



## ***Pseudomonas aeruginosa*: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması**

### ***Pseudomonas aeruginosa*: Characteristics and Quorum Sensing Mechanism**

**Belgin SIRIKEN<sup>1</sup> Veli ÖZ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Prof. Dr. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Kurupelit Kampüsü, Atakum, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup> Yüksek Lisans Öğrencisi Altınordu İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü/ORDU

#### **Özet**

*Pseudomonas aeruginosa* fırsatçı bir mikroorganizma olup, gıdalara ve gıda ile temas eden yüzeylerde tutunup, biyofilm oluşturabilme kabiliyetine sahip mikroorganizmaların başında gelmektedir. Etken çoğunlukla nosokomiyal ve immun sistemi baskılanmış konakçılarda enfeksiyonlara neden olur. Etkenin biyofilm içinde üremesi ve antibiyotik dirençliliği nedeniyle eradikasyonu güçtür. Enfeksiyonun oluşumu sırasında, *P. aeruginosa* Quorum sensing (QS-Çevreyi Algılama) regülatör sisteminin kontrolü altında bir dizi virulans faktörler üretir. QS; bakterilerin biyofilm oluşturabilmek amacıyla bitişiğinde yer alan diğer bakteri hücrelerine sinyal molekülleri (oto-induser-AI) göndererek hücreleri uyarması ve etkileşime geçmesine verilen isimdir. Bu nedenle ekstrasellüler sinyaller ve QS düzenleme sistemleri biyofilm varlığı için oldukça önemli olup, yeni tedavi edici stratejilerin gelişmesi için de etkili bir hedef olarak düşünülmektedir. *P. aeruginosa*'da QS düzenlenmesi en az iki N-asetil homoserin lakton kodlayan gen çiftleri (*LasI-RhII*) tarafından kontrol edilmektedir. Bu genler aynı zamanda elastaz, alkalın fosfataz, hidrojen siyanid, ekzotoksin A, katalaz, ramnolipid, piyosiyanın, asile edilmiş homoserin laktonları ve superoksit dismutaz gibi virulans faktörlerin üretimini de düzenlerler. QS'yi düzenlemede yardımcı olan bir diğer gen çifti ise PQS-MvfR'dir. PQS ekspresyonu *LasR*'ye bağlıdır ve *RhIR* geni ekspresyonunu artırır.

**Anahtar kelimeler:** *P. aeruginosa*, Virulans Faktörleri, Biyofilm, Quorum Sensing

#### **Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen and the most well known biofilm-forming bacteria attached one surfaces of foods or food contact. It is caused enfektions and majority of these are commonly associated with nosocomial infection and infection in immunocompromised hosts. Infections with it is difficult to eradicate, due to their high levels of antibiotic resistance and growth in biofilms. To facilitate the establishment of infection, it produces an impressive array of virulens factors and many of these under the controlle of Quorum sensing (QS) regulatory systems. QS, bacterial cells send a signal molecules called autoinduser to the next other bacterial cells for the biofilm formation, and the bacteria make contact with each other by the way for the stimulate and interaction the other bacteria. For this reason, extracellular signals and QS regulation system is very important for present of biofilm, and it has been considered an attractive target for the development of new treatment strategies. QS regulation in the *P. aeruginosa* is controlled by at least two pairs of gene (*LasI-RhII*), coded N-acylated homoserine lactones. These systems regulate the virulens factors such as elastase, alkaline phosphatase, hydrogen cyanid, exotoxin A, catalase, rhamnolipid, pyosyanine, acylated homoserine lactones and superoksit dismutase producton so on. The third gen couple helped to regulating QS is PQS-MvfR. The expression of PQS depends on *LasR*, and *RhIR* gene is increasing in the expression.

**Keywords:** *P. aeruginosa*, Virulence Factor, Biofilm, Quorum Sensing Stability

#### **1.Giriş**

Pseudomonadaceae familyası *Azotobacter* group, *Mesophilobacter*, *Oblitimonas*, *Permianibacter* ve *Pseudomonas* olmak üzere 5 cinsten oluşur. *Pseudomonas* cinsi de 13 farklı alt türü içerir. Bunlar; *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. caeni*, *P. citronellolis*, *P. flavescens*, *P. jinjuensis*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens/multiresinivorans* group, *P.oleovorans/pseudoalcaligenes* group, *P. cf. pseudoalcaligenes*, *P. resinovorans* ve *P. straminea* olarak bildirilmiştir (Public Health England 2015).

*Pseudomonas*'lar Gram negatif, sporsuz, toprak ve bitki gibi çeşitli çevre koşullarında yaygın olarak bulunabilen, ubiquiter özellikte bakterilerdir. Etken kolay üreyebilme yeteneği nedeniyle de dünyanın her kesiminde büyük sorun oluşturmaktadır. *Pseudomonas* spp. genel olarak nemli ortamlarda kolaylıkla çoğalabilen, zorunlu aerob bir bakteri olmakla beraber, bu cins içinde bulunan diğer türlerin aksine *P. aeruginosa* terminal elektron alıcı olarak nitratı (NO<sub>3</sub>) kullanabilme özelliği nedeniyle anaerobik koşullarda da varlığını sürdürebilmektedir. Bu durumun başlıca nedeni, etkenin sulu ortamlarda planktonik bir şekilde ve bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit matriksin içinde mikrokoloniler halinde yani "biyofilm" oluşturarak ta üreyebilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra etkenin sahip olduğu beslenme gereksinimlerinin oldukça basit oluşu, çoğalabilmesi için geniş bir ısı aralığına ihtiyaç göstermesi (20-42°C), yüksek tuz konsantrasyonuna ve farklı çevre koşullarına dayanıklı oluşu, zayıf antiseptikler ve çoğu antibiyotiklere karşı dirençli oluşu, nemli ortamlarda kolaylıkla üreyebilmesi gibi sahip oldukları önemli fizyolojik özellikleri nedeniyle de farklı ekolojik ortamlarda fırsatçı bir patojen olarak da karşımıza çıkmakta ve bütün dünya da gıda endüstrilerinde, ilaç ve hastane ortamında sorun oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* enfeksiyonları konakçının immun sisteminin zayıflamasının yanı sıra bakteriye ait çok çeşitli virulans faktörlerinin de katkısı ile ortaya çıkar (Erdem 1999, Bilgehan 2000).

