlar yapar (Erdem, 1999; Gillihan, 1995).

Piyosiyenin: *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metaboliti olan piyosiyenin, nötrofillerde apoptozisi uyarması, konak yanıtını baskılaması ve IL-8 artışı gibi etkilerle patogeneze rol alır (Leidal vd., 2001).

Piyoverdin: Bir siderofordur. Çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretiminde düzenleyerek virülenste rol oynar (Lamont vd., 2002).

Proteaz IV: Proteaz IV, *P. aeruginosa* tarafından salgılanan diğer proteazlar gibi patogeneze rol alır. Proteaz IV'ün özellikle *P. aeruginosa* keratitinin patogeneze katıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda sürfektan proteinleri A, D ve B'nin yıkımı aracılığıyla akciğer enfeksiyonlarının patogeneze de etkili olduğu gösterilmiştir (Malloy vd., 2005).

Fosfolipaz C: Fosfolipaz C, özellikle hemolitik fosfolipaz C, *P. aeruginosa* tarafından tip II salgılama sistemi aracılığıyla ekstraselüler boşluğa salgılanan bir fosfolipazdır. *P. aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonun patogeneze rol aldığı gösterilmiştir. Patojenik etkilerinin bir kısmı elastaz gibi sürfektan inaktivasyonu ile olmaktadır (Terada vd., 1999).

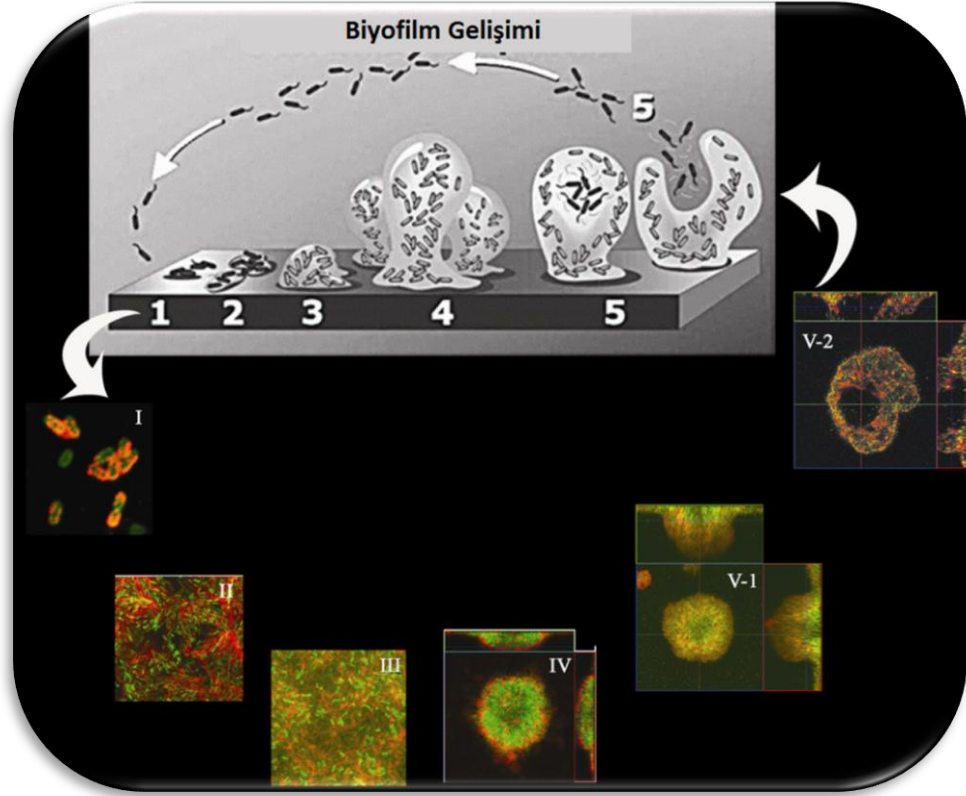
Ramnofosfolipid: Hemolitik etkisi olan hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biosürfektan etkisi gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfektanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Salys ve Whitt, 1994).

Ekzotoksin A: Ekzotoksin A hücre dışı bir enzim olup, *P. aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından yapılır. Difteri toksini için tanımlanan mekanizma ile ökaryotik hücrelerde (memelilerde) protein sentezini önler. Her iki toksinde adenozin difosfat transferini katalize eder. Bu reaksiyon elongasyon faktör 2 (EF2) inaktive edilerek protein sentezi inhibe edilir. Ekzotoksin A, 613 aminoasitten oluşan tek bir polipeptid zinciridir. Ekzotoksin A'nın büyük ihtimalle yanık yaralarındaki doku nekrozundan, oküler enfeksiyonlarda korneal hasardan ve kronik akciğer hastalıklarında doku hasarından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Safılaştırılmış ekzotoksin A, hayvanlar için oldukça öldürücüdür. Bu toksin aynı zamanda immünosupresif etkiye sahiptir (köpek ve rhesus maymunlarında).

Tip 3 salgı sistemi : *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Pseudomonas* türlerinde saptanmıştır. Bakterilerin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini ökaryot hücre stoplazmasına ilettiği bir sistemdir. *P. aeruginosa*'nın tip 3 salgı sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur (Kipnis, 2006).

2.2.5 Biyofilm oluşturma

Biyofilmin en yeni tanımı mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu hücre dışı polimerik madde (EPS) oluşmuş matriks şeklindedir (Donlan, 2002). Biyofilm oluşumu las sistemi kontrolünde gerçekleşir (De Kievit vd., 2001). Biyofilm oluşumu, katı veya sıvı bir yüzeye tutunma, mikrokolonizasyon, hücre dışı polisakarit bileşenlerin üretilmesi, bakterilerin olgunlaşması ve yayılması basamaklarını içerir (Şekil 2.5).



Şekil 2.6. Biyofilm oluşum basamakları; 1-Yüzeğe tutunma, 2-Geri dönüşümsüz tutunma, 3-Olgunlaşma fazı-1, 4-Olgunlaşma fazı-2, 5-Ayrılma, kopma (http 4)

Biyofilm içinde mikroorganizmaları barındıran korunaklı bir yapıdır. Mikroorganizmalar biyofilm yapısında iken antimikrobiyal ajanlara, antiseptiklere daha dirençli oldukları, biyofilm bakterilerinin planktonik hallerine göre, 10- 1000 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Douglas, 2003).

Bakteriler biyofilm tabakasından uzaklaştırılıp sıvı kültür ortamlarında serbestçe üretilirse, dirençli oldukları dezenfektanlara tekrar duyarlı hale gelirler. Biyofilm üreten bakteriler antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmektedirler.

2.3. *Pseudomonas aeruginosa* ve Çevreyi Algılama Sistemi

P. aeruginosa'nın hücre dışına salgıladığı pek çok virülens etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun; birbiri ile ilişkili "las" ve "rhl" olarak tanımlanan iki QS sistemi ile kontrol edildiği gösterilmiştir (Costerton, 1999). Bu sistemler

biyofilm oluşumu, elastaz (Las A ve Las B), alkalen proteaz, hidrojen siyanid, ekzotoksin A, piyosiyenin, lektin, rhamnolipid, sigma etmen, süperoksit dismutaz başta olmak üzere çeşitli virülens etmenlerinin üretimini kontrol etmektedir (Murray vd., 2007).

Las B elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de "las sistemi" olarak adlandırılan birincil sistem; *Las I* (3-oxoC12-HSL-L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu AI sentaz geni) ve *Las R* ("transcriptional activator" proteinini kodlayan gen) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu ve Las B elastaz, Las A proteaz, ekzotoksin A gibi diğer ekstraselüler virülens etmenlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder (Landry vd., 2006; Baskın, 2006).

İkincil QS sistemi olan "*rhl* sistem" ise; *rhl I* (C4-HSL, AI sentaz geni, kısa zincirli AHL) ve *rhl R* ("transcriptional activator" proteinini kodlayan gen)'den oluşur. Rhl AB operonunun (yönetici DNA bölgesi) yapımını kontrol eden bu sistemin, rhamnolipid üretimi için gerekli olan "rhamnosyltransferase" enziminin sentezlemesini düzenlemesinin yanı sıra, Las B elastaz, Las A proteaz, piyosiyenin, siyanid ve alkalen proteazın üretiminde düzenlediği bilinmektedir (Murray vd., 2007; Baskın, 2006).

P. aeruginosa'nın patogeneğinde rolü olan virülens faktörleri elastaz, alkali proteaz, Las A proteaz, fosfolipaz C, ekzotoksin A, rhamnolipid ve piyosiyenin üretimi ve biyofilm oluşumu QS ile bağlantılıdır (Hogardt, 2004). QS sisteminin *P. aeruginosa* virülensindeki fonksiyonel önemi in-vivo hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda açıkça gösterilmiştir (Rumbaugh vd., 2000).

Son yıllarda *QscR* olarak isimlendirilen üçüncü LuxR homologu saptanmıştır. Bu sistemin *LasI* ve *RhlI*'nin transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. *QscR*, çeşitli virülens faktörlerinin üretimini düzenlenmesinde oldukça önemlidir fakat bu düzenleme Las ve Rhl sistemlerinin her ikisinin ekspresyonunun kontrolüne meydana gelmektedir (Hogardt, 2004). QS moleküllerinin saptanmasında AHL varlığını inceleyen fenotipik (enzimatik) metodların yanı

sıra *las* ve *rhl* genlerinin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Bazire vd., 2005; Cabrol vd., 2003; Singh ve Greenstein, 2006).

2.4. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitörleri

P. aeruginosa'da QS sistemi tarafından düzenlenen gen ifadesi, bu bakterinin antimikrobiallere karşı toleransına ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. Laboratuvar şartlarında, QS sistemi, sinyal moleküllerinin alımını etkili bir şekilde engelleyen, yeni bir sınıf antimikrobiyal ilaç geliştirmek için yeni bir hedeftir. Hem doğal hemde sentetik orjinli kimyasal kütüphanelerle, tanımlanmış olan birkaç QS inhibitör bileşenlerinin, hayvan akciğerlerinde meydana gelmiş olan enfeksiyonu yok ettiği ispat edilmiştir. Buna ilaveten, bakteriyel QS sinyal moleküllerini inaktive eden birkaç enzim tanımlanmıştır. Bu inaktivasyonun birkaç modelde, bitki patojenlerinin QS kaynaklı virülense bloke ettiği de bulunmuştur (Rasmussen ve Givskov, 2006a, b).

QS sistemini inhibe eden bileşiklerin bazı özelliklerinin olması önemlidir. QS'i engelleyen ideal bir bileşiğin, virülens genlerinin ekspresyonunda önemli bir düşüşe neden olan ve düşük moleküler ağırlığa sahip moleküller olması gerekir. Bu inhibitörlerin hem ökaryotik konaklarda hem de bakterilerde toksik yan etkilerinin olmaması gerekir. Ayrıca QS inhibitörlerinin yüksek organizasyonlu konaklara dayanıklı ve kimyasal olarak kararlı olması gerekmektedir. Bu konuda yapılan araştırmaların başlıca amacı, sinyal moleküllerinin sentezini inhibe ederek konsantrasyonunu düşürmek veya sinyal molekülünün hedef genlerin ekspresyonunu aktive etmesini önlemek olarak sayılabilir. Makrolid grubunda yer alan azitromisin QS inhibitörü olduğu belirlenmiştir (Tateda vd., 2001).

Yapılan in-vitro çalışmalar azitromisin, *P. aeruginosa*'da elastaz ve rhamnolipid sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Tateda vd., 1996). Ayrıca azitromisin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu %80 oranında düşürmekte, bunun sonucunda sinyal moleküllerinin sentezi yaklaşık

%90 oranında inhibe olmaktadır. Dolayısıyla makrolid kullanımının, sinyal molekülü sentezini inhibe ederek kısmen de olsa doku hasarını önleyebileceği düşünülmektedir.

Üzerinde çalışılan diğer bir QS inhibitörü, deniz otundan elde edilen bir bileşiktir. Deniz otunun biyolojik olarak aktif halojenize furanon ürettiği ve bu furanonun bitki yüzeyinde yer aldığı zaman gerek prokaryotların gerekse ökaryotların bitki yüzeyinde kolonize olamadıkları gözlemlenmiştir. Bu bileşenlerin Gram negatiflerde AHL kaynaklı çevreyi algılamayı engellediği bulunmuştur (Ni, 2009).

Manefield vd. *E. carotovora*' da yaptıkları çalışmada selülaz, proteaz ve karbapenem üretimi üzerine deniz algi olan *D. pulchra*'dan elde edilmiş olan halojenlenmiş furanonların etkilerini test etmişlerdir. Karbapenem ve ekzoenzim üretiminin düzenlenme mekanizmalarındaki farklılıklara rağmen alge ait metabolitler tarafından engellendiği bulunmuşlardır. Karbapenem üretiminin furanono bağlı engellenmesi, *carABCDEF* operonunun, 3-oxo-C6-HSL'ye bağlı ifadesindeki kesintiler sonucu olduğunu göstermiştir (Manefield vd., 2001).

Smith vd. *P. aeruginosa* transkripsiyon aktivatör proteini olan LasR'yi etkinleştirme yeteneğine sahip, yeni bir agonist olan 3-oxo-C12-(2-aminosikloheksanol) 'yi keşfetmişlerdir. QS aktivatör proteinleri olan LasR ve RhlR' yi tekrar araştırmışlar ve her iki proteinin homoserin laktone bağlanma yerlerinin aynı olduğunu bulmuşlardır. Fakat bu proteinlerin farklı yapısal motiflere sahip olduklarında bulmuşlardır. Bu antagonistlerin virülens faktörlerini ve biyofilm oluşumunu azalttığını yani QS'i inhibe ettiğini göstermişlerdir (Smith vd., 2003).

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. QS inhibitörleri bitki ve mantar gibi kaynaklardan izole edilebilir. Mantar ve bitkilerin, QS'i inhibe eden bileşenleri üreterek, bu bakterilerin hastalık oluşturmalarını, kolonize olmalarını ve bulaşmalarını azalttıkları görülmüştür. (Rasmussen ve Givskov, 2006a, b). Choo vd. (2006) vanilya özütüyle yaptıkları çalışma ile *C. violaceum*'da pigment üretimini engellediğini bulmuşlardır. Genelde vanilya olarak bilinen *Vanillia planifolia Andrews* baharat ve çeşni olarak kullanılır. Bu çalışmada vanilya ekstraktının bazı asitler, esterler, fenoller ve hidrokarbonlar içerdiği belirlenmiştir. Ana bileşenlerinin hiç birisinin furanon türevleri ve doğal uyarıcılarla yapısal benzerliği olmadığı saptanmıştır. izole edilen bileşikler toksik furanon bileşiklerinden farklı olduğu için güvenle kullanılacağı insanlar için büyük bir avantaj sağlamıştır. Sarımsak ekstraktını kullanarak *P. aeruginosa*'da QS sistemini engelleyen bir grup araştırmacı, vanilya ekstraktında bu bakterideki QS sistemini engelleyici aktivitesiyle ilgili çalışmaktadır. Başka çalışmalarla da *C. violaceum* CV026'da *Lotus corniculatu* (gazalboynuzu) bitkisinin QS sistemini engelleyici aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Bjarnsholt vd., 2005).

