



MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**QUORUM SENSİNG İNHİBİSYONUNUN  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA  
FLORESAN İŞİMA VE KRT-PZR  
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK  
KANTİTATİF OLARAK  
KARŞILAŞTIRILMASI**

BARIŞ GÖKALSIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı  
Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Yrd. Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2015



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**QUORUM SENSİNG İNHİBİSYONUNUN**  
***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA**  
**FLORESAN İŞİMA VE KRT-PZR**  
**YÖNTEMLERİ KULLANILARAK**  
**KANTİTATİF OLARAK**  
**KARŞILAŞTIRILMASI**

---

BARIŞ GÖKALSIN

520114003

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Yrd. Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2015



**MARMARA UNIVERSITY  
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES  
IN PURE AND APPLIED SCIENCES**



**QUANTITATIVE  
COMPARISON OF QUORUM SENSING  
INHIBITION ON *PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA* BY FLUORESCENCE AND  
QRT-PCR METHODS**

---

**BARIŞ GÖKALSIN**

520114003

**MASTER THESIS**

Department of Biology

Biology Program

**THESIS ADVISOR**

Assist. Prof. Dr. N. Cenk SESAL

**ISTANBUL, 2015**

---

# MARMARA ÜNİVERSİTESİ

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Barış GÖKALSIN'ın "Quorum Sensing İnhibisyonunun *Pseudomonas aeruginosa*'da Floresan Işıma Ve kRT-PZR Yöntemleri Kullanılarak Kantitatif Olarak Karşılaştırılması" başlıklı tez çalışması, 11 Ocak 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

### Jüri Üyeleri

Yrd.Doç.Dr. N. Cenk SESAL (Danışman)

Marmara Üniversitesi .....(İMZA).....

Prof.Dr. Meral BİRBİR (Üye)

Marmara Üniversitesi .....(İMZA).....

Yrd.Doç.Dr. İskender KARALTI (Üye)

Yeditepe Üniversitesi .....(İMZA).....

### ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.01./2016. tarih ve 2016/02-02 sayılı kararı ile Barış GÖKALSIN'ın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAHSİ



## **TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)**

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, destek olmak için her zaman elinden geleni yapan, yardımları sayesinde çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Cenk SESAL'a teşekkür ederim. Üniversite eğitimim süresince bana her zaman örnek olan ve çalışmalarına destek veren Dr. Işıl İSMAİLOĞLU, Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN, Doç. Dr. Filiz VARDAR ve Prof. Dr. Meral BİRBİR'e teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan, dostluklarını ve yardımlarını asla esirgemeyen Birkan AÇIKGÖZ, Salim SÜNER, Özge KEKEÇ, Nazlıhan YILDIRIM, Ezgi UÇARKUŞ, Busecan AKSOYDAN, Şevval Maral ÖZCAN ve Buse BERBER'e teşekkür ederim.

Bu tez kapsamındaki çalışmalara FEN-C-YLP-130515-0187 no'lu proje ile destek olan BAPKO ve 113S306-COST FA1202 no'lu proje aracılığıyla destek olan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden sonsuz sevgi, sabır ve desteklerini esirgemeyen aileme ve ikinci ailem olarak gördüğüm yakın arkadaşlarıma, öğrenim hayatımda da her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

**Aralık / 2015**

**Barış GÖKALSIN**

<b>İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS</b>	<b>SAYFA</b>
<b>TEŞEKKÜRLER (ACKNOWLEDGEMENT)</b>	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS</b>	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>SEMBOLLER / SYMBOLS</b>	<b>vii</b>
<b>KISALTMALAR / ABBREVIATIONS</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES</b>	<b>ix</b>
<b>TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ / INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1. Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama) Mekanizması	1
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2.1. Morfolojisi ve özellikleri	3
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Quorum Sensing Mekanizmaları	3
1.3.1. <i>lasI/lasR</i> sistemi	5
1.3.2. <i>rhlI/rhlR</i> sistemi	5
1.3.3. Kinolon sinyal sistemi	5
1.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da biyofilm	5
1.4. Quorum Sensing inhibisyonu	6
1.4.1. QSI sekonder metabolitler	7
1.5. Quorum Sensing İnhibisyonu Kantitatif Analiz Yöntemleri	8
1.5.1. Kantitatif Revers-Transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR)	9
1.5.2. Floresan ekspresyon analizi	9
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD</b>	<b>11</b>
2.1. MATERYAL	11
2.1.1. Bakteri suşları	11
2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	12
2.1.3. Kullanılan cihazlar	12
2.1.4. Besiyerlerinin hazırlanması	13
2.1.4.1. Sıvı besiyeri - Lysogeny Broth (LB)	13