*P. luteola* ve *P. oryzihabitans* türleri dışındaki diğer *Pseudomonas* türleri oksidaz pozitifdir (Public Health England 2015). Sahip oldukları bir veya birçok polar flagellaları sayesinde hareketli, çubuk veya hafif kıvrımlı formlarda, 1,5-5,0 µm uzunluğunda ve 0,5-1,0 µm genişliğinde, uygun koşullarda pigment üretebilen bakterilerdir. *Pseudomonas* türlerine göre değişmekle beraber, pyoverdin demirin sınırlı olduğu durumlarda fluoresans özellikte sarı-yeşil siderofor pigmenti salgırlar (Meyer ve ark. 2000). Belli *Pseudomonas* türleri ayrıca *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyanın ve *P. fluorescens*'in ürettiği thioquinolobaktin gibi diğer siderofor tiplerini de üretirler (Lau ve ark. 2004). Bazı suşlar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin gibi (kahverengi-siyah) pigmentlerini de üretebilirler (Singh ve ark. 2002).

*P. aeruginosa* suşları ise temelde 2 çeşit pigment üretirler: Piyosiyanın (mavi) ve piyoverdin (veya fluorescein-sarı-yeşil). Bu pigment alkali pH'da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için "aeruginosa" adı verilmiştir (King ve Philips 1978, Bilgehan 2000).

*Pseudomonas* metabolizması "arjinin fermentasyon" olarak adlandırılan arjinin deaminaz enerji üretim yolunu kullanmasına ve bazı türlerde piruvat fermentasyon şekillendirmesine rağmen, kuvvetli olarak oksijenli solunum olarak tanımlanır. Bütün türler oksidatif fosforilasyon için terminal elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır. Bazı türleri ise aerobik yolak ile eş zamanlı çalışarak, anaerobik solunum sistemine de sahiptirler. Bazı *Pseudomonas* türleri için karakteristik olan bu destekleyici yolakta son elektron alıcısı olarak nitratı (NO<sub>3</sub>) kullanırlar ve bu solunum tipi "nitrat solunumu" olarak adlandırılır. Nitrat solunumu yoluyla denitrifikasyon enerji-üretimi katobolik bir sürecidir. Üremesi için nitrat kaynağı olarak nitratın denitrifikasyon assimilasyonunun amonyağa indirgenmesi yoluyla gerçekleşir (Moore ve ark. 2006). Bazı *Pseudomonas* türlerinin elektron transport zincirinde mevcut olan ve en çok a-, b- ve c-tip sitokrom içerdikleri saptanan sitokromla karakterize edilmiştir (Stanier ve ark. 1966).

*Pseudomonas* türleri karbon ve nitrojen kaynakları olarak aminoasidi kullanabilirler. Aminoasit var olduğunda, hücre spesifik membran permeaz aktive olur, bu da aminoasitleri sitoplazmik boşluğa geçişi için transport mekanizmasını sağlar. Gıda kaynağı olarak aminoasit kullanımı hücre enerjisini güvende tutar, çünkü amino asitler hemen kullanılabilir, çok az veya hiç modifiye olmadan hücrede meydana gelecek olaylarda direk olarak kullanılabilir (Moore ve ark. 2006).

## 2. Virulans Faktörleri

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Bakterinin virulans faktörleri iki grup altında toplanabilir; hücre ile ilişkili olanlar ve hücre dışına salınan faktörlerdir. Virulans faktörlerinin salınımı mikroorganizmanın ürettiği logaritmik fazda karmaşık bir sistemle gerçekleşir (Woods 2004).

Bir *P. aeruginosa* enfeksiyon hastalığının gelişebilmesi sırasında; önce etkenin adezyonu ve kolonizasyon aşaması gerçekleşir. Daha sonra bakteri lokal olarak invaze olur ve takiben yaygın sistemik enfeksiyon oluşur (Maçin 2014).

*P. aeruginosa* hücre yüzey komponentleri, ekstraselüler enzimler ve toksinleri içeren çeşitli virulans faktörlerine sahiptir. Etkenin virulans faktörlerinin büyük çoğunluğu iki farklı regülasyon sistemi tarafından kontrol edilir. Bu sistemler; iki-bileşenli (komponentli) transkripsiyonal regülatör sistemi ile quorum sensing (QS) sistemidir. Bu iki mekanizma mikroorganizmanın konakçıda canlı kalması ve üremesi için gereklidir (Ben Haj Khalifa ve ark. 2011).

**Bakteriyel Hücre Yüzey Virulans Faktörleri:** Flagella: Patogenezde kritik bir role sahip olan kirpik, etkenin yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantıdır ve bakterinin yüzme şeklindeki hareketinden sorumludur. Kamçı sayesinde bakteri, asiolaGM1 gibi yaygın membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak adezyonu sağlar ve etkenin kolonizasyonunun başarısından sorumludur ve oldukça immünojeniktir (Singh ve ark. 2002).

**Pilus (fimbriae):** Pilus veya fimbriae *P.aeruginosa*'nın kısa, filamantöz yüzey uzantılarıdır. Çoğunlukla çoklu pilus mevcuttur ve piluslar *P.aeruginosa*'da seğirme (twitching) şeklinde hareketinden sorumludur. Bakterinin hücre yüzeyine tutunmasında adezinler büyük rol oynar. Bu yapı, etkenin hava yollarına hızla yayılmasına ve kolonize olmasına yardımcı olur. Piluslar bu nedenle adezin proteinleridir.

*P. aeruginosa*'da pilus dışında ikinci bir adezin yapısı daha vardır. Bu adezin yapısı ise pilus dışı adezinlerdir (tutunucu hücre yüzeyi yapıları). Bu yapılar etkenin enfeksiyon oluşturacağı bölgede yer alan epitel hücre yüzeyinde siyalik asitsiz gangliozid reseptör (asialoGM1) yapılarına bağlanarak kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol oynarlar (O'May ve ark. 2009). Bu amaçla önce nöromidaz üretilir, oluşan nöromidaz gangliozitlerdeki siyalik asit kalıntılarını yok eder ve sonra, adezinlerle asialoGM1 reseptörlerine bağlanır (Baron ve Finegold 1986, Erdem 1999). *P. aeruginosa* sahip oldukları pilusları ile epitel hücrelerine tutunmakla beraber, musine tutunamazlar. Bu yapıya ise pilus dışı adezinler aracılığıyla tutunur. Yani pilus dışı adezinler etkenin hem epitel hücresine, hem de musin yapısına tutunmasını sağlar (Erdem 1999, Baron ve Finegold 1986).