Boronik asit türevlerinin *P. aeruginosa*'da virülens sistemi üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma literatürde bulunmamakla birlikte Ni vd. (2009), *Vibrio harveyi* üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bazı boronik asit türevi molekülleri tek haneli mikromolar seviyede Al-2 inhibitörü olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

2.5. Quorum Sensing Sisteminin İnhibisyon Mekanizması

Çevreyi algılama sisteminin moleküllerinin inhibisyonu üç mekanizma üzerinden sağlanmaktadır.

2.5.1 AHL sentezinin engellenmesi

Üzerinde en az araştırma yürütülen yaklaşım sinyal üretiminin blokajı olmuştur. Önemli QS moleküllerinden birisi olan AHL, S-adenozil metiyoninden sentezlendiğinden dolayı, bu aminoasidin analogları çevreyi algılama molekülünün sentezini önlemek için denenmektedir. Bir makrolid olan eritromisin tam bilinmeyen bir mekanizma ile ribozomal düzeyde QS sinyal molekülünün sentezini engelleyebilmektedir. Gram-negatif bakterilerde önemli bir sinyal molekülü olan AHL'nin sentezinde görevli bir enzimi inhibe eden "triclosan" dolayısıyla bu molekülün sentezini de engellemiş olur. *P. aeruginosa* izolatlarında yapılan bir çalışmada, azitromisinin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu azalttığı ve elastaz gen ekspresyonunu önleyerek enfeksiyonun şiddetini azalttığı ve alternatif bir tedavi yaklaşımı sağladığı gösterilmiştir (Tateda vd., 1996).

2.5.2. 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).

2.5.3. AHL sinyal molekülünün alınmasının önlenmesi

QS sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla sinyal reseptör proteinlerinin ya da AHL analogları aracılığı ile reseptöre bağlanmanın azaltılması denenmektedir. Bir kırmızı makro alg olan *D. pulchra*'nın ürettiği ve veziküllerinde depolamış olduğu furonon bileşikleri yapısal olarak AHL sinyal analogu olup LuxR

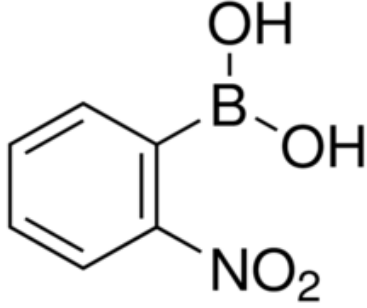
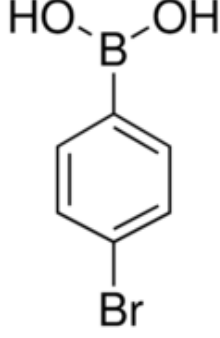
proteinine bağlanarak AHL'nin ayrılmasına neden olduğu ve böylece *Vibrio fischeri*'nin tedavisinde QS inhibitörü olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Zhang ve Dong, 2004).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

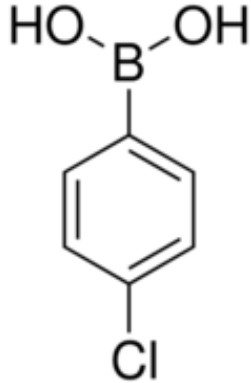
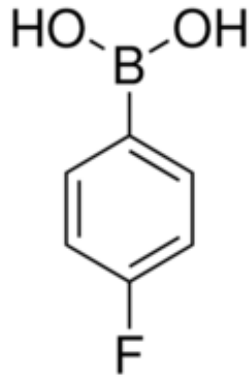
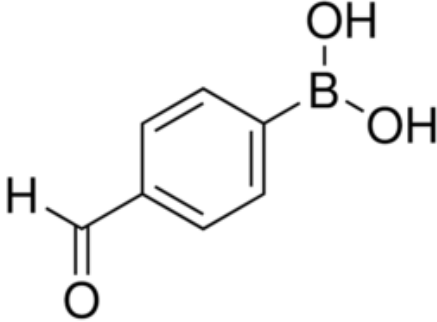
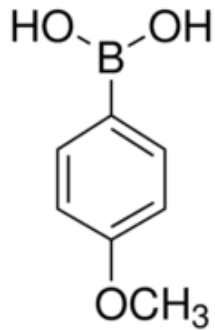
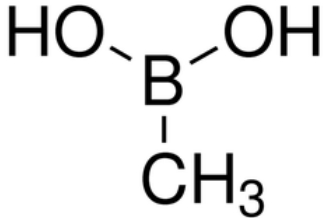
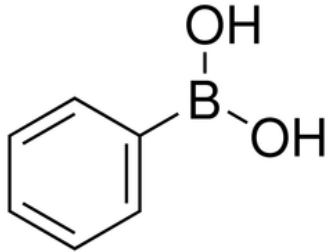
3.1. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Yapıları

Tez çalışmasında kullanılmak üzere çevreyi algılama sistemi inhibitör adayları olarak 2-Nitrofenilboronik asit (2-NFBA), 4-Bromofenilboronik asit (4-BFBA), 4-Klorofenilboronik asit (4-KFBA), 4-Fluorofenilboronik asit (4-FLFBA), 4-Formilfenilboronik asit (4-FFBA), 4-Metoksifenilboronik asit (4-MFBA), Metilboronik asit (MBA) ve Fenilboronik asit (FBA) molekülleri seçilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm çözücüler analitik niteliktedir. Bileşiklerin sentezinde ve yapılan analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler, Sigma-Aldrich ve Merck firmasından temin edilerek kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Seçilen Moleküller

<p>2-Nitrofenilboronik asit MA: 166.93 g/mol</p> 	<p>4-Bromofenilboronik asit MA: 200.83 g/mol</p> 
--	--

Çizelge 3.2. Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Adayı Olarak Seçilen Moleküller (DEVAM)

<p>4-Klorofenilboronik asit MA: 156.37 g/mol</p> 	<p>4-Fluorofenilboronik asit MA: 139.92 g/mol</p> 
<p>4-Formilfenilboronik asit MA: 149.94 g/mol</p> 	<p>4-Metoksifenilboronik asit MA: 151.96 g/mol</p> 
<p>Metilboronik asit MA: 59.86 g/mol</p> 	<p>Fenilboronik asit MA: 121.93 g/mol</p> 

3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları

Çalışma sırasında 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör etkilerinin test edilmesi basamağında referans olarak QSI1 biyosensör suş kullanılmıştır. Viyolasin pigment üretimi testinde ise *Chromobacterium violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07 suşları kullanılmıştır.

Çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen virülens faktörleri üretimi (Elastaz ve pilyosyanin), biyofilm oluşturma ve kayma hareketi üzerine, 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin inhibitör etkilerinin araştırıldığı testlerde ise; *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK04 klinik izolatları ile pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PA01 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	Kaynak
<i>P. aeruginosa</i> PA01	PT5 orijinal tip	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> PAK1	Klinik izolat	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> PAK2	Klinik izolat	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu
<i>P. aeruginosa</i> PAK4	Klinik izolat	SDÜ Biyoloji Bölümü Bakteri Stoğu

3.3. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özelliklerinin Test edilmesi

3.3.1. QSI1 (QS için seçici suş 1) Testi

Bu test ile biyosensör bakteri olan QSI1 kullanılarak; 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit'in çevreyi algılama sistemi üzerindeki potansiyel inhibitör etkileri araştırılmıştır (Rasmussen vd., 2005).

QSI1 mutant bakterisinin özelliği sinyal moleküllerinin bulunduğu ortamda yaşayamayıp, çevreyi algılama sistemi inhibitörlerinin (QSIs) etkinliğini gösterdiği ortamda yaşayabilmesidir (Bjarnsholt, vd., 2010). Bu bakteri *Escherichia coli* 1100'ün laktoz pozitif suşuna *V. fischeri*'nin *luxRI* QS taşıyan pTBR2iB plazmidinin klonlanmasıyla oluşturulmuştur (Rasmussen vd., 2005). *luxI* promotorunun kontrolü altında hücreye eklenen fosfolipaz A proteinini kodlayan gen (*phlA*) sentezlendiği takdirde hücrenin ölümüne yol açmaktadır. Eğer ortamda toksik olmayan çevreyi algılama inhibitörü mevcut ise *phlA* sentezlenemez ve hücre gelişimine devam eder (Bjarnsholt vd., 2010).

Bu çalışmada ABT minimal besi ortamına %0,5 glikoz ve %0,5 kosamino asit (2,5 mg/litre Tiamin içeren AB ortamı) eklenerek çalışılmıştır. Besiyerine ayrıca 3-Oxo-C6-HSL (Sigma-Aldrich), ampisilin, 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-D-galaktopiranozid (X-Gal, Sigma-Aldrich), ve isopropil-D-tiyogakatozid (IPTG, Sigma-Aldrich) son derişimleri sırasıyla 200 nM, 100 ppm, 80 ppm, ve 100 µM olacak şekilde eklenip, içerisine gecelik QSI1 kültüründen ilave edilerek petrilere dökülmüştür. Besi ortamı katılaştıktan sonra ortama steril pastör pipeti vasıtasıyla kuyucuklar açılmış ve açılan bu kuyucuklara son derişimi 0,1 M olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülen 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit'ten 50 µl yüklenmiştir. 30 °C de 24 saat inkübasyonun

sonucunda oluşan yeşil zon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Deneyler üç defa tekrarlanmıştır. DMSO negatif, patulin ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Rasmussen vd., 2005).

3.3.2. Çalışılan boronik asit türevi moleküllerin *Chromobacterium violaceum*'da viyolasin üretimine etkisi

C. violeceum tarafından üretilen viyolasin adlı pigmentin üretimi bu bakterinin çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Luria Bertani (LB) agar besiyeri içeren petri kaplarına, sıvı LB besiyerinde üretilmiş ve %0.7'lik yumuşak agar ile karıştırılmış C6-HSL veya C12-HSL eklenmiş *C. violeceum* 026 veya *C. violeceum* VIR07 kültürü yayılarak, katılaşması beklenmiştir. Katılaştıran besi yerinde steril pastör pipetinin arka kısmı ile kuyucuklar açılmıştır. Açılan bu kuyucuklara farklı derişimlerde hazırlanmış 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit 50µl yüklenerek 30 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Patulin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonucunda, viyolasin üretimi kontrol edilerek mor zeminde renksiz bölge oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mc Clean vd., 1997, Morohoshi vd., 2007). Yani bu sistemin, kullanılan 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit tarafından bloke edilmesi bakteri tarafından viyolasin pigmentinin üretilmemesi ile sonuçlanmıştır.

3.4. Çalışılan Boronik Asit türevi Moleküllerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi (MİK)

2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin MİK değerleri bu çalışma

sirasında incelenen *P. aeruginosa* PA01 için tespit edilmiştir. Bu amaçla PA01 5 ml LB sıvı besiyerinde 37°C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

Test edilen 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit molekülleri derişik, % 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 kat olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) ile seyreltilmiştir. Herbir kuyucuğunda 155 µL LB besiyeri bulunan 96'lık mikropolanın yine her bir kuyucuğuna 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış bakteri kültüründen 20'şer µl ve son derişimleri 55,500mM, 27,750mM, 13,875mM, 6,937mM, 3,468mM, 1,734mM 0,867mM ve 0,433mM olacak şekilde seyreltilen örneklerden 5'er µl eklenmiştir. 37 °C'lik inkübatörde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (Hammer vd., 1999). İnkübasyon sonrasında MİK değerini tespit etmek için örnek sayısı kadar LB agar besiyeri hazırlanmıştır. Petri kaplarının üzerine derişim oranları yazılarak bölmelere ayrılmıştır. İnkübasyon sonrası mikropalakadaki kültürler 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.

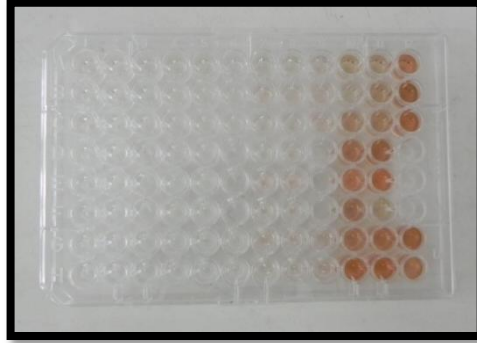
3.5. Büyüme ve Gelişme Eğrileri

MİK ile belirlenen derişimler için 96 kuyucuklu mikropolaka kullanılarak büyüme-gelişme eğrileri oluşturulmuştur. Kuyucuklara 180 µl LB sıvı besiyeri eklenmiş ve 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin 8mM, 4mM, 2mM ve 1mM derişimleri kuyucuklarda dilüe edilerek hazırlanmıştır. 37°C'de inkübasyona bırakılan mikropalakalar 30 dakika aralıklarla Epoch marka mikropolaka okuyucuda 600 nm de okutulmuş ve veriler kaydedilmiştir.

3.6. Virülens Faktörleri Üretim Testleri

3.6.1. Elastaz testi

Elastaz aktivitesini test için Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman vd., 1980). *P. aeruginosa* PA01 suşu ve *P. aeruginosa* PAK1, *P. aeruginosa* PAK2, *P. aeruginosa* PAK4 klinik izolatları LB besiyerinde 2mM'lık derişimlerde 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit varlığında 37°C, 120rpm de 24 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin süpernatantlarından 100-µL üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7.5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 37°C'de 3 saat çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve üst faz absorbansı 495nm'de Epoch marka mikropilaka okuyucuda okunarak kayıt edilmiştir (Şekil 3.1.). Test sırasında Luria Bertani (LB) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kimyasal eklenmemiş kontrol örnekler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

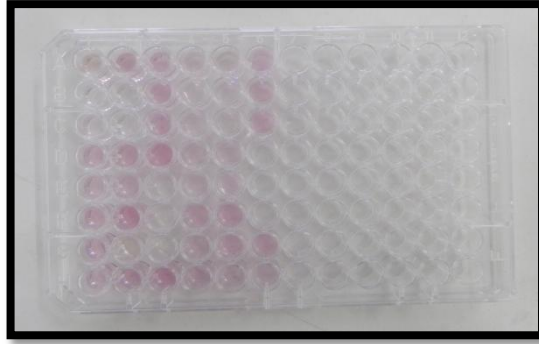


Şekil 3.1. Elastaz testinde süpernatantların mikropilakadaki görüntüsü

3.6.2. Piyosiyenin testi

Test edilecek bakteri suşları LB broth besiyerinde 37°C'de 24 saat üretilmiştir. 10 ml piyosiyenin broth (PB) besiyerine, son derişimi 2mM olacak şekilde 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit,

Metilboronik asit ve Fenilboronik asit eklenmiş ve 600 nm'de OD 0,05 olacak şekilde ayarlanan bakteri kültürlerinden ilave edilip 37°C'de 24 saat çalkalanarak üretilmiştir. PB ortamında üretilen *P. aeruginosa* kültürünün 10 ml'si 5 ml kloroform ile ekstrakte edilmiş ve 1 ml organik faz temiz bir tüpe ayrılmıştır (Essar vd., 1990). Ayrılan faza, 1 ml 0,2 M HCl ilave edilerek piyosiyanine zengin organik faz ayrılmıştır. Ekstrakte edilen kısımdaki piyosiyanın miktarı 520 nm'de Epoch marka mikropilaka okuyucuda okunarak OD sonuçları kayıt edilmiştir. Sonuçlar PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Ekstrakte edilen piyosiyanın mikropilakadaki görüntüsü

3.7. Biyofilm Testi

P. aeruginosa PAO1 suşu ve *P. aeruginosa* PAK1, *P. aeruginosa* PAK2, *P. aeruginosa* PAK4 klinik izolatlarında 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir. Biyofilm testi için O'Toole ve Kolter (1998) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu test için 2mL'lik plastik tüpler kullanılmıştır. Her bir plastik tüpe 800µL LB broth besiyeri, 50µL 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış kültür ve son derişimi 2mM olan 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit veya Fenilboronik asit moleküllerinden biri eklenerek 24 saat 37°C de inkübe

edilmiştir. inkübasyon süresi sonunda kültürler döküldükten sonra tüpler steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Tüpler oda sıcaklığında kurulandıktan sonra 1 ml %0.5 (w/v) kristal viyole ile 30 dakika boyanmış ve steril saf su ile boyanın fazlası yıkanmıştır. Tüplere eklenen 1 ml % 95 (v/v) etanolün optik dansitesi 570 nm'de okunarak tespit edilmiştir. Oluşan biyofilm miktarları kimyasal eklenmemiş örneklerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.8. Kayma Hareketi Testi

Test edilecek *P. aeruginosa* PA01 suşu ve *P. aeruginosa* PAK1, *P. aeruginosa* PAK2, *P. aeruginosa* PAK4 klinik izolatları bir gece Luria-Bertani broth 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 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinden son derişim 2 mM olacak şekilde eklenmiştir. Her bir kültür santrifüj edildikten sonra süpernatantın 5µL'si kayma besiyeri petrilere ilave edilmiş ve 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır (Rashid ve Kornberg, 2000). Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında LB negatif ve kimyasal eklenmemiş besiyerleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.9. Verilerin Değerlendirilmesi

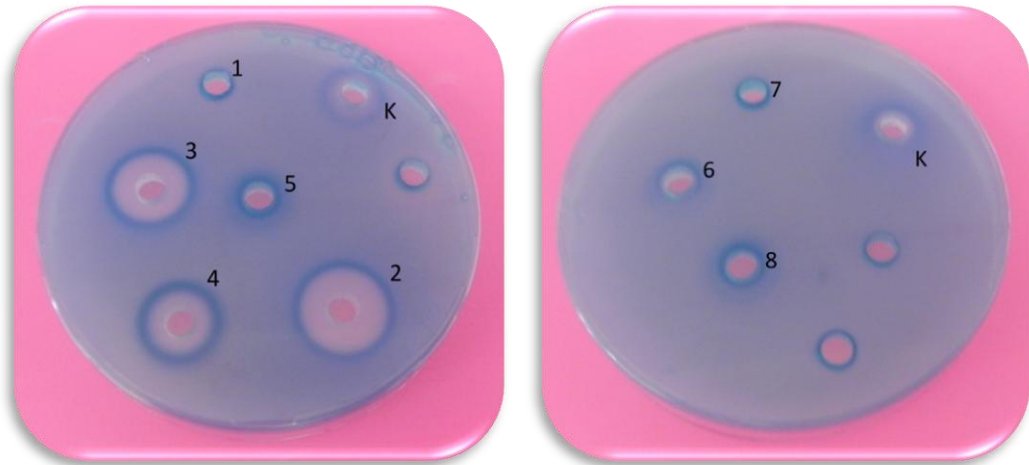
Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen veriler *P. aeruginosa* PA01 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmişlerdir. Sonuçlar ile kontrol arasındaki fark $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistik olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Boronik Asit Türevi Moleküllerinin Çevreyi Algılama Sistemi İnhibitör Özellikleri

4.1.1. QSIS1(QS için seçici suş 1) test bulguları

Çevreyi algılama sistemi inhibitör adayı olarak seçilen 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin çevreyi algılama sistemi üzerindeki inhibitör etkileri QSIS1 testi sonucunda kuyucuklar etrafında mavi halka oluşumu gözlenmiş ve sonuçlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1).

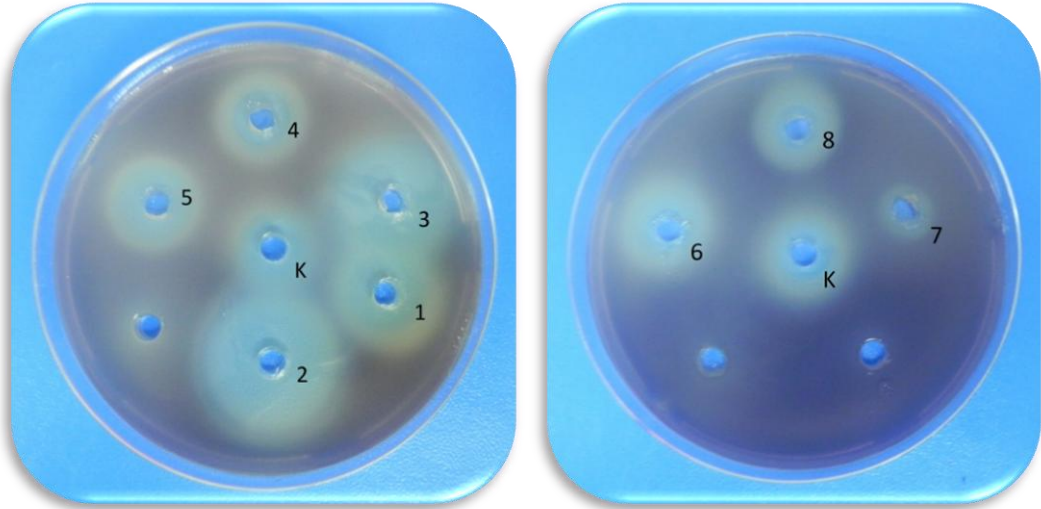


Şekil 4.1. Boronik asit türevi moleküller (0,1 M) için QSIS1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü (1) 2-NFBA, (2) 4-BFBA, (3) 4-KFBA, (4) 4-FLFBA, (5) 4-FFBA, (6) 4-MFBA, (7) MBA, (8) FBA ve pozitif kontrol (K) Patulin

4.1.2. Çalışılan boronik asit türevi moleküllerin *C. violaceum*'da viyolasin üretimine etkisi

Sinyal molekülü varlığında pigment üretebilen biyosensör *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 2-Nitrofenilboronik asit, 4-

Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit molekülleri son derişimi 0,1 M olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir. İnhibisyon etkisi kuyucuk etrafında renksiz bölge oluşumu olarak gözlenmiş ve kuyucuk etrafında renksiz bölge oluşturan moleküller pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.2).



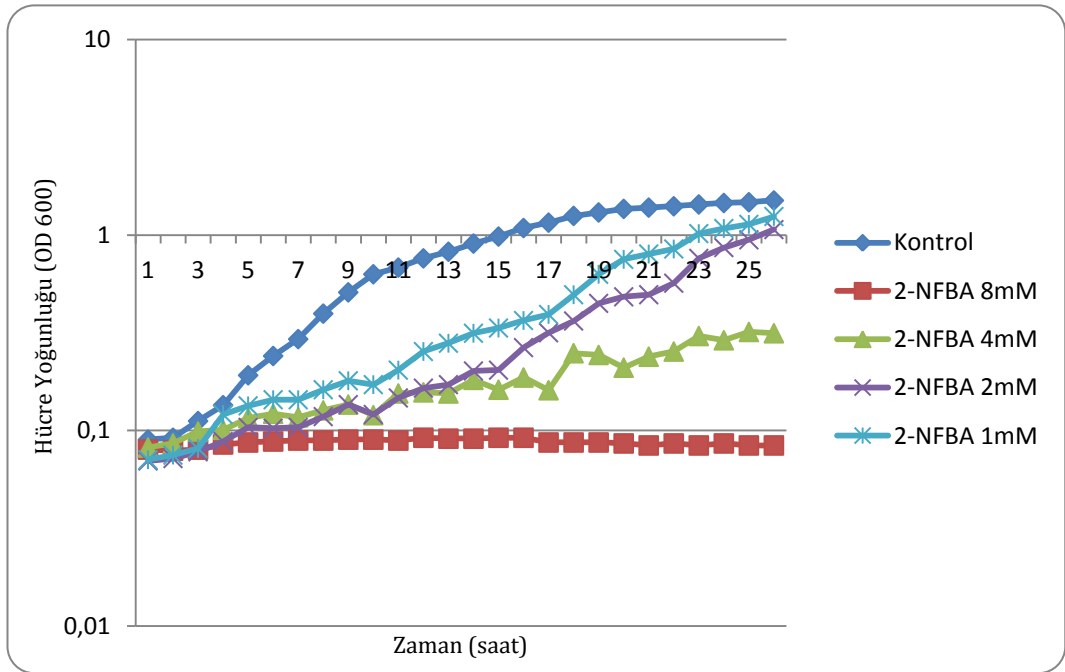
Şekil 4.2. (1) 2-NFBA, (2) 4-BFBA, (3) 4-KFBA, (4) 4-FLFBA, (5) 4-FFBA, (6) 4-MFBA, (7) MBA, (8) FBA moleküllerinin *C. violaceum* CV 026'da pigment üretimine etkisinin agar üzerindeki görüntüsü (K) Patulin

4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenen Örnekler

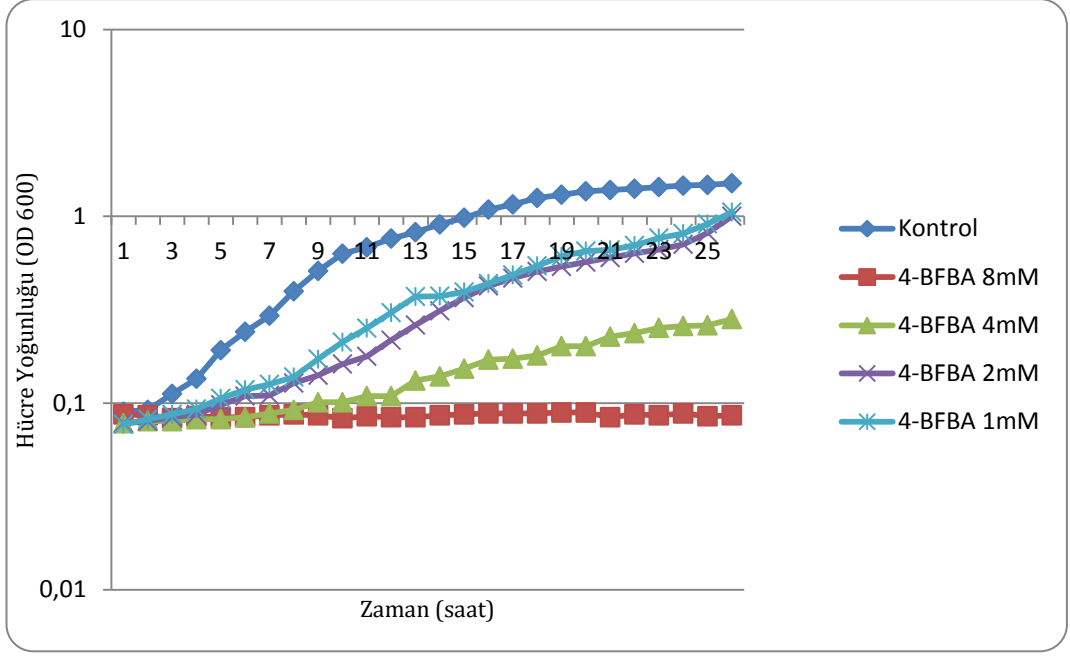
Derişimleri 55,500mM, 27,750mM, 13,875mM, 6,937mM, 3,468mM, 1,734mM, 0,867mM ve 0,433mM olacak şekilde seyreltmeleri yapılan 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asitin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak *P. aeruginosa* PAO1 suşunda 2-Nitrofenilboronik asit için 27,75mM, 4-Bromofenilboronik asit için 3,468mM, 4-Klorofenilboronik asit için 3,468mM, 4-Fluorofenilboronik asit için 13,875mM, 4-Formilfenilboronik asit için >55,500mM, 4-Metoksifenilboronik asit için 27,750mM, Metilboronik asit için >55,500mM ve Fenilboronik asit için 27,750mM seviyelerinde inhibisyon etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

4.3. Gelişme Eğrileri

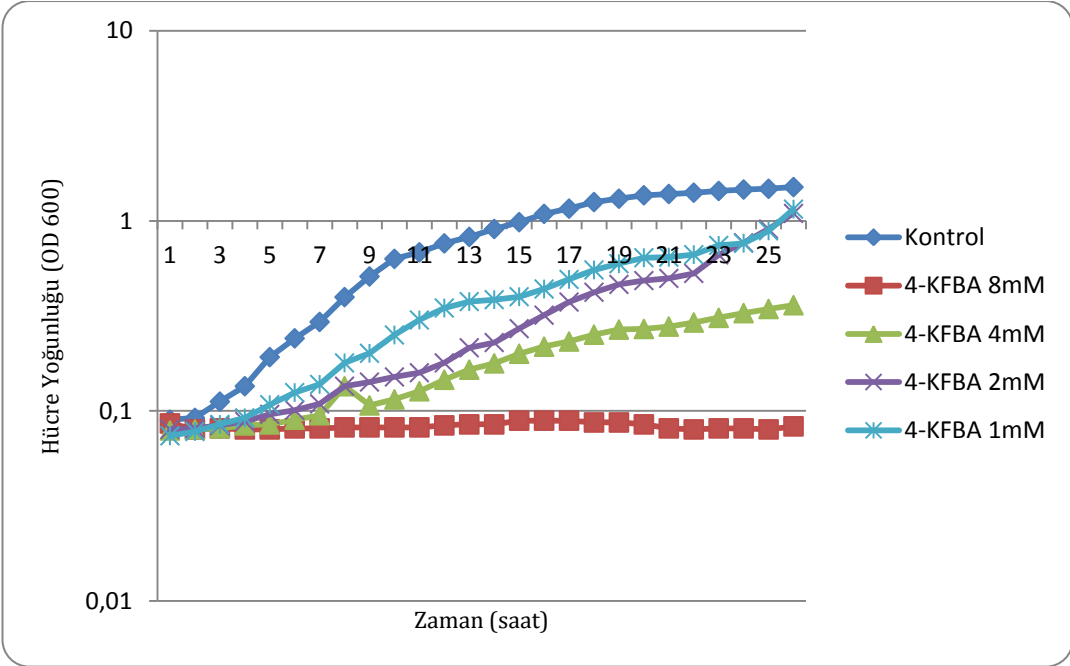
2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin çalışma sırasında kullanılacak derişimlerinin belirlenmesi amacıyla mikropkaya okuyucu kullanılarak ölçüm yapılmış ve gelişme eğrileri oluşturulmuştur. OD600 nm'de 24 saat sonunda tespit edilen sonuçlara göre 2 mM ve altındaki değerler üremenin baskılanmadığı değerler olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Çalışmada kullanılacak olan derişim (2mM) bu sonuçlara göre belirlenmiştir.