**Lipopolisakkaritler:** *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 pro-inflamatuar yolakta aktiftir (Vasil ve Ochsner 1999). LPS tabaka, TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerinin tanınması ve asialoGM1 veya CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) reseptörlerine bağlanması aracılığıyla adezyonda rol alan önemli bir virulans faktörüdür (Kim ve ark. 2005).

**Aljinat:** Aljinat, *P. aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapıdır. Tekrarlayan mannuronik asit ve glukronik asit polimerlerinden meydana gelir. Aljinat, LPS gibi adezin fonksiyonu gösterir ve solunum epiteline *P. aeruginosa*'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar (Salyers ve Whitt 1994). Aljinatin aşırı üretimi *P. aeruginosa*'yı fagositozdan, dehidratasyondan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Wozniak ve ark. 2003). Örneğin; *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan aminoglikozidlerin bakterisid etkisini de aljinat inhibe edebilir (Baron ve Finegold 1986, Denton ve Wilcox 1997). Aljinat, bakterinin adezyonunda da rol oynar ve bakteriyi solunum yolu epitelini üzerine sabitler. Aljinat biyosentezinde görev alan genler kromozomun bir bölgesinde kümelenmiş ve operon olarak organize olmuşlardır. Ortamda nitrojen miktarının azalması ve yüksek ozmolarite aljinat üretimini tetikler. Mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşümü algS ve algT yardımıyla gerçekleşir (Salyers ve Whitt 1994).

**Piyosiyinin:** *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metaboliti olan piyosiyinin, nötrofillerde apoptozisi uyarması, konak yanıtını baskılaması ve IL-8 artışı gibi etkilerle patogenezde rol oynar (Denning ve ark. 1998). Bu pigment ayrıca silyalı solunum yolu epitelinin fonksiyonlarını bozar ve toksik serbest radikallerin salgılanmasına neden olarak, daha önceden meydana gelmiş olan doku hasarını artırır. Piyosiyinin  $\alpha$ -1-antitripsini inaktive eder, bu nedenle kistik fibroziste bulunan proteaz-antiproteaz dengesizliğine katkıda bulunurken (Britigan ve ark. 1999), *P. aeruginosa* ilave olarak elastazı ile kollojen, fibrinojen ve elastin dahil ekstraselüler matriksin pekçok proteinine bağlanır, böylece akciğer paranzimi içine bakteri invazyonuna katkıda bulunur (Britigan ve ark. 1999, Muller 2006).

**Piyoverdin:** Piyoverdin bir siderofordur ve *P. aeruginosa* metabolizmasında kullanım için çevreden demir bağlayan küçük bir moleküldür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda piyoverdinin *P. aeruginosa*'nın ekzotoksin A (ekzoA) ve endoproteaz gibi diğer virulans faktörlerinin sekresyonunun düzenlenmesinde ve kendi sekresyonunda rol aldığı ve önemli bir virulans faktörü olduğu gösterilmiştir (Song ve ark. 2010).

**Alkali Proteaz:** Alkali proteaz *P. aeruginosa*'nın LasB elastaz ve Las A gibi ürettiği birçok proteazdan biridir. Alkali proteaz, *P. aeruginosa*'nın tip 1 sekresyon sistemi tarafından salgılanan ve fibrini parçalayıcı bir proteazdır. *P. aeruginosa* proteazlarının çoğu gibi yalnızca korneal enfeksiyonların patogenezinde rolü açıkça bilinmektedir. Ayrıca akut akciğer hasarına da neden olabilmektedir (Alcorn ve ark. 2004).

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

**Elastaz:** Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'u elastindir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. LasB bir çinko metalloproteinazdır. Bu enzim hücre dışı çinko proteaz olup, kollojen ve elastin gibi ökaryotik proteinlere saldırır ve hücrenin yapısal proteinlerini parçalar. LasA proteaz ve LasB elastaz enzimleri sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. LasA proteaz, elastini yıkamaz fakat yıpratır ve LasB elastazın elastolitik aktivitesini artırır. LasB bir çinko metalloproteinazdır ve proteolitik özelliği alkali proteazın on katıdır (Salyers ve Whitt 1994). Bu enzim hücre dışı çinko proteaz olup, kollojen ve elastin gibi ökaryotik proteolizlere saldırır ve hücrenin yapısal proteinlerini parçalar (Lederberg 2000). Etken örneğin solunum yolu epitelinde sürfaktan proteinleri A ve D'nin parçalanması ve proteaz aktive edici reseptörün inaktivasyonu ile konak hücre immün yanıtını azaltır (Salyers ve Whitt 1994, Song ve ark. 2010). Kan damarlarındaki elastik tabakayı tahrip edici etkiye sahiptir. Elastaz, dissemine *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında görülen ektima gangrenosum adlı karakteristik lezyonlardan sorumludur (Delden ve Iglewski 1998).

**Fosfolipaz C:** Fosfolipaz C, özellikle hemolitik fosfolipaz C, *P. aeruginosa* tarafından tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir fosfolipazdır. Ökaryotik hücre membran bileşimi olan fosfolipitleri hedef alarak akut akciğer hasarı patogeneğinde rol oynar (Wiener-Kronish ve ark. 1993). *P. aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonunun patogeneğinde rol alır. Patojenik etkilerinin bir kısmı sürfaktan inaktivasyonu ile olmaktadır. Konak nötrofil oksidatif patlama yanıtını baskılar (Romero ve ark. 1998).