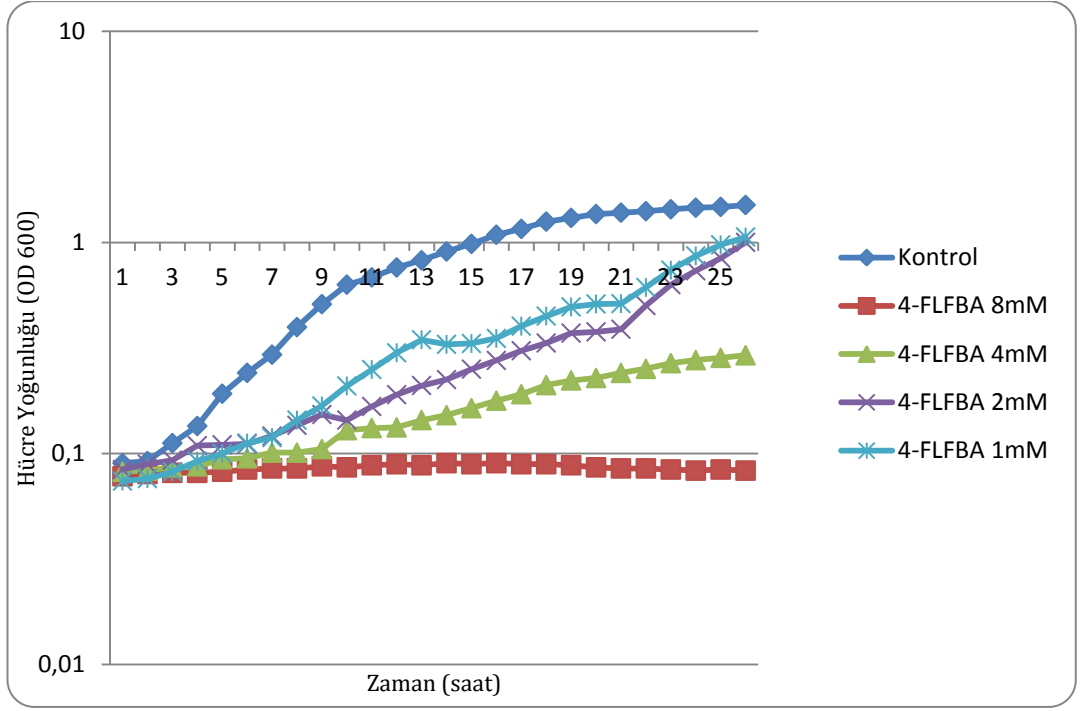
a)



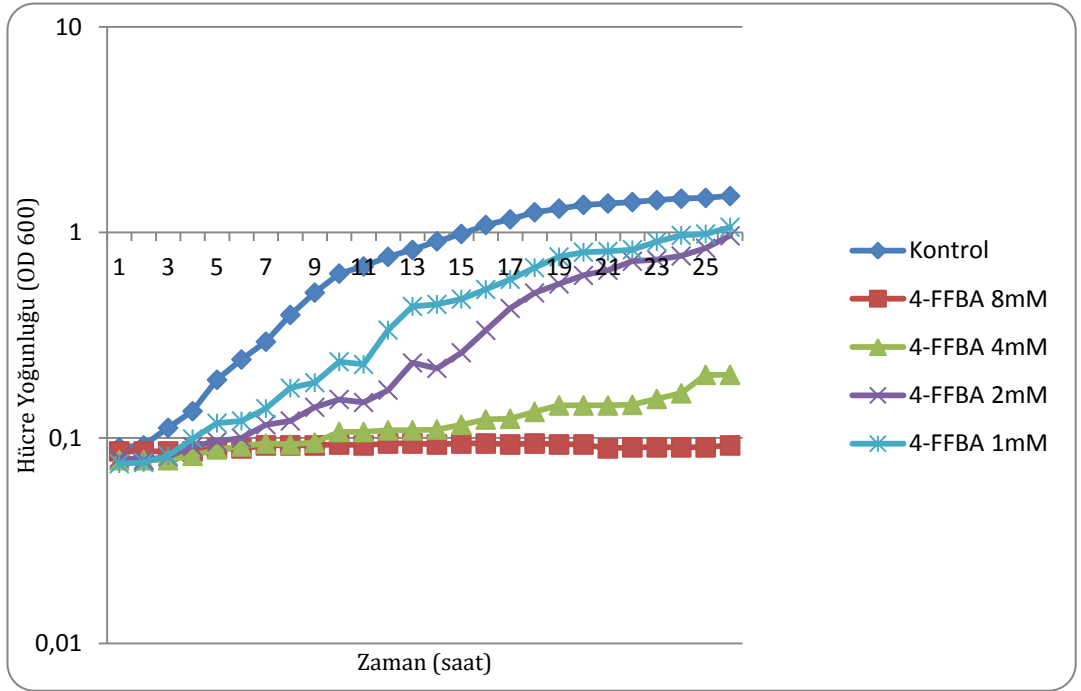
b)



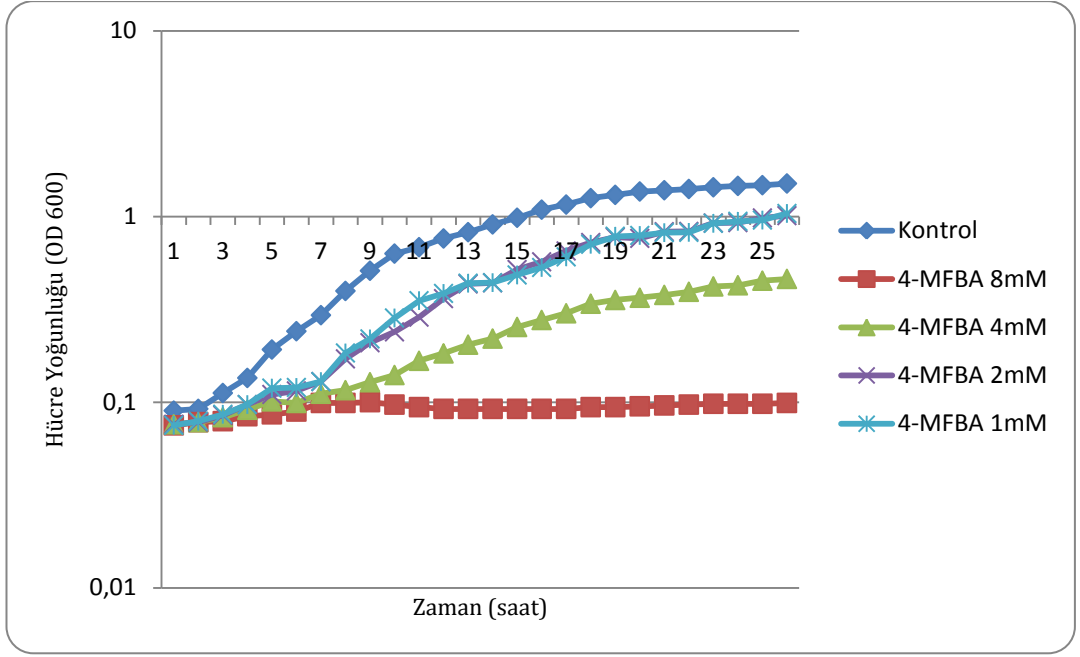
c)



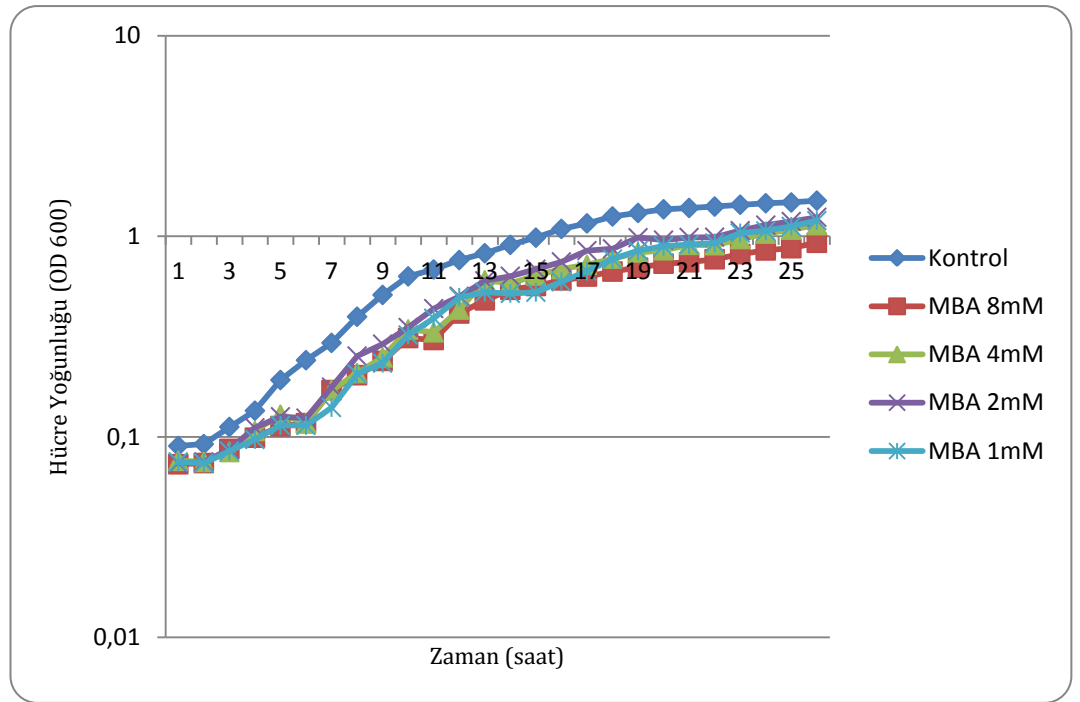
d)



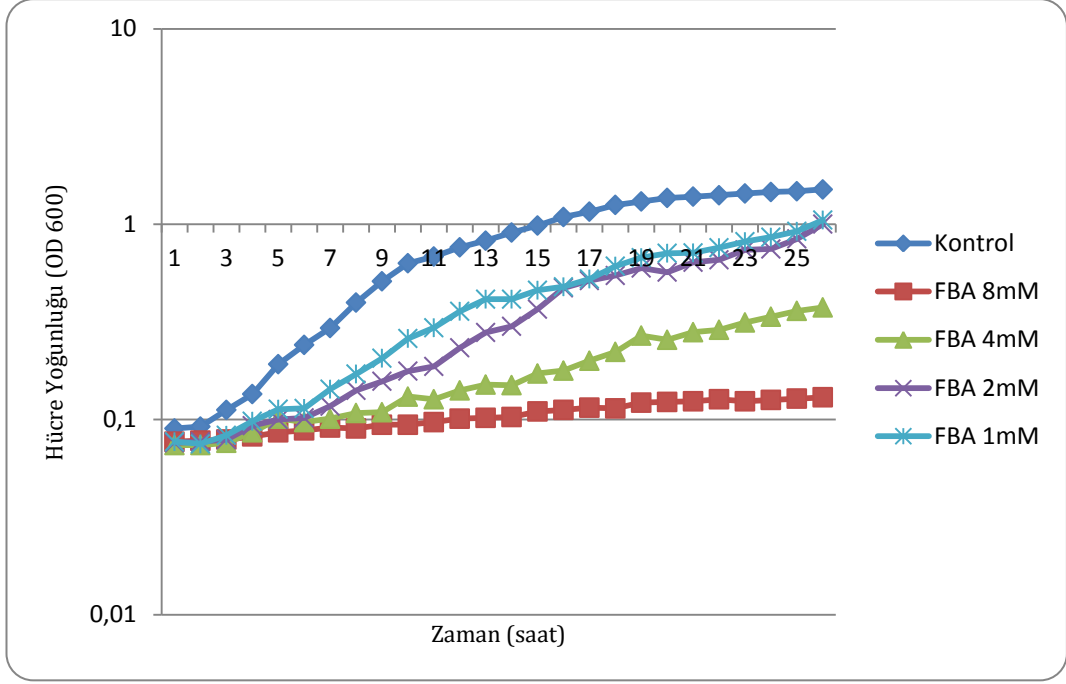
e)



f)



g)



Şekil 4.3. Çalışılan boronik asit türevi moleküllerin *P.aeruginosa* PA01 suşunun gelişimi üzerine etkisi. a) 2-NFBA, b) 4-BFBA, c) 4-KFBA, d) 4-FLFBA, e) 4-FFBA, f) 4-MFBA, g) MBA, h) FBA

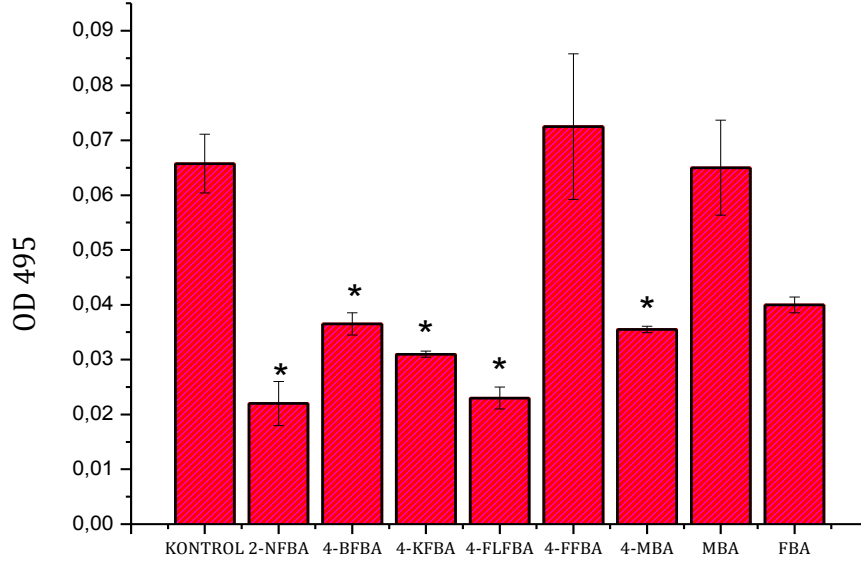
4.4. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Elastaz Üretimine Etkisi

Elastaz, elastin ve kollajen gibi okaryotik proteinleri parçalayan ve insan immunoglobulin G hücrelerini inaktive eden bir metalloproteazdır (Hamood vd., 1996). Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, LasR-LasI çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir (Passador vd, 1993).

Elastaz üretimi için 2mM derişimde 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit varlığında *P. aeruginosa* PA01 suşu ve *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK04 klinik izolatları üzerinde inhibisyon etkileri test edilmiştir.

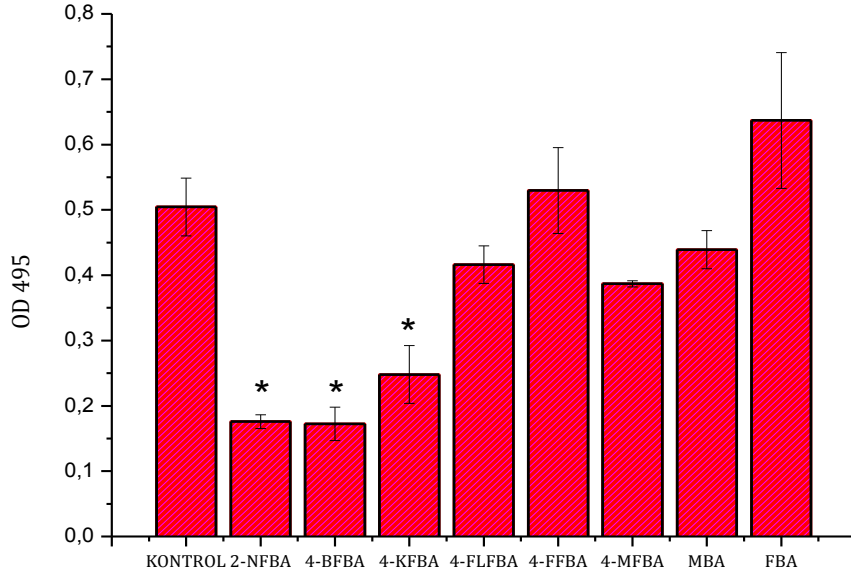
P. aeruginosa PA01 suşunun elastaz üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler

arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %67, 4-BFBA %44, 4-KFBA %53, 4-FFBA %65 ve 4-MFBA %46 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.4).



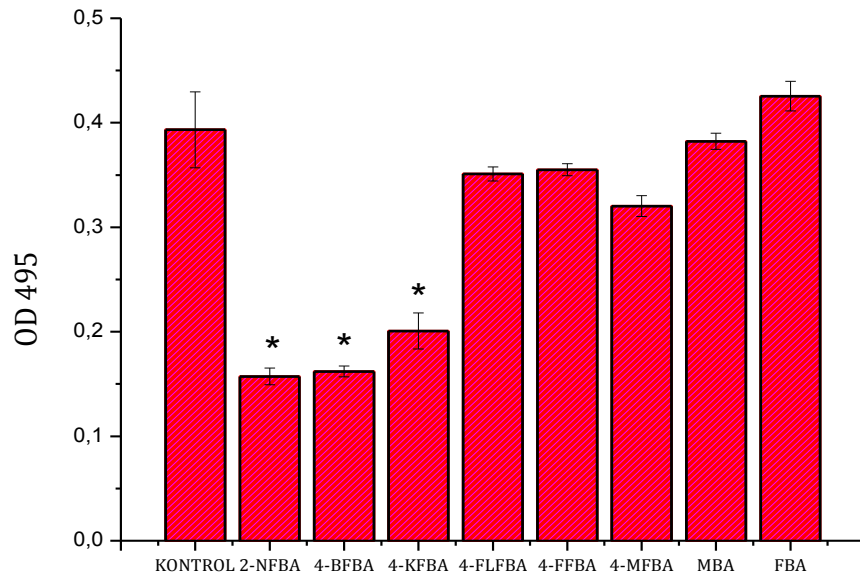
Şekil 4.4. *P. aeruginosa* PA01 suşunun elastaz üretimi

P. aeruginosa PAK01 izolatının elastaz üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %65, 4-BFBA %66 ve 4-KFBA %51 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.5).



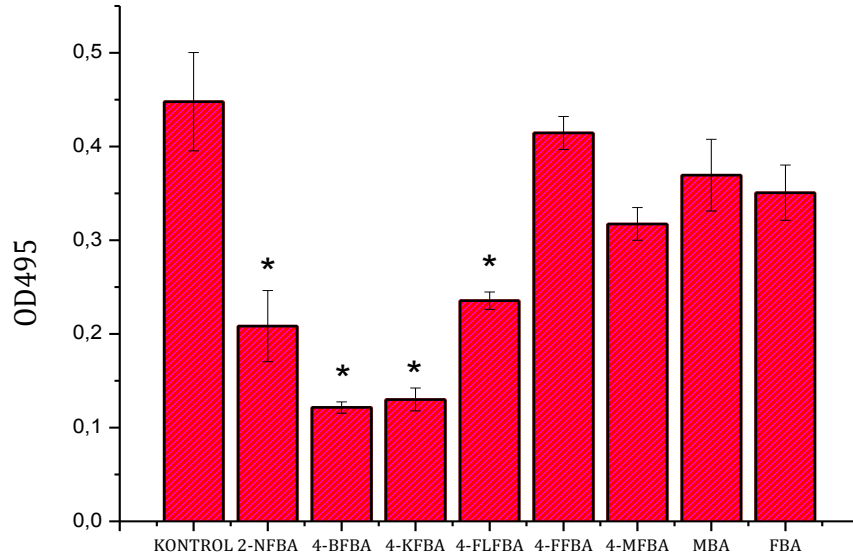
Şekil 4.5. *P. aeruginosa* PAK01 izolatının elastaz üretimi

P. aeruginosa PAK02 izolatının elastaz üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %60, 4-BFBA %59 ve 4-KFBA %49 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.6).



Şekil 4.6. *P. aeruginosa* PAK02 izolatının elastaz üretimi

P. aeruginosa PAK04 izolatının elastaz üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %53, 4-BFBA %73, 4-KFBA %71 ve 4-FLFBA %47 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.7).



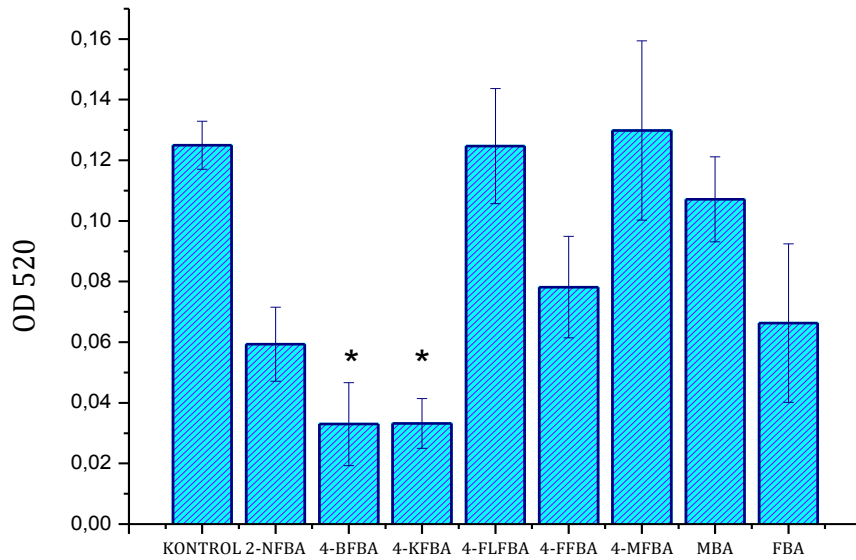
Şekil 4.7. *P. aeruginosa* PAK04 izolatının elastaz üretimi

4.5. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Piyosiyanın Üretimine Etkisi

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyel kolonilere mavi-yeşil renk veren çözünebilir fenazin türevi bir pigment olan piyosiyanini üretme özelliğine sahiptir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyanın 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).

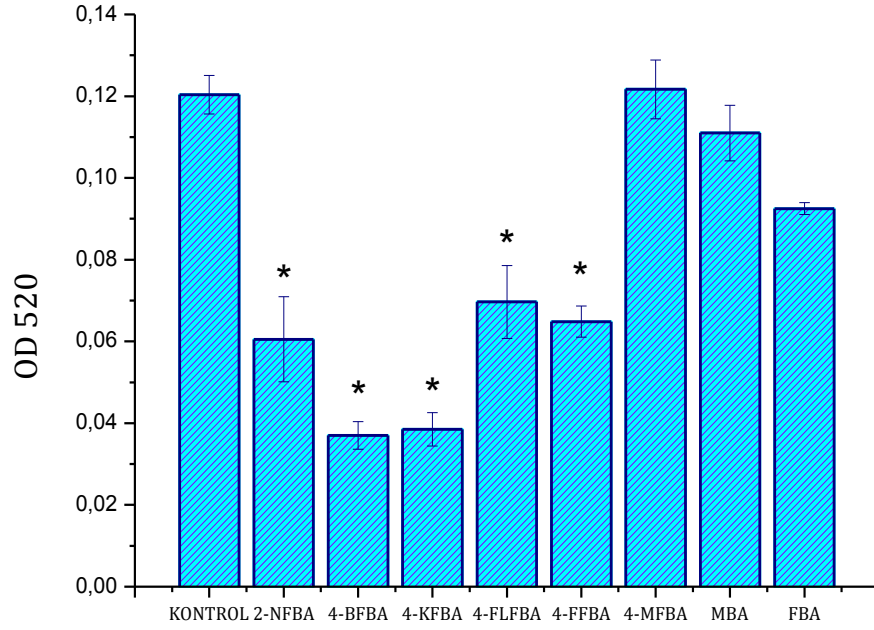
Piyosiyenin üretimi için 2mM derişimde 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit varlığında *P. aeruginosa* PA01 suşu ve *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK04 izolatları üzerinde inhibisyon etkileri test edilmiştir.

P. aeruginosa PA01 suşunun piyosiyenin üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 4-BFBA %74 ve 4-KFBA %73 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.8).



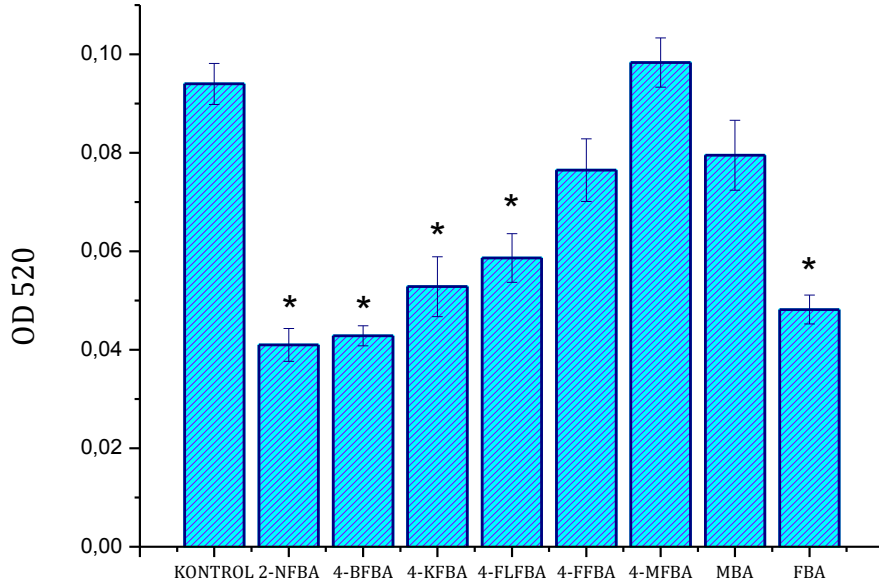
Şekil 4.8. *P. aeruginosa* PA01 suşunun piyosiyenin üretimi

P. aeruginosa PAK01 izolatının piyosiyenin üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %50, 4-BFBA %69, 4-KFBA %68, 4-FLFBA %42 ve 4-FFBA %46 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.9).



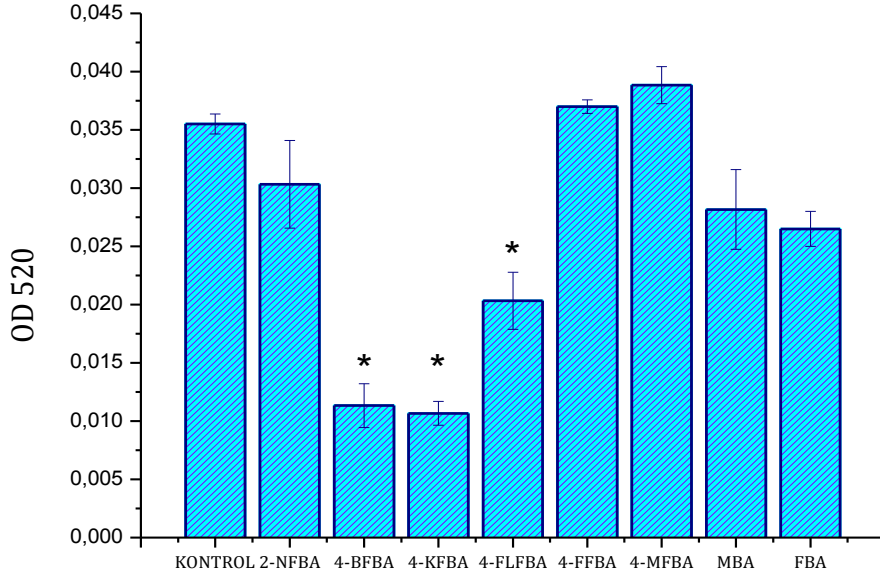
Şekil 4.9. *P. aeruginosa* PAK01 izolatının piyosiyanın üretimi

P. aeruginosa PAK02 izolatının piyosiyanın üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %56, 4-BFBA %54, 4-KFBA %44, 4-FLFBA %38 ve FBA %49 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.10).



Şekil 4.10. *P. aeruginosa* PAK02 izolatının piyosiyanın üretimi

P. aeruginosa PAK04 izolatının piyosiyanın üretimi 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 4-BFBA %68, 4-KFBA %70 ve 4-FLFBA %43 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.11).



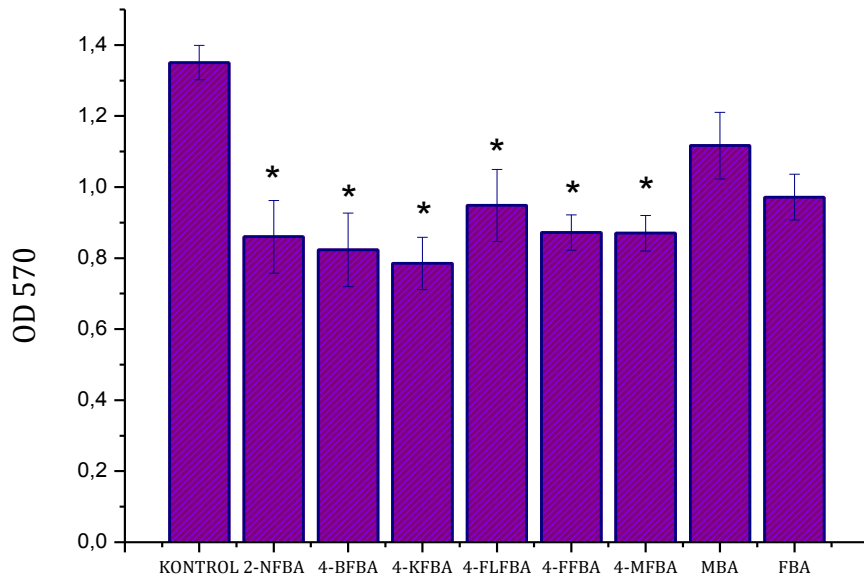
Şekil 4.11. *P. aeruginosa* PAK04 izolatının piyosiyanın üretimi

4.6. Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Biyofilm Oluşturulmasına Etkisi

Mikrobiyel hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskopik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 μm yükseklikte koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz ve giderilmesi çok zor olan yapıya biyofilm denir (Donlan, 2002). Planktonik bakterilerin sebep olduğu akut enfeksiyonlar antibiyotiklerle tedavi edilebilirken, biyofilm oluşturan bakteri enfeksiyonlarının tedavisi zor olup kronikleşmektedir (Bjarnsholt, vd., 2010). Biyofilm oluşumu las sistemi kontrolünde gerçekleşir (De Kievit vd., 2001). Biyofilm üretimi için 2mM derişimde 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-

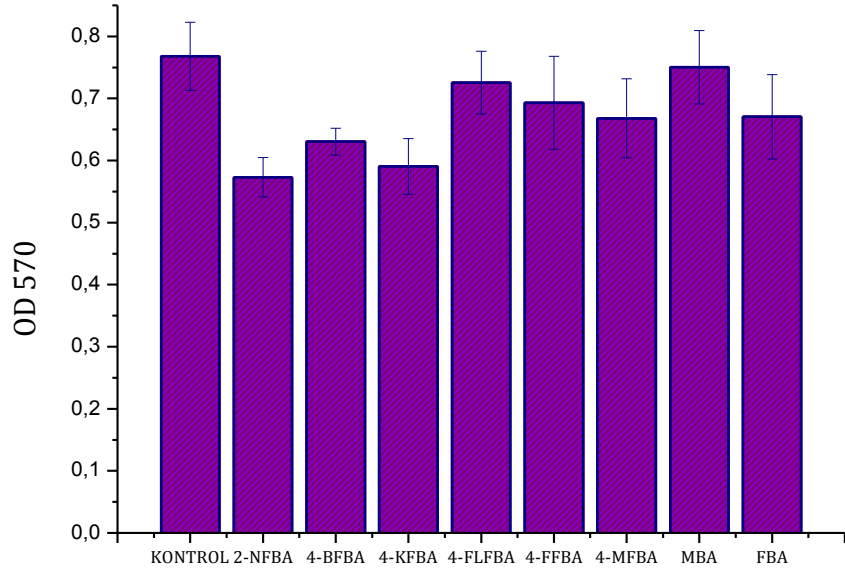
Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit varlığında *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PAK1, *P. aeruginosa* PAK2 ve *P. aeruginosa* PAK4 suşları üzerinde inhibisyon etkileri test edilmiştir.