**Ekzotoksin A (ExoA):** *P. aeruginosa*'nın en önemli virulans faktörlerinden biridir. Bu toksinin çok küçük bir dozu bile deney hayvanlarında ölüme yol açar. ExoA, bir ADP (adenozindifosfatın)-ribozil transferaz özelliğindedir. Tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan exoA, elangasyon faktör-2 (EF-2)'yi dolayısıyla protein sentezini inhibe ederek hücre ölümüne yol açar. ExoA'nın enfeksiyonda konak yanıtını baskıladığı gösterilmiştir. Ekzo A özellikle yanık yarası ve kronik akciğer enfeksiyonları sırasında doku hasarının oluşmasında önemli role sahiptir. Ayrıca, ekzotoksin A, T ve B lenfositleri için immünsupresyon oluşturuca etkiye sahiptir (Lederberg 2000).

**Ramnopit:** Ramnopit ilk olarak *P. aeruginosa*'dan 1949'da Jarvis ve Johnson tarafından izole edilen bir glikolipid biyosüfaktandır (Abdel-Mawgoud ve ark. 2010). Bu birleşik bir veya iki ramnoz şeker molekülü ile bir veya iki  $\beta$ -hydroxy (3-hydroxy) yağ asitlerinden oluşur (Lang ve Wullbrand 1999). Ramnopitler *P. aeruginosa* tarafından üremenin durağan fazında ve özellikle demir ve nitrojen konsantrasyonunun sınırlı olduğu durumlarda üretilir (Guerra-Santos ve ark. 1986). Hemolitik etkilidir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosüfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek, fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Karatuna ve Yağcı 2008).

**Sitotoksin:** Toksik bir protein olup, 25000 mol ağırlığındadır. Daha önceleri lökositin olarak bilinen bu toksin, nötrofil fonksiyonlarını inhibe eder ve *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu yetişkin solunum stresi sendromundaki akciğer hasarından da sorumludur (Vasil ve Ochsner 1999, Kim ve ark. 2005, O'May ve ark. 2009).

**Slime faktör:** *P. aeruginosa*'nın bazı koşullarda oluşturduğu polisakkarit kapsül yapısına "slime tabakası" denir. Slime faktörü, konak bağışıklık sistemini etkileyerek bakterinin konak savunmasından korunduğu gözlemlenmiştir (Lagournintzis ve ark. 2003).

**Tip III Sekresyon Sistemi:** *P. aeruginosa* bu sistem ile hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturmak ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini ökaryot hücre stoplazmasına ilettiği bir sistemdir. Effektör proteinler aktin hücre iskeletini ve protein sentezini inhibe etmek suretiyle hücreli alışverişi bozar (Kipnis ve ark. 2006). Tip III sistemi ile salınan toksinler; ekzoenzim S (exoS), ekzoenzim T (exoT), ekzoenzim Y (exoY) ve ekzoenzim U (exoU)'dur (Kipnis ve ark. 2006, Hauser 2009). ExoS ve exoT'nin birden fazla enzimatik ve kimyasal işlevi vardır. ExoS ve exoA birlikte enfekte olan hastalarda, mortalite oranı daha yüksek bulunmuştur. ExoS hücreli apoptozis için gereklidir. Akciğer enfeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açan ve bakterinin yayılmasında rol oynayan bir toksindir (Nicas ve Iglewski 1985). ExoT *P. aeruginosa*'nın makrofajlar tarafından alınmasını engeller. ExoT'nin yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de gösterilmiştir (Shaver ve Hauser 2004). ExoU fosfolipaz A2 benzeri aktivitesi olan bir fosfolipaz olarak tarif edilen güçlü bir sitotoksindir ve çeşitli hedef hücreleri parçalar (Mitov ve ark. 2010).



### 3. Quorum Sensing ve *P. aeruginosa* Patogenezindeki Rolü

Biyofilm; mikroorganizmaların birbirleriyle, buldukları yüzeylerle veya buldukları yüzeylerden daha alt tabakalara yani ara yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunmalarını ve yapışmalarını sağlayan, aynı zamanda büyüme oranı ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotipik özellikler kazanarak salgıladıkları “ekstraselüler polimerik substans (EPS) (hücre dışı polimerik madde) matrisine verilen addır (Shunmugaperumal 2010). Biyofilm oluştuğunda, mikro çevredeki değişiklikler gen ekspresyonlarında da değişiklikler oluşturarak biyofilmin oluşumunu hızlandırmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmitler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır. Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir (Vuong ve Otto 2002, Post ve ark. 2004). Bu aşamalar;

- 1) Yüzeyin uygun duruma getirilmesi (Surface conditioning),
- 2) Geri dönüşümlü tutunma (reversible attachment),
- 3) Geri dönüşümsüz tutunma (irreversible attachment)
- 4) Kolonizasyon
- 5) Kopma.

Biyofilm sayesinde EPS içerisine gömülü olarak yaşamlarını sürdüren mikroorganizmalar immün sistem elamanlarından, antibiyotiklerden, patojenlerin üretmiş olduğu antimikrobiyal ürünlerden, fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslerden korunurlar (Nouraldin ve ark. 2016). Hatta son çalışmalar biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli olduğu ortaya koymuştur. Böylece biyofilm içindeki mikroorganizmalar yaşadıkları çevrede planktonik formlarına göre daha fazla hayatta kalma ve büyüme şansına sahip olurlar (Hassan ve ark. 2011).

Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer alan Gram negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa*, gerek biyofilm oluşturma özelliği, gerekse çok hızlı direnç kazanma özelliğinden dolayı son yıllarda insidansı yüksek mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Rasamiravaka ve ark. 2015).