P. aeruginosa PA01 suşunun biyofilm oluşturmasında 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %36, 4-BFBA %39, 4-KFBA %42, 4-FLFBA %30, 4-FFBA %35 ve 4-MFBA %36 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.12).



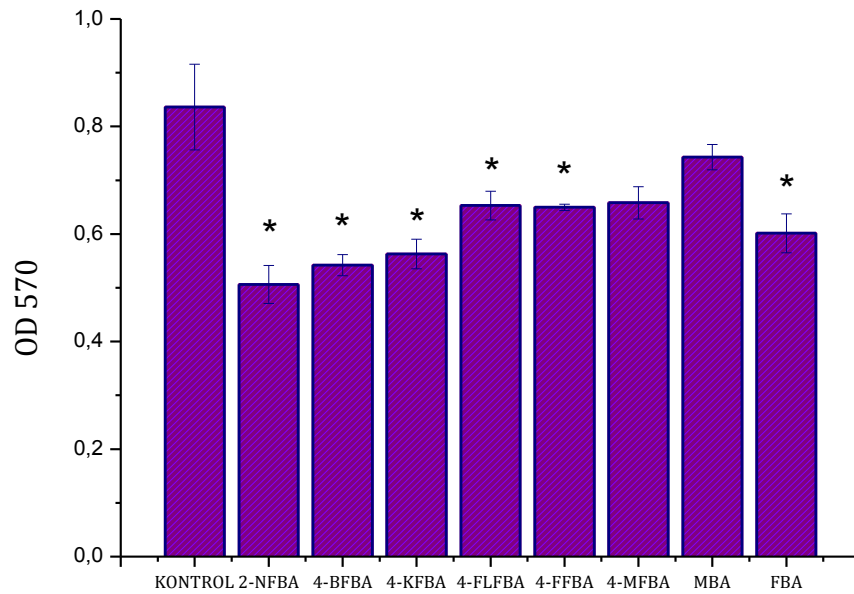
Şekil 4.12. *P. aeruginosa* PA01 suşunun biyofilm oluşumu

P. aeruginosa PAK01 izolatının biyofilm oluşturmasında 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu izolat için istatistiksel analiz sonucunda etkili bir inhibisyon değeri tespit edilememiştir (Şekil4.13).



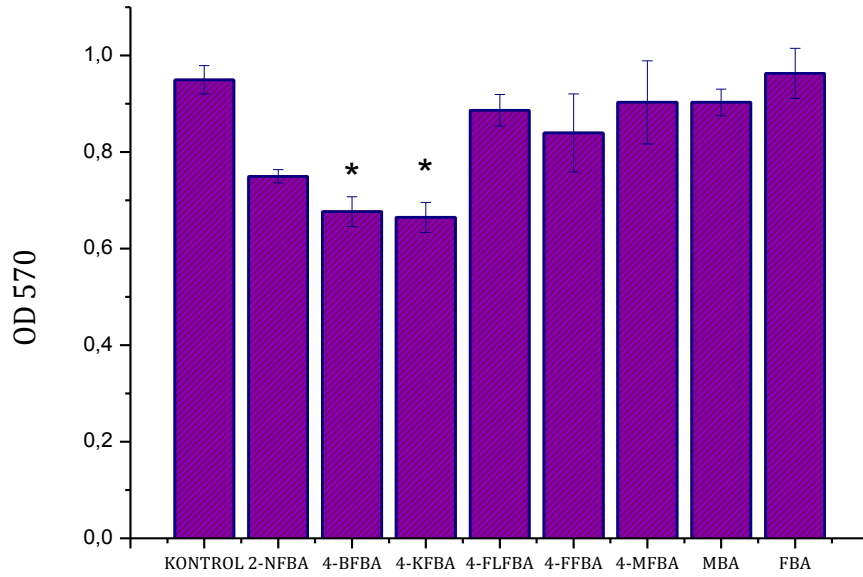
Şekil 4.13. *P. aeruginosa* PAK01 izolatının biyofilm oluşumu

P. aeruginosa PAK02 izolatının biyofilm oluşturmasında 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %39, 4-BFBA %35, 4-KFBA %33, 4-FLFBA %22, 4-FFBA %22 ve FBA %28 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.14).



Şekil 4.14. *P. aeruginosa* PAK02 izolatının biyofilm oluşumu

P. aeruginosa PAK04 izolatının biyofilm oluşturmasında 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 4-BFBA %29 ve 4-KFBA %30 olarak tespit edilmiştir (şekil4.15).

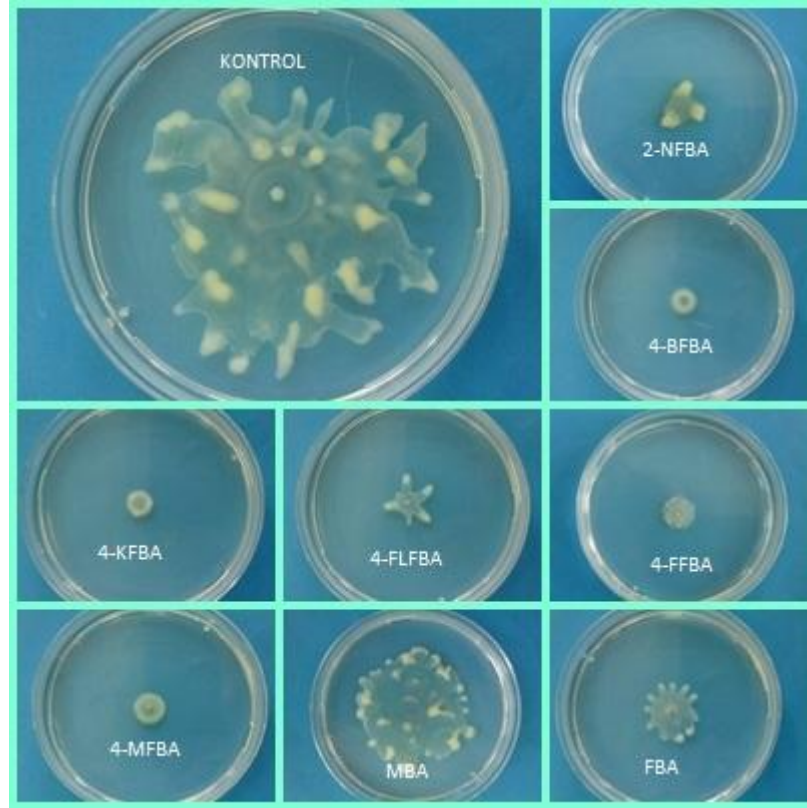


şekil 4.15. *P. aeruginosa* PAK04 izolatının biyofilm oluşumu

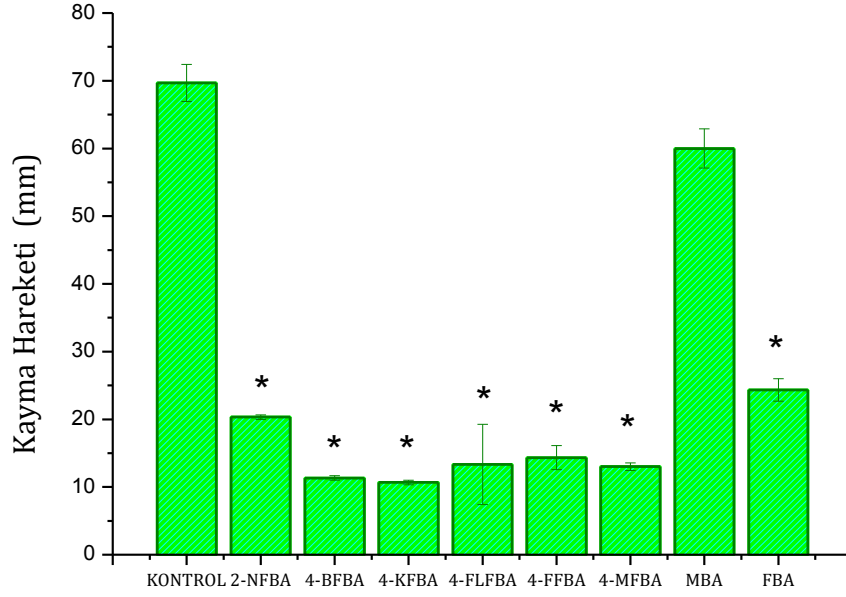
4.7. Çalışılan Boronik Asit Türevi Moleküllerin Bakteriyel Suşlardaki Kayma Hareketine Etkisi

Flagellasının yapısındaki tip-IV pili ve rhamnolipit üretimi sayesinde *P. aeruginosa* kayma hareketi yapabilmektedir. Bunlardan birisinin eksikliği *P. aeruginosa* PAO1'in bu tür hareketi gerçekleştirmemesine neden olmaktadır (Kohler vd, 2000). Kayma hareketi aktivitesi için 2mM derişimde 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit varlığında *P. aeruginosa* PAO1 suşu ve *P. aeruginosa* PAK01, *P. aeruginosa* PAK02, *P. aeruginosa* PAK04 izolatları üzerinde inhibisyon etkileri test edilmiştir.

P. aeruginosa PA01 suşunun kayma hareketi faaliyetinin 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %71, 4-BFBA %84, 4-KFBA %85, 4-FLFBA %81, 4-FFBA %79, 4-MFBA %86 ve FBA %65 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.16).



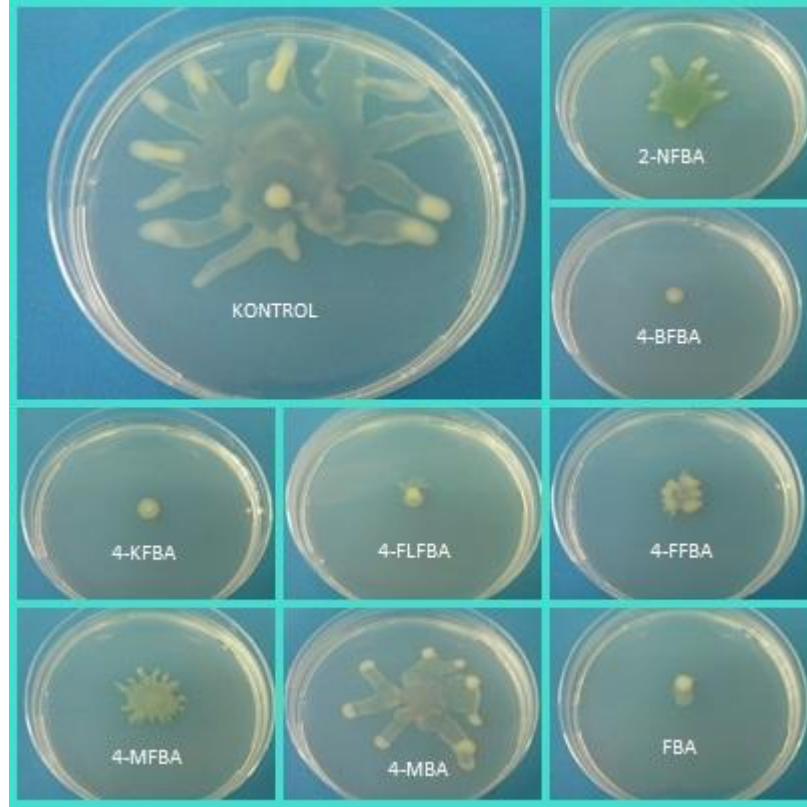
a)



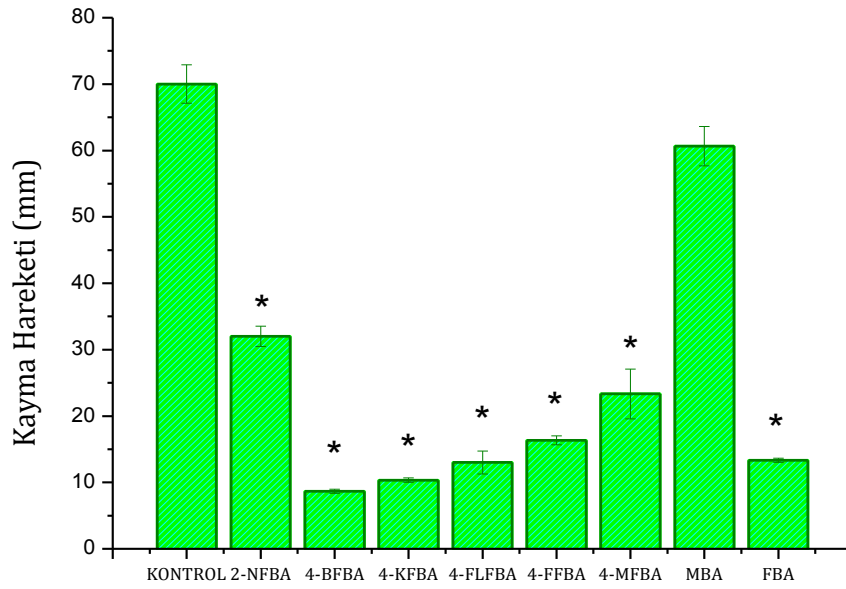
b)

Şekil 4.16. a) *P. aeruginosa* PA01 suşunun kayma hareketi petri görüntüleri b) *P. aeruginosa* PA01 suşunun kayma hareketi

P. aeruginosa PAK01 izolatının kayma hareketi faaliyetinin 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %54, 4-BFBA %88, 4-KFBA %85, 4-FLFBA %81, 4-FFBA %77, 4-MFBA %67 ve FBA %81 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.17).