**Quorum Sensing:** Bakteriler biyofilm oluşturabilmek amacıyla bitişinde yer alan bakteri hücrelerini biyofilm oluşturma yönünde uyarmak için, ortama küçük, diffüze olabilen moleküller yayarlar. Hücreler arasındaki bu iletişim “Quorum Sensing (QS)” adı verilen sistemler ile gerçekleştirilmektedir. Ancak, hücre-hücre işaretlenmesi ile ilişkili olan bu tip kimyasallar, yapıları oldukça farklı olan ve sürekli genişleyen moleküllerin toplanmasını temsil ederler. QS yoğun bakteriyel topluluğun tanınmasında oldukça önemlidir. Bu tip bir düzenleme topluluk seviyelerinde bakteriyel davranışlarını kontrol eder (Davies 2003). Bu aşamada tutunma, kimyasal bağlanmadan ziyade elektrostatik bir etkileşimle olduğu için geri dönüşümlüdür. Ancak, hücrelerin bazıları daha sıkı bağ kurmak amacıyla yapılar şekillendirerek, biyofilmin ikinci basamağı olan geri dönüşümsüz (irreversibl) bağlanma için avantaj sağlar (Costerton ve ark. 2004). Bakteri hücrelerinin yüzeye EPS üretimi için geri dönüşümsüz bağlanması, bakteri hücrelerinin membrana bağlı uyarıcı proteinlerin uyarımı sonucu şekillenir (Boyd ve Chakrabarty 1995). Bu uyarım, bakteri hücreleri arasında köprüler kurulması ve sonrasında yüzeyde bakteri kümelerinin oluşumuna izin verir (Donlan 2002, Hall-Stoodley ve ark. 2004). Biyofilm bileşiminde yer alan “Birleşmiş Protein Yapısı” (Biofilm associated protein-BAP) sayesinde organizmalar yüzeye kolonize olabilir ve burada sürekli kalabilir. Bu nedenle BAP oldukça önemlidir (Tormo ve ark. 2005). Örneğin, alginatın *P. aeruginosa*'nın yüzeye yapışmasında ve biyofilm geliştirilmesinde tamamlayıcı olduğu bilinmektedir (Hall-Stoodley ve ark. 2004).

Tutunma işleminden sonra, biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, QS sisteminden gelen haberleşme sistemindeki yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün (oto-uyarıcı-autoinducer-AI) konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler hücrelerarası ve düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (Şahin 2007). Yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirleri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir. Bu tür bir hücreden hücreye iletişim dizgesinin (çoğunluğu algılama), bakteri topluluklarında gen sunumunun uyumu ve işlevsel yönetiminde temel roller oynadığı bilinmektedir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak QS; bakteriler küçük işaret moleküllerinin birikimine yanıt verirler, ortamı tararlar ve salınımda bulunurlar. Bu tür etkileşimlerin sonucunda da bir grup hedef genin düzenlenmesi sağlanır. Bu mekanizma, belli bir işaret yoğunluğuna ulaşıldığında, bazı genlerin açılmasını garantiler (Dong ve Zhang 2005).

QS sistemindeki mekanizma, kendiliğinden sinyal üretebilen AI moleküllerinden oluşur. Bunun nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (Novick ve Muir 1999, Donabedian 2003). Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülünü kullanmaktadır. QS iki şekilde gerçekleşir; türler arası ve tür içi sinyal molekülleriyle iletişim. Gram negatif bakterilerde türden türe QS mekanizmasında AI molekül olarak N-acyl homoserin lakton (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL), Gram pozitif bakterilerde çoğunlukla oligopeptidler (autoinducing peptitler) (Wong 1998), hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler ortak olarak AI-2 'ler kullanmaktadır.

### ***Pseudomonas* 'larda QS sistemi**

*P. aeruginosa* ve diğer Gram negatif bakteriler tarafından üretilen ve tür içinde kullanılan AI'lerinin ana sınıfın "N-Açıl homoserin laktonlar (AHLs-N-acylated homoserine lactone)" oluştururlar. AHL'ler 4 ile 18 karbon (C) uzunluğunda açıl zincirlerini taşıyan homoserin lakton (HL) halkalarından oluşmaktadır (Fuqua ve ark. 2001). Bu yan zincirlerde C3 pozisyonunda ya da doymamış çift bağlarda nadiren modifikasyonlar görülür (Ruby 1996).

*P. aeruginosa*'da bulunan QS sistemi hiyerarşik bir QS döngüsü tarafından kontrol edilir. *P. aeruginosa*'da üç ana QS sistemi bulunur. Bunlar;

- 1) LasI-LasR,
- 2) RhlI-RhlR ve
- 3) PQS-MvfR.

Bu sistemler biyofilm formasyonu ve virulans faktörü gen ekspresyonunu kontrol eder. *P. aureginosa*'nın QS sistem genlerinin fonksiyonları tek başlarına çalışmayıp birlikte fonksiyon gösterirler. Başka bir ifadeyle, *rhl* genlerinin ekspresyonu *las* genlerinin regülasyonu altında gerçekleşmektedir (Girard ve Bloemberg 2008). Kısaca açıklanırsa; AI sentaz geni LasRI sisteminden oluşur. Bu sistemlerden *lasI* ekstraselüler diffüze olabilen AHL sinyal moleküllerini ve N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactonu (OdDHL) üretir. OdDHL transkripsiyonel regülatör olan *lasR* tarafından tanınır. *lasR* daha sonra *RhlI-RhlR* sistemini etkileyen çeşitli gen ekspresyonunu yönetir. Nitekim *rhlI* N-butyryl-L-homoserine lactone (BHL) sinyal molekülünü üretir. Bu molekül onun akrabası olan transkripsiyonel regülatör *RhlR*'yi bağlayabilir. *LasR* ve *RhlR* transkripsiyonel regülatörler yüksek yoğunluktaki *P. aeruginosa* 'ların varlığında şekillenen yeterli düzeyde OdDHL ve BHL olduğu zaman aktive olur (Pesci ve ark. 1999, Venturi 2006). Hücre yoğunluğundaki artış ile AI intraselüler konsantrasyonu düzeyi üç kat seviyeye ulaşmaya kadar birikir. Bu kritik konsantrasyonda, onlar uygun düzenleyici protein bağlarlar (Fuqua ve ark. 1996). Regülatör-protein AI kompleksleri onların artan hedef genlerin yukarı yöndeki spesifik DNA dizilimini bağlarlar. Bu sistemler, bu yüzden bakterilerin birbirleriyle iletişimine (hücre-hücre sinyalleşmesi), kendi yoğunluklarının algılamasına ve koordineli bir şekilde davranmalarına, bireysel hücreden daha ziyade bir topluluk olarak spesifik genlerin ekspresyonuna izin verir (Van Delden ve Iglewski 1998). *LasRI* sistemi *lasB* ekspresyonunu düzenler ve *LasA* proteaz ve ekzotoksin A gibi diğer ekstra-selüler virulans faktörlerin optimal üretimi için ihtiyaç duyulur (Gambello ve ark. 1993). Bu sistem *P. aeruginosa* sekresyon yolağında proteinleri kodlayan *xcpP* ve *xcpR* genlerinin transkripsiyonunu başlattığı da gösterilmiştir.

PQS-MvfR sisteminde, 2-heptil-3-hidroksi-4 (1H) kinolon ve onun prekürsörleri transkripsiyonel regülatör *MvfR*'yi bağlar ve sonrakileri kontrol eder (Kennedy ve ark. 2010). Bu molekül (2-heptil-3-hidroksi-4 (1H) kinolon) homoserin lakton ailesine ait değildir. *lasB* geni, *Las* ve *Rhl* sistemi ekspresyonunu kontrol eden *P. quinolone* sinyali tarafından dizayn edilmiştir. PQS ekspresyonu *LasR*'ye bağlıdır ve *RhlR* geni ekspresyonunu artırır. Bundan dolayı PQS *Las* ve *Rhl* sistemleri arasında bir bağ olarak rol oynar (Pesci ve ark. 1999).

*LasI-LasR* ve *RhlI-RhlR* QS sistemi *P. aeruginosa*'nın virulansını kontrol etmede ardışık olarak fonksiyon gösterir. Yapılan çalışmalarda QS ile ilgili olarak, *P. aeruginosa*'nın kromozomal genlerinin % 6-10'u AHL'ler tarafından düzenlendiği ve diğer *Pseudomonas* spp.'nin de aynı sistemi kullandığı bildirilmiştir (Arevalo-Ferro ve ark. 2003).

Bunların dışında *P. aeruginosa* ve diğer Gram negatif bakterilerde *LuxI/LuxR* düzenleyici sistem de bulunmaktadır. *LuxI/LuxR* düzenleyici sistem, bakterilerdeki QS aracılığıyla yapılan gen ekspresyonunun kontrolü için gereken sistemdir. *LuxI* ve *LuxR* homologları çok sayıda bakteriyel genomda tanımlanmıştır. *LuxR* tipi QS sistemler gen ekspresyonuna göre hücre yoğunluğunu kontrol ederler (Case ve ark. 2008). Pozitif feedback (geri-besleme) mekanizması genel olarak AHL QS sistemleri bağlı olan *LuxI* tipi gen ekspresyonlarını aktive eden *LuxR* tipi proteinleri içerirler. AHL AI molekülleri spesifiktir ve belirli bir AHL molekülü sadece onu üreten türler tarafından tespit edilir. Böylelikle AHL tipi QS sistemleri çoğunlukla türler içi hücre iletişimini teşvik eder (Schuster ve ark. 2004). QS sinyal (N-3-oxooctanoyl-L-homoserine lactone) (3OC8HSL) eksikliğinde *TarR* tamamlanamaz ve hızlıca yok olurlar. *P. aeruginosa*'da bulunan QS sistemi hiyerarşik bir QS döngüsü tarafından kontrol edilir (Zhu ve Winans 2001).

QS sistemi biraz daha açıklanacak olursa; *lasI* ve *rhII* genleri Als olarak adlandırılmaktadır. *Las* geninin fonksiyonu ilk olarak *LasB* elastaz enzim aktivitesinin bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı *P. aeruginosa* QS sisteminde *las* geni olarak adlandırılmıştır. *rhI* geni adlandırılmasının nedeni ise ramnolipid üretimindeki büyük rolüdür. *rhI*, ramnolipid üretiminde gerekli olan ramnosil tranferaz enzimi kodlayan *rhLAB* olarak adlandırılan bir operonun ekspresyonunu düzenler. *LasI*; QS'de AI sentaz olan N-(3-oxododecanoyl)-homoserin laktonu (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) kodlar (Pesci ve ark. 1999, Delden ve Iglewski 1998). Bu QS signal serbest olarak *P. aeruginosa* hücrelerine difüze olabilir. AI'ler belli bir kritik alt sınır konsantrasyonuna ulaştığı zaman, AI'ler LasR proteine bağlanır ve daha sonra LasR-AI kompleks şekillenir. Bu kompleks daha sonra pek çok virülans faktörleri kodlayan genlerle birlikte bir seri hedef genleri tetikler. Örneğin; *toxA* (toksin A), *lasA* (elastaz), *lasB*, *aprA* ve *xcpR* ve *xcpP* gibi. Bu genlerin yanı sıra, *LasR-AI* kompleksler *lasI* genlerin salınımına neden olur. İkinci gen olan *RhlI*; N-butyryl-homoserin lakton'u (C<sub>4</sub>-HSL) kodlar. Bu *RhlI* geni ramnolipid, elastaz, piyosiyenin, siyanid gibi faktörlerin üretimini kontrol eder. Bu moleküller *LasR* ve *RhIR* olarak adlandırılan transkripsiyonal regülatörleri aktive eder (Smith ve Iglewski 2003). Böylece, biyofilm içersindeki bakteriler virülans faktörlerin salınımını artırarak patogeneizde rol oynamaktadır. Bakterinin virülans faktörleri hücrelerdeki sıkı bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar. Bu durum interlökinlerin üretimini uyurarak pro-inflamatuvar etki gösterir (Salyers 1994). 3 oxo-C<sub>12</sub>-HSL ve C<sub>4</sub>-HSL moleküllerinin epitelyal hücrelerin membran bütünlüğünü bozduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu 3 oxo-C<sub>12</sub>-HSL sinyal molekülünün bir hücre ile etkileşime girmesi; o hücrede inflamasyonu ve apoptozisi uyur (Wu ve ark. 2005). Özellikle pro-inflamatuvar sitokinlerden Cox-2, IL-6, IL-8 ve daha birçoğunun artışına da neden olmaktadır (Alcorn ve ark. 2004).

QS sistemleri genlerin ekspresyonunda AI veya haberci moleküller ile büyük bir role sahiptirler. C<sub>12</sub>-HSL AI fibroblast ve bronşiyal epitel gibi insan akciğer yapısal hücrelerinde IL-8 üretimine neden olurlar. AI aynı zamanda inflamasyonda büyük rol oynayan akciğer fibroblast hücrelerinde prostoglandin E2 ve siklooksijenaz-2 üretimini stimüle eder. Bunların ötesinde, molekül nötrofil ve makrofajlarda apoptozisi artırır. Bundan dolayı yukarıda bahsedilen gen üreten virülans faktörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde AI'ler aynı zamanda konak immün sistem fonksiyonu içinde modülatör bir faktördür (Smith ve ark. 2002).