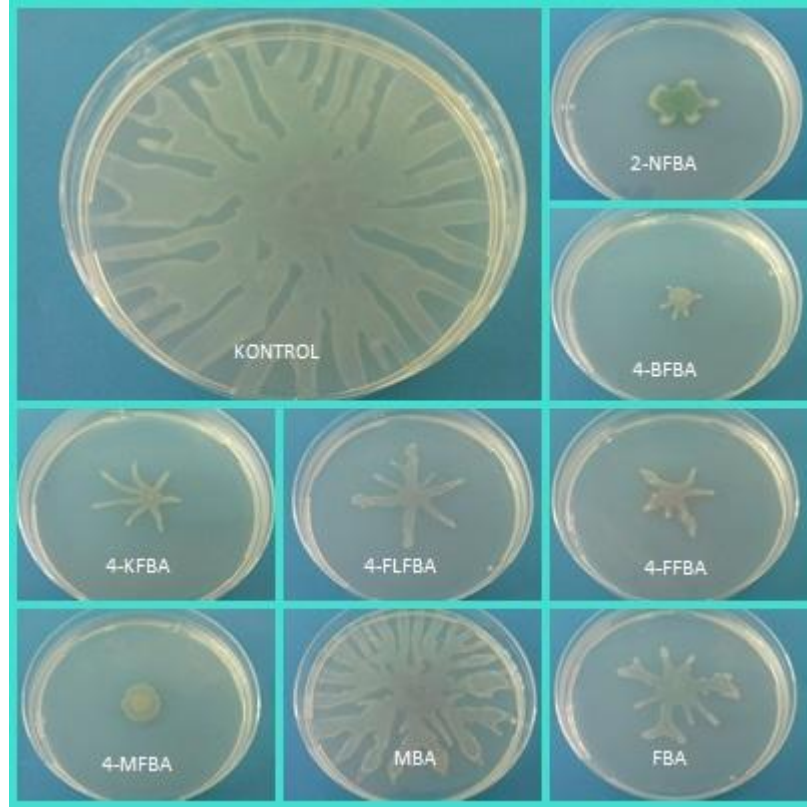
a)



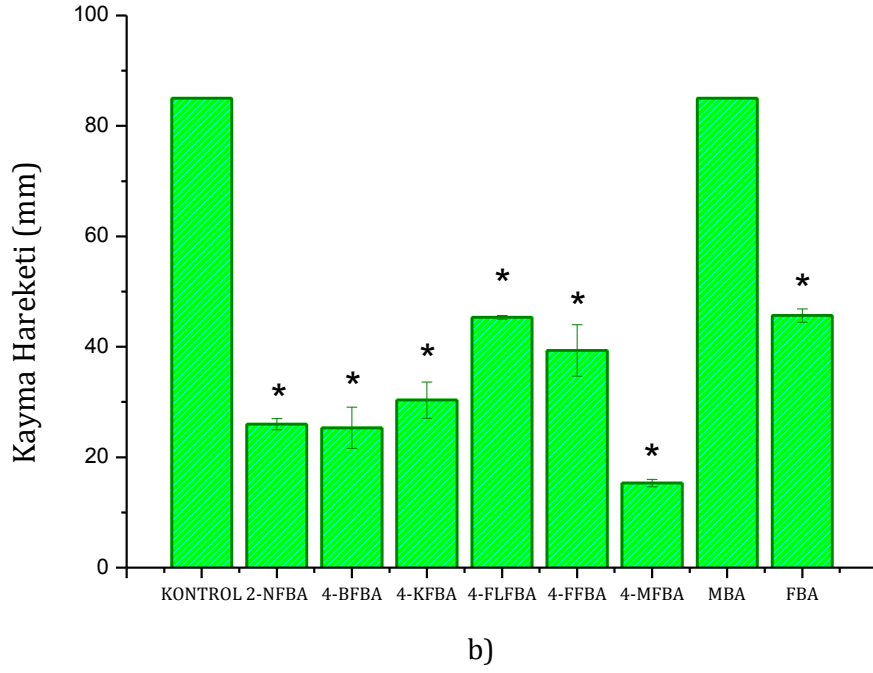
b)

Şekil 4.17. a) *P. aeruginosa* PAK01 izolatının kayma hareketi petri görüntüleri b) *P. aeruginosa* PAK01 izolatının kayma hareketi

P. aeruginosa PAK02 izolatının kayma hareketi faaliyetinin 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %69, 4-BFBA %70, 4-KFBA %64, 4-FLFBA %47, 4-FFBA %54, 4-MFBA %82 ve FBA %46 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.18).

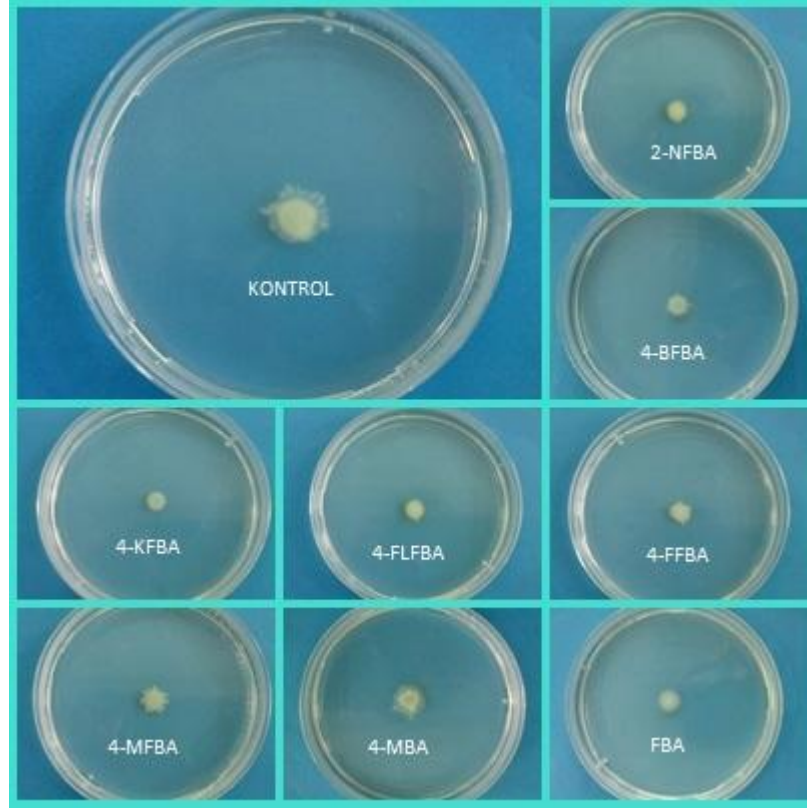


a)

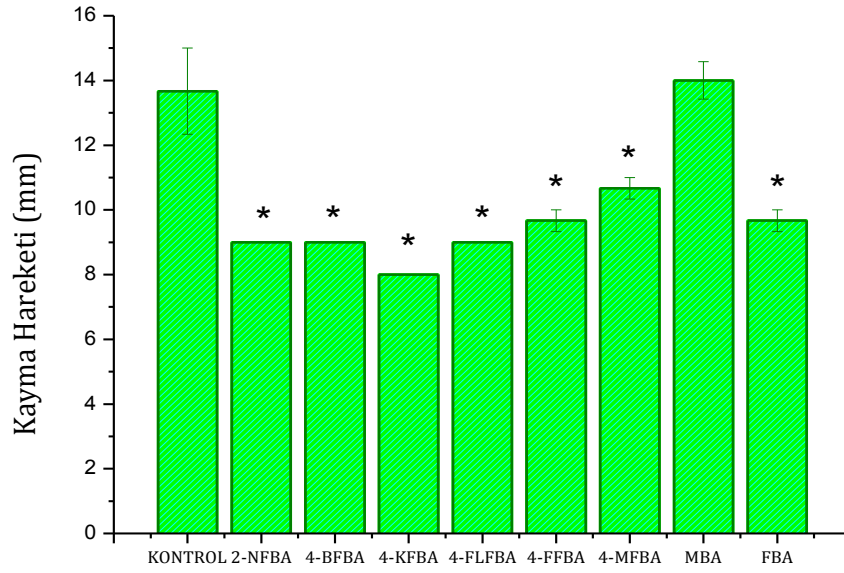


Şekil 4.18. a) *P. aeruginosa* PAK02 izolatının kayma hareketi petri görüntüleri b) *P. aeruginosa* PAK02 izolatının kayma hareketi

P. aeruginosa PAK04 izolatının kayma hareketi faaliyetinin 2mM seviyesindeki inhibisyon değerleri One-Way Anova ile analiz edilmiş ve kontrol ile inhibitör maddeler arasındaki fark $p \leq 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlar (*) ile işaretlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda en etkili inhibisyon değerleri 2-NFBA %34, 4-BFBA %34, 4-KFBA %41, 4-FLFBA %34, 4-FFBA %29, 4-MFBA %22 ve FBA %29 olarak tespit edilmiştir (Şekil4.19).



a)



b)

Şekil 4.19. a) *P. aeruginosa* PAK04 izolatının kayma hareketi petri görüntüleri b) *P. aeruginosa* PAK04 izolatının kayma hareketi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Birçok mikroorganizma türü sosyal bir davranış göstererek üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleriyle iletişim kurmakta, hücre sayılarının belirli bir eşik değere ulaşip ulaşmadıklarını izlemekte ve yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda da virülans faktörlerinin sentezi gibi kritik özellikleri kodlayan gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylelikle, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak başarılı bir enfeksiyon sürecini oluşturmaktadır. Öte yandan, çevreyi algılama sistemi molekülleri aracılığı ile kontrol edilen iletişimin bozulması durumunda ise mikroorganizmaların koordineli davranamayacakları ve başarılı bir enfeksiyon süreci ortaya koyamayacakları açıktır. Bu yüzden bakterilerin birbirleri ve konak ile iletişimini önlemek, başka bir deyişle QS sistemini inhibe etmenin daha etkili bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılan araştırmaların başlıca amacı, sinyal molekülünün sentezini inhibe ederek konsantrasyonunu düşürmek, sinyal molekülünü hidrolize etmek veya sinyal molekülünün hedef genlerin ekspresyonunu aktive etmesini önlemek olarak sayılabilir (Camara vd., 2002).

İnsanlarda farklı tipte pek çok enfeksiyona neden olan *P. aeruginosa*'nın virülens mekanizması da sinyal moleküllerinin üretimi aracılığı ile çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle *P. aeruginosa* suşlarında bu sinyal moleküllerinin üretimi virülens faktörlerinin üretilmesi enfeksiyonun oluşturulması açısından önem taşımaktadır.

Şimdiye kadar yapılan bazı çalışmalarla *P. aeruginosa*'da ve diğer bazı önemli patojen bakterilerde çevreyi algılama sistemini (QS) bloke eden bazı maddeler tanımlanmıştır. Ancak bu maddelerin konak için toksik olması veya konak tarafından tolere edilemeyecek konsantrasyonlarda etkili olmaları sebebiyle tedavide kullanılmaları mümkün değildir. Tanımlanmış çevreyi algılama sistemi inhibitörü bileşenlerin çoğu insan kullanımına uygun değildir. Toksikite ve in vivo testleri potansiyel adayları azaltmıştır. Örneğin; halojenlenmiş furanonlar

son derece toksik ve reaktif olmaları sebebiyle endüstride, tıpta ve tarımda kullanımları mümkün değildir.

Bu durum araştırmacıları konak için toksik olmayacak yeni çevreyi algılama sistemi inhibitörlerinin araştırılmasına sevketmiştir.

Yapılan bazı çalışmalar; bor bileşiklerinin bakteri, küf, maya ve virüslere karşı bakteriyostatik, bakterisidal, fungistatik, fungisidal ve antiviral etkilerinin olduğunu ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceklerini göstermektedir (Kahyaoğlu vd., 2009).

Borik asit esterlerinin, mikroorganizmalara ait pek çok esansiyel enzimi inhibe ettikleri gösterilmiştir (Groziak, 2001). Boronik asitler, açıl gruplarının transferinde rol alan enzimleri, özellikle de hidrolazları; kimotripsin, tripsin, trombin ve diğer proteazları inhibe ederler (Myung vd., 2001). Ancak boronik asitlerin, *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi üzerine etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında boronik asit türevi olan 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit molekülleri, biyosensör suşlarla yapılan testler sonucunda potansiyel inhibitör adayları oldukları tespit edilmiş ve fırsatçı bir insan patojeni olan *P. aeruginosa* PA01 suşu, *P. aeruginosa* PAK01, PAK02 ve PAK04 klinik izolatlarının virülens faktörlerinin (elastaz ve piyosiyenin) üretimi, biyofilm oluşturması ve kayma hareketi faaliyeti üzerine etkileri incelenmiştir.

Çevreyi algılama taraması için tüm hücrelerde çok yararlı ve pratik bir yaklaşım olan özel indikatör suşlar kullanılarak yapılan fenotipik biyotestlerinden yararlanılmaktadır. Bu testler oldukça hassastır ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography [HPLCs]) ile sıvı kromatografi kütle spektrometresi (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [LCMS]) gibi cihazların kullanımını gerektirmez (Kawaguchi vd., 2008).

Bu çalışmada da bakterilerki çevreyi algılama sistemine boronik asit türevi moleküllerin potansiyel etkisi, indikatör suşlar kullanılarak araştırılmıştır.

Elastaz ile çevreyi algılama sistemi arasındaki ilişki pek çok çalışmanın konusu olmuştur. Pesci vd. (1996), *P. aeruginosa*'da las ve rhl sistemleri ile düzenlenen kinolon sinyal iletim yolunun elastaz üretimini kontrol ettiğini göstermişlerdir. Bunun yanında çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu ile elastaz üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Pechere, 2001; Reimann vd., 2002). Bu Tez çalışmasında ise 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asitin *P. aeruginosa* PAO1 suşunda, *P. aeruginosa* PAK01, PAK02 ve PAK04 klinik izolatlarında elastaz üretimi üzerine etkileri 2mM derişimde incelenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşunun ve *P. aeruginosa* PAK02 klinik izolatlarının elastaz üretimi üzerine en fazla inhibitör etkiye 2-Nitrofenilboronik asitin neden olduğu gözlenmiştir. 2-Nitrofenilboronik molekülünün, *P. aeruginosa* PAO1 suşunda, ve *P. aeruginosa* PAK02 klinik izolatında elastaz üretimine inhibisyon oranları sırasıyla %67 ve %60 olmuştur. *P. aeruginosa* PAK01 ve PAK04 klinik izolatında ise elastaz üretimi üzerine en yüksek inhibisyon etkisini sırasıyla %66 ve %73 oranları ile 4-Bromofenilboronik asit göstermiştir.

Piyosiyanın üretimi ile çevreyi algılama sistemi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bir çevreyi algılama sistemi inhibitörü olan N-oktanoyil siklopentilamid (C8-CPA) kullanılarak yapılan bir çalışmada HSL üretimi yanında elastaz, rhamnolipid ve piyosiyanın gibi virülens faktörlerinin üretiminin de engellendiği gösterilmiştir (Ishida vd., 2007). Benzer şekilde Dietrich ve arkadaşları (Dietrich vd., 2006) piyosiyanınin çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilen genlerin regülasyonunda bir sinyal molekülü olarak görev aldığını göstermiştir. Bu Tez çalışmasında 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asitin *P. aeruginosa* PAO1 suşunda, *P. aeruginosa* PAK01, PAK02 ve PAK04 klinik izolatlarında piyosiyanınin üretimi üzerine etkileri 2mM derişimde

incelenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşu, *P. aeruginosa* PAK01 ve PAK04 klinik izolatlarında en yüksek inhibisyon 4-Bromofenilboronik asit ve 4-Klorofenilboronik asit moleküllerinde gözlenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşunda piyosiyanın üretimi için inhibisyon değerleri 4-Bromofenilboronik asit için %74 ve 4-Klorofenilboronik asit için %73, *P. aeruginosa* PAK01 izolatında 4-Bromofenilboronik asit için %69 ve 4-Klorofenilboronik asit için %68, PAK04 izolatında 4-Bromofenilboronik asit için %68 ve 4-Klorofenilboronik asit için %70 olarak tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK02 izolatı için ise inhibisyon değerleri 2-Nitrofenilboronik asit için %56 ve 4-Bromofenilboronik asit için %54 oranında olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlara göre *P. aeruginosa* PA01 suşu ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarında inhibisyon değerleri birbirine yakın olmakla birlikte piyosiyanın üretimi için en etkili inhibitör moleküllerin 4-Bromofenilboronik asit ve 4-Klorofenilboronik asit olduğu ve bu moleküllerin çalışılan diğer boronik asit türevi moleküllere göre daha yüksek oranda inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir.