*P. aeruginosa*'nın QS'sinin özellikleri:

a) Sistem yarışmacı nitelik taşımamaktadır. Bunun anlamı iki sistemin ürünleri arasında herhangi bir ilişkinin bulunmamasıdır.

b) Bazı bakteriyel genler iki çift gen tarafından kontrol edilirken, bazıları ise tek gen tarafından kontrol edilirler. Bu genler kendi kontrolleri altındadırlar. Buna göre LasR proteini/C<sub>12</sub>-HSL, *lasI* geninin kontrolü altındadır. Bunlar *rhIR* geninin ekspresyonunu regüle ederler. *RhIR* proteini/C<sub>4</sub>-HSL de *rhII* gen transkripsiyonunu regüle eder.

c) C terminali, ATG başlangıç kodununun 40 bp akışında LAS-Box'a bağlanan helix sarmalını motife eder. Las-Box 20 baz çifti bölgesinden oluşur. C-terminalindeki amino asitler polimerizasyona katılırlar.

d) *RhI* sistemin R proteini C<sub>4</sub>-HSL varlığında ya da yokluğunda bir dimer oluşturur ve DNA'ya bağlanırlar. AI'e bağlanması durumunda hedef genin ekspresyonunu etkileyebilir (Pesci ve ark. 1999).

#### 4. Sonuç

*P. aeruginosa*'nın virülansında, hem hücre hem de hücre dışı faktörler rol oynamaktadır. Özellikle pilus, flagella ve lipopolisakkarit gibi yüzey komponentleri ile konak hücre yüzeyine yapışır ve konak immün yanıtına neden olur. Yapılan pek çok hayvan modeli çalışmada proteazlar, toksinler ve hemolizinlerin *P. aeruginosa* virülansında rol aldığı gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'nın hücre dışı virülans faktörlerinin salınımı QS mekanizma ile kontrol edilip düzenlenmektedir. QS sisteminin aynı zamanda pek çok mikroorganizmada önemli bir virülans faktörü olan biyofilm yapısını da etkilediği bilinmektedir. Yapılan literatür çalışmaları bilinçsiz antibiyotik kullanımının ve bakterilerde direnç genlerinin aktarımının üst kuşak antibiyotiklerin çıkmasına neden olduğunu ve direnç kazanan bu bakterilerle mücadelenin her geçen gün giderek zorlaştığını göstermektedir. Üstelik biyofilm oluşumunun antibiyotik penetrasyonunu önlediği ayrıca biyofilm oluşumunun bariyer olarak görev yapan epitelyal hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olduğu görülmüştür. Biyofilm yapısı *P. aeruginosa*'nın özellikle kronik akciğer enfeksiyonları gibi pek çok enfeksiyonun gelişiminde önemli bir role sahiptir. Biyofilm oluşumunun başlangıç aşamasında yüzeye tutunmuş mikroorganizmalarda gerçekleşen gen ekspresyonu değişimiyle, biyofilm-spesifik fenotip değişimleri ve bunun sonucunda da biyofilmde antibiyotik dirençlilik potansiyelinde artış şekillenir. Daha sonra, ekzopolisakkarit matriks üretimi sonucunda da antimikrobiyel maddelerin penetre olması engellenmiş olmaktadır. Biyofilm matriksinde bulunan ve enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilik problemi, tıp dünyasının yüz yüze kaldığı büyük problemlerden birisidir (Costerton 1999). Biyofilm içinde bakteri genetik materyalinin

konjugasyon yoluyla aktarımı veya değişimi sonucu kazanılan dirençlilik, bakterinin planktonik formuna kıyasla 1000 kat daha yüksek olduğu bilinmektedir. Biyofilm içinde bulunan bakteri, antibiyotik kullanımı gibi strese maruz kaldığı zaman da yüksek mutasyona (hypermutation) uğrar (Marshall 1976, Dunne 2002).

### Kaynaklar

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lepine, F. ve Deziel, E., 2010. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1323-1336.
- Arevalo-Ferro, C. Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K. ve Eberl, L., 2003. Identification of quorum-sensing regulated, proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology*, 5(12):1350-69.
- Alcorn, J.F. ve Wright, J.R., 2004. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:30871-30879.
- Baron E. ve Finegold, S., 1986. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. Mosby Co, 7th ed, 422-424 s 16. St Louis.
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H. ve Khedher, M., 2011. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Annales de biologie clinique (Paris)*, 69(4), 393-403.
- Bilgehan H., 2000. Non-fermentatif gram olumsuz basiller. Editör: Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları*, s 175-197, İzmir.
- Boyd, A. ve Chakrabarty, A.M., 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology*, 15:162-168.
- Britigan, B.E., Railsback, M.A. ve Cox, C.D., 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infection and immunity*, 67(3):1207-12.
- Case, R.J., Labbate, M. ve Kjelleberg, S., 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *The ISME Journal*, 2: 345-349.
- Costerton, J.W., Montanaro, L. ve Arciola, C.R., 2004. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int. Journal of Artificial Organs*, 28:1062-1068.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. ve Greenberg, E.P., 1999. "Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections," *Science*, 284: 1318-1322.
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2):114-122.
- Delden, C.V. ve Iglewski, B.H., 1998. Cell-to-cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 4: 551-9.
- Denton, M. ve Wilcox, M.H., 1997. Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40:468-474.
- Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L. ve Britigan, B.E., 1998. *Pseudomonas pyocyanin* increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infection and immunity*, 66 (12):5777-84.
- Donabedian, H., 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *Journal of Infection*, 46: 207-214.
- Dong, Y.H. ve Zhang, L.H., 2005. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *Journal of Microbiology*, 43:101-9.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8:881-890.
- Dunne, Jr. W.M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15:155-166.
- Erdem, B., 1999. *Pseudomonaslar*. Ed: Ustaçelebi Ş. ve ark, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi*, s 551-566, Ankara, Türkiye.
- Fuqua, C., Parsek, M.R. ve Greenberg, E.P., 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35:439-468.