Son yıllarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının gelişmesinde biyofilm oluşumu önemli rol oynamakta ve nozokomiyal enfeksiyonlarda gittikçe artan morbitide ve mortaliteye sebep olmaktadır. Bakteriyel biyofilmler özellikle diş çürükleri ve osteomyelit gibi birçok enfeksiyondan sorumludur. Bakteriyel biyofilmlerlerin 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. Bu çalışmada da 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit, 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunda, *P. aeruginosa* PAK01, PAK02 ve PAK04 klinik izolatlarında biyofilm oluşumu üzerine etkileri 2mM derişimde incelenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşunda ve *P. aeruginosa* PAK04 klinik izolatında biyofilm oluşumunu en fazla inhibe eden molekülün 4-Klorofenilboronik asit olduğu ve

inhibisyon değerlerinin sırasıyla %42 ve %44 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK02 izolatında en etkili molekülün %39 inhibisyon oranıyla 4-Bromofenilboronik asit olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK01 izolatında ise inhibisyon etkileri araştırılmış ancak etkili bir inhibisyon tespit edilememiştir.

P. aeruginosa üç tip hareket göstermektedir. Sıvı ortamda flagella yardımı ile olan hareketi yüzme, katı yüzeyde tip IV pili yardımı ile olan hareketi titreme, yarı katı ortamda her iki hareket tipinin kombinasyonu ve biyosurfaktan görevi yapan ramnolipid yardımı ile olan hareketi ise kayma olarak adlandırılır. Bu motilite fonksiyonları bakterinin yüzeye yapışması ve kolonizasyonu için gereklidir (O'Toole ve Kolter., 1998). Çevreyi algılama sistemi ile motilite arasındaki düzenleyici ilişki daha önce de incelenmiştir. Reimmann ve arkadaşları HSL blokajı yapılan *P. aeruginosa* suşlarında kayma hareketinin engellendiğini ancak yüzme ve titreme hareketinin mevcut olduğunu ve bakterilerin kolonize olabildiğini göstermişlerdir. Bu Tez çalışmasında da 2-Nitrofenilboronik asit, 4-Bromofenilboronik asit, 4-Klorofenilboronik asit , 4-Fluorofenilboronik asit, 4-Formilfenilboronik asit, 4-Metoksifenilboronik asit, Metilboronik asit ve Fenilboronik asit moleküllerinin *P. aeruginosa* PA01 suşunda, *P. aeruginosa* PAK01, PAK02 ve PAK04 klinik izolatlarında kayma hareketi faaliyeti üzerine etkileri 2mM derişimde incelenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşunda, *P. aeruginosa* PAK01 ve PAK02 izolatlarında metilboronik asit dışındaki tüm moleküllerde kayma hareketinde yüksek oranda inhibisyon gözlemlenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşu için kayma hareketi inhibisyonunda en etkili moleküllerin 4-BFBA, 4-KFBA ve 4-MFBA'tin olduğu ve inhibisyon yüzdelerinin sırasıyla %84, %85 ve %86 olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK01 izolatında kayma hareketi inhibisyonunda en etkili moleküller 4-Bromofenilboronik asit ve 4-Klorofenilboronik asitin olduğu ve inhibisyon oranlarının sırasıyla %88 ve %85 olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK02 izolatı için en etkili molekülün %82 inhibisyon oranıyla 4-Metoksifenilboronik asitin olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* PAK04 izolatında ise en etkili inhibisyon %41 oranıyla 4- Klorofenilboronik asit molekülünde gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında *P. aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi tarafından üretimi kontrol edilen çeşitli virülens faktörleri üzerine inhibisyon etkisi tespit edilen boronik asit türevi moleküller ile ilgili daha önce mevcut bilgi bulunmamaktadır. Bu sonuçlar ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir. Ancak bu moleküllerin çevreyi algılama sistemi üzerinde nasıl bir mekanizma ile inhibisyon yaptığı henüz bilinmemektedir. Literatürde, Gram negatif bakterilerdeki çevreyi algılama sistemine ait çok sayıda yayın olmasına rağmen konunun bu yönü ile ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Bakterilerin her geçen gün antibiyotiklere gösterdikleri direnç ve özellikle bu direncin bakterilerde görülen bazı mekanizmalar dışında biyofilm oluşumu ile de artıyor olması bakterilerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Biyofilm oluşumunun enfeksiyon hastalıklarının % 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 kökenli akciğer enfeksiyonu olan hastalarda özellikle de kistik fibrozlu hastalarda ölümlere neden olmaktadır. Bunun yanında AIDS hastalarında, medikal implant uygulaması görülen hastalarda meydana gelen enfeksiyonlar 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 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.

Ayrıca Dünyanın en büyük bor rezervlerine sahip olan Türkiye, bor minerali ve ticari boratlar üretiminde belirli bir yerde olup jeopolitik konumu ve sahip olduğu diğer değerlerle birlikte düşünüldüğünde stratejik önemde bir kaynağın başında bulunmaktadır. Gerçek anlamda rekabet üstünlüğü için ancak yüksek katma değerde özellikli bor bileşiklerinde yoğunlaşmayı gerektirmektedir. Bu konu ise ağırlıklı olarak yüksek bilgi içeriği ve ileri teknoloji uygulamaları göz önünde bulundurulduğunda bilimsel-teknolojik yeteneğin yükseltilmesi ile mümkün görünmektedir (http 5). Yapılan bu tez çalışması ile bor ve bor türevi maddelerin geliştirilip kullanım alanlarının genişletilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Baker, S.J., Akama, T., Zhang, Y.K., sauro V., Pandit ., Singh, M.K., Khan, J., Plattener J.J., Benkoviç S.T., Lee, V., Maples K.R., 2006. Identification of a Novel Boron-Containing Antibacterial Agent (AN0128) with Anti-Inflammatory Acticity, fort the Potential Treatment of Cutaneous Diseases. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 16 (23), 5963-5967.
- Baskın, H., Mikroorganizmalarda kimyasal temelli sosyomikrobiyoloji: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama). *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 36(2), 111-115.
- Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion Microbiology*, 2, 582-587.
- Bazire, A., Dheilly, A., Diab, F., Morin, D., Jebbar, B., Haras, D., Dufour, A., 2005. Osmotic stres and phospahte limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Microbiol Lett*, 253, 125-131.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Haugen, H. P., Rygaard, J., Moser, J., Eberl, L., Høiby, N., Givskov, M., 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151, 3873-3880.
- 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.
- Boşgelmez-Tınaz, G., 2003. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turk Journal of Biology*, 27, 85-93.
- Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G.B., Andremont, A., Ruimy, R., 2003. Transcription of quorum sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 185, 7222-7230.
- Camara, M., Williams, P., Hardman, A., 2002. Controlling infection by turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis*, 2, 667-676.
- Camilli, A., Bassler, B. L., 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311, 1113-1116.
- Chen, J., Hadley, J., 2001. The microbiology of chronic rhinosinusitis. Results of a community surveillance study, 80, 143-145.

- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Dorsselaer, A. V., Pelczer, I., Bassler, B. L., Hughson, F. M., 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron, 415, 545-549.
- Chiller, K., Selkin, B. A., Murakawa, G. J., 2006. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 3, 170-174.
- Choo, J. H., Rukayadi, Y., Hwan J. K., 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilia extract. *Lett Appl Microbiol*, 42, 637-641.
- Costerton, J. W., 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 11(3-4), 217-237.
- Deretic, V., Schurr, M.J., Yu, H., 1995. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol*, 3, 351-356.
- 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.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., Newman, D. K., 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 61 (5), 1308-1321.
- 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.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), 167-93.
- Erdem, B., 1999. Pseudomonaslar. Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö. (Eds.), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji İçinde* (551-558). Güneş Kitabevi, Ankara.
- Esel, D., Doğanay, M., Alp, E., Sumerkan, B., 2003. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. *Clin Microbiol Infect*, 9(10), 1038-1044.
- 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. *J. Bacteriol.*, 172, 884-900.

http 3: <http://www.denniskunkel.com/DK/Bacteria/97270D.html>

Erişim Tarihi: 12.05.2014

http 4: <http://2011.igem.org/Team:Glasgow/Biofilm>

Erişim Tarihi: 12.05.2014

http5: http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/mm/Ek2h.pdf Erişim Tarihi: 12.05.2014

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.

Kahyaoglu, M., Darcan, C., Ergene, E., 2009. Bor Bileşiklerinin Mikrobiyal Etkileri ve Kullanım Alanları, 209-213.

Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S., Decho, A.W., 2008. Rapid Screening of Quorum-Sensing Signal N-Acyl Homoserine Lactones by an In Vitro Cell-Free Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3667-3671.

Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal infect*, 36, 78-91.

Köhler, T., Curty, Lk., Barja, F., Van Delden, C., Pechere, Jc., 2000. Swarming Of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent On Cell-To-Cell Signaling And Requires Flagella and Pili. *Journal Bacteriology*, 182 (21), 5990-5996.

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc natl Acad Sci USA*, 99, 7072-7077.

Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K., Parsek, M. R., 2006. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol*, 59(1), 142-192.

Leidal, K.G., Munson, K.L., Denning, G.M., 2001. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25, 186-195.

Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A.W., Thibodeaux, B.A., O'Callaghan, R.J., Wright, J.R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288, 409-418.

- Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Samond, G. P. C., Kjelleberg, S., 2001. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol Lett*, 205, 131-138.
- Micek, S.T., Kollef, K.E., Reichley, R.M., Roubinian, N., Kollef M.H., 2007. Health care- associated pneumonia and community acquired pneumonia: a single center experience. *Antimicrob Agents Chemother*, 5(10), 3568-3573
- Michael, B., Smith, J. N., Swift, S., Heffron, F., Ahmer, B. M., 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a Lux R homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol*, 183, 5733-5742.
- Murray, T. S., Egan, M., Kazmierczak, B. I., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patient. *Curr Opin Pediatr*, 19(1), 83-90.
- Myung, J., Kim, B. K., Crews, C. M., 2001. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 21, 245-273.
- Ni, N., Chou, H. T., Wang, J., Li, M., Lu, C. D., Tai, P. C., Wang, B., 2008. Identification of boronic acids as antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Elsevier*, 369, 590-594.
- Ni, N., Choudhary, G., Peng, H., Li, M., Chou, H.T., Lu, C.D., Gilbert, E.S., Wang, B., 2009. Inhibition of Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* by Boronic Acids. *Chemical Biology & Drug Design*, 74, 51-56.
- Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B., 2009. Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. *Med Res Rev*, 29, 65-124.
- Ohman, D.E., Cryz, S.J., Iglewski, B.H., 1980. Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol*, 142, 836-842.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- Palleroni, N. J., 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*, 149, 1-7.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H., 1993. Expression Of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes Requires Cell-To-Cell Communication. *Science*, 260, 1127-1130.

- Peabody, C. R., Chung Y. J., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., Saier, M. J., 2003. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149, 3051-3072.
- Pechere, J. C., 2001. Azithromycin reduces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing. *Jpn J Antibiot*, 54, 87-89.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., 1999. Quinolone signalling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 11229-11234.
- 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.
- Rashid, M.H., A. Kornberg., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *P. aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4885-4890.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M., 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.*, 187, 1799-1814.
- Rasmussen, T. B., Givskov, M., 2006. Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Microbiol*, 296, 149-161.
- Rasmussen, T. B., Givskov, M., 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*, 152, 895-904.
- Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafillu, K., Harms, H., 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 148, 923-932.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Hamood, An., 2000. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect*, 2, 1721-1731.
- Salyers, A. A., Whitt, D. D., 1994. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. Washington D.C. USA, ASM pres, 260-268.
- Sasaki, M., Hiyama, E., Takesue, Y., Kodaira, M., Sueda, T., Yokoyama, T., 2004. Clinical surveillance of surgical imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Japanese hospital. *J Hosp Infect*, 56(2), 111-118.

- 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 *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 53, 841-853.
- Shannon, K. P., French, G. L., 2004. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother*, 53, 818-825.
- 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, K. M., Bu, Y., Suga, H., 2003. Induction and Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs. *Chem Biol*, 10, 81-89.
- Singh, M. P., Greenstein, M. A., 2006. A Simple, rapid, sensitive method detecting homoserine lactone (HSL) related compounds in microbial extracts. *J Microbiol Methods*, 65, 32-37.
- Solano, C., Echeverez, M., Lasa, I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Elsevier*, 18, 96-104.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N., 2000, Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215.
- Swift, S., 2001. Quorum sensing as a population-density dependent determinant of bacterial physiology *Adv Microb Physiol*, 45, 199-270.
- Tateda, K., Matsumoto, N., Huruya, N., Nagashima, T., 1996. Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolides: Exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 40, 2271-2275.
- Tateda, K., Comte, R., Pechere, J., Köhler, T., Yamaguchi, K., 2001. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 1930-1933.
- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.L., Vasil, M.L., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun*, 67, 2371-2376.
- Van Delden, C., Iglewski, B.H., 1998. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg Infect Dis*, 4(4), 551-560.
- Venturi, V., 2006. Regulation of Quorum Sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol*, 30, 274-291.

- Veselova, M. A., 2010. Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas*. Russian Journal of Genetics, 2, 129-137.
- Welch, M., Mikkelsen, H., Swatton, J. E., Smith, D., Thomas, G. L., Glansdorp, F. G., Spring, D. R., 2005. Cell-cell communication in Gram-negative bacteria. *Mol BioSyst*, 1, 196-202.
- Wieland, C.V., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M.L., Dinarello, C.A., Fantuzzi, G., 2002. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun*, 70, 1352-1358.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. I., Bycroft, B. W., 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *The Royal Society*, 355, 667-680.
- Winn, J. R. W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., 2006. The Nonfermentative Gram-negative Bacilli. In: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 303-391.
- Wither, H., Swift, S., William, P., 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 4, 186-193.
- Whitehead, N., Barnard, M. L., Slater, H., Simpson, N., Salmond, G., 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 25, 365-404.
- Zhang, L. H., Dong, Y. H., 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol*, 53, 1563-1571.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ramadan Bilgin AKALIN
Doğum Yeri ve Yılı : Eskişehir, 1987
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ramadanbilginakalin@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Mustafa Kemal Lisesi, 2004
Lisans : SDÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

Mesleki Deneyim

Eskişehir Devlet Hastanesi	2008-2009
SDÜ Arş. Ve Uyg. Hastanesi	2009-2010
SDÜ Isparta Sağlık MYO	2013-2014
SDÜ Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Arş. Ve Uyg. Merkezi	2013-2014