- Gambello, M.J., Kaye, S. ve Iglewski, B.H., 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and Immunity*, 61:1180–1184.
- Girard, G. ve Bloemberg, G., 2008. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology*, 3 (1): 97-106.
- Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O. ve Fiechter, A., 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24:443-448.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. ve Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2:95-108.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A. ve Iqbal, M., 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4):305–11.
- Hauser, A.R., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7 (9): 654-665.
- Jarvis, F. G., ve Johnson, M.J., 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of American Chemistry Society*, 71:4124-4126.
- Karatuna, O. ve Yağcı, A., 2008. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobioloji Cemiyeti Dergisi*, 38: 42-51.
- Kennedy, P. ve Brammah, S., Wills, Burns, E., 2010. biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis. *Burns* 36:49.
- Kim, E.J., Wang, W., Deckwer, W.D., ve Zeng, A.P., 2005. Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. *Microbiology (Reading, England)*. 151(Pt 4):1127–38.
- King, A. ve Philips, I., 1978. “The Identification of Pseudomonas and Related Bacteria in a Clinical Microbiology”, *I. Medical Microbiology*, 11:165-175.
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 36:78-91.
- Lagournintzis, G., Christofidou, M., Ditniracopoulos, G. Ve Paliogianni, F., 2003. *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of 67 tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infection and Immunity*, 71 (8): 4614-4622.
- Lang, S., ve Wullbrandt, D., 1999. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:22-32.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., ve Kong, F., 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends of Molecular Medicine*, 10(12):599-606.
- Lederberg, J., 2000. *Pseudomonas*. *Encyclopedia of Microbiology*. Second Edition. Volume 3., 2000. p. 876-891. San Diego, USA.
- Maçın, S., 2014. Pigmentli Ve Pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virülans Faktörlerinin Fenotipik Ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması. T.C. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.
- Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A.W., Thibodeaux, B.A., O' Callaghan, R.J. ve Wright, J.R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288: 409-418.
- Marshall, K.C., 1976. *Interfaces in microbial ecology*, Harvard University Press, Cambridge, MA. pp. 44-47.
- Meyer, J.M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 174 (3): 135-142.
- Mitov, I., Strateva, T., ve Markova, B., 2010. Prevalence of Virulence Genes among Bulgarian Nosocomial and Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (3), 588-595.
- Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins dos Santos, V.AP., Pieper, D.H., Ramos, J-L., ve Palleroni, N.J., 2006. Nonmedical: *Pseudomonas* Chapter 3..3.21. *Prokaryotes* 6: 646-703.

- Muller, M., 2006. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(11):1670–7.
- Nouraldin, A.A.M., Baddaour, M.M., Harfous, A.H., ve Essa, A.A.M., 2016. Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alexandria Journal of Medicine*, 52 (2); 99-105.
- Nicas, T.I. ve Iglewski, B.H., 1985. The Contribution of Exoproducts to Virulence of *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 31 (4), 387-392. 68
- Novick, R.P. ve Muir, W.M., 1999. Virulence gene regulation by peptides in *staphylococci* and other Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2:40-45.
- O'May, C.Y., Sanderson, K., Roddam, L.F., Kirov, S.M. ve Reid, D.W., 2009. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 6):765–73.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. ve Iglewski, B.H., 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 28;96(20):11229-34.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. ve Ehrlich, G.D., 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surgery*, 12:185-190.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez P. ve El Jaziri, M., 2015. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 759348, 17 pages.
- Romero, M.C., Cazau, M.C., Giorgieri, S. ve Arambarri, A.M., 1998. Phenantrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollutin*, 101: 355-359.
- Ruby, E.G., 1996. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri* *Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 50: 591–624.
- Salyers, A.A., ve Whitt, D.D., 1994. “Bacterial pathogenesis: A molecular approach,” *American Society for Microbiology*, 260-268.
- Shaver, C.M., ve Hauser, A.R., 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity*, 72 (12): 6969-6977.
- Shunmugaperumal, T., 2010. *Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections*, John Wiley & Sons, Inc.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., Greenberg, E.P., 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 51: 973–985.
- Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R., Iglewski, B., 2002. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *Journal of Bacteriology*, 184: 1132
- Smith, R.S. ve Iglewski, B.H., 2003. “*Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target,” *Journal of Clinical Investigation*, 112: 1460-1465.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., ve Doudoroff, M., 1966. The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *Journal of Genetic Microbiology*, 43:159–271.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P. ve Welsh, M.J., 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888):552–5.
- Song, Z., Kong, K.F., Wu, H., Maricic, B., Ramalingam, B., Priestap, H., Scheper, L., Quirke, J.M.E., Iby, N.H., ve Mathee, K., 2010. Panax ginseng has anti-inhibiting quorum sensing, a bacteria communication process critical for establishing infection. *Phytomedicine*, 17; 1040-1046.
- Şahin, R., 2007. *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
- Tormo, M.A., Martí, M., Valle, J., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., Penadés, J.R., 2005. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 187(7):2348-56.

- Van Delden, C., ve Iglewski, B.H. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 4:551–560.
- Vasil, M.L. ve Ochsner, U.A., 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular Microbiology*, 34(3):399–413.
- Public Health England (UK Standards for Microbiology Investigations)., 2015. Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services. Public Health Services, 3: 1-41.
- Venturi, V., 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30 (2), 274–291.
- Vuong C, Otto M., 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbial Infection*, 4:481-489.
- Wiener-Kronish, J.P., Sakuma, T., Kudoh, I., 1993. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa pneumonia* in anesthetized rabbits. *Journal of Appl Physiology*, 75(4):1661–1669
- Wong, A.C.L., 1998. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science*, 81:2765-2770.
- Woods, D.E., 2004. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiology*, 12 (10): 437-439.
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A. ve Parsek, M.R., 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100:7907–7912.
- Wu, L.R., Zaborina, O., Zaborin, A., Chang, E.B., Musch, M., Holbrook, C., Turner, J.R. ve Alverdy, J.C., 2005. “Surgical injury and metabolic stress enhance the virulence of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*,” *Surgical Infection*, 6: 185–195.
- Zhu, J. Ve Winans, S.C., 2001. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 98(4): 1507–1512.