2.1.4.2. Sıvı minimal besiyeri - M9 Minimal Medium	13
2.1.4.3. Katı besiyeri - Lysogeny Broth Agar (LB Agar)	14
2.1.5. Kimyasalların hazırlanması	14
2.1.5.1. Evernik asit QSI çözeltilisinin hazırlanması	14
2.2. YÖNTEM	14
2.2.1. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması	14
2.2.2. Bakteri suşlarının uygulanacak yoğunluklarının belirlenmesi	15
2.2.3. Floresan biyosensör yöntemiyle QSI taraması	15
2.2.3.1. QSI doz uygulaması	15
2.2.3.2. Floresan ışımaya ölçümleri	16
2.2.4. kRT-PZR yöntemi ile gen ekspresyon analizi	16
2.2.4.1. Hedef genlere uygun primer ve problemlerin tasarımı	16
2.2.4.2. RNA izolasyonu	17
2.2.4.3. cDNA sentezi	18
2.2.4.4. kRT-PZR ile cDNA'ların çoğaltılması	19
2.2.4.5. kRT-PZR bulgularının analizi	19
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA /RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>20</b>
3.1.BULGULAR	20
3.1.1. QS inhibisyonu floresan ışımaya yöntemi bulguları	20
3.1.1.1. <i>lasB-gfp</i> biyosensör suşu bulguları	20
3.1.1.2. <i>rhlA-gfp</i> biyosensör suşu bulguları	25
3.1.1.3. Penisillik asit uygulaması	31
3.1.2. QS inhibisyonu kRT-PZR yöntemi bulguları	33
3.1.2.1. <i>lasB</i> gen ekspresyonu bulguları	34
3.1.2.2. <i>rhlA</i> gen ekspresyonu bulguları	36
3.1.3. Floresan ışımaya ve kRT-PZR yöntemleri ile elde edilen bulguların karşılaştırılması	38
3.1.3.1. <i>lasB</i> ölçümlerinin karşılaştırılması	38
3.1.3.2. <i>rhlA</i> ölçümlerinin karşılaştırılması	39
3.2.TARTIŞMA	39

<b>4. SONUÇLAR / CONCLUSIONS</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR / REFERENCES</b>	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>52</b>





## ÖZET

### QUORUM SENSING İNHİBİSYONUNUN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA FLORESAN IŞIMA VE KRT-PZR YÖNTEMLERİ KULLANILARAK KANTİTATİF OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI

Mikroorganizmaların geliştirdikleri antibiyotik dirençleri son yıllarda sağlık açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bağışıklık yetersizliği olan kişilerde yaralı dokuları kolayca enfekte edebilen fırsatçı patojenlerden *Pseudomonas aeruginosa*, bu mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. *P. aeruginosa*, ürettiği ekzopolisakkaritler ile biyofilm oluşturarak ilaç ve dezenfektanlara karşı koyabilmektedir. Biyofilm oluşumundaki en önemli etkenlerden birinin Quorum Sensing (QS) mekanizması olduğu bilinmektedir. Sinyal molekülleri ile çalışan QS mekanizmasının bloke edilmesi ile bakterilerin iletişimi sekteye uğratılabilmekte ve biyofilm oluşturmaları engellenerek daha savunmasız kalmaları sağlanabilmektedir.

Bu çalışmada bir liken sekonder metaboliti olan evernik asitin, antibiyotik maddelere alternatif veya yardımcı olabilecek, *P. aeruginosa* üzerinde etkili Quorum Sensing İnhibitörü (QSI) özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda, sekonder metabolitlerin moleküler düzeyde QS bağlantılı gen ekspresyonuna etkisinin floresan protein ışımaya yöntemi ile incelenmesi ve elde edilen verilerin kRT-PZR sonuçları ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ekspresyon ve QSI analizleri için kRT-PZR metoduyla birlikte canlı biyosensör hücreler aracılığıyla *in vivo* ölçüme izin veren, GFP temelli floresan ışımaya yöntemi kullanılmıştır. Böylece gen anlatımının ve bağlantılı olarak QS mekanizmasının inhibisyonunun gerçek zamanlı izlenmesi ve yöntemlerin karşılaştırılması ayrıca hedeflenmiştir.

QSI taramaları sonucunda evernik asitin belirli konsantrasyonlarında QS bağlı *lasB* ve *rhlA* genlerinin ekspresyonlarını inhibe ettiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile *P. aeruginosa* üzerinde QSI özellikli doğal maddelerin belirlenmesi açısından kantitatif iki yöntem karşılaştırılmıştır. QSI ve ilgili gen ekspresyonları üzerinde etkili olabilecek koşul veya maddeler ile ilgili çalışmalarda floresan biyosensör suşların kullanılmasının kolaylık sağlayabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca elde edilen evernik asit inhibisyon değerleri ile antibiyotiklere yardımcı ilaç geliştirme çalışmaları için ön araştırmalar ortaya çıkarılmıştır.

## ABSTRACT

### QUANTITATIVE COMPARISON OF QUORUM SENSING INHIBITION ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BY FLUORESCENCE AND QRT-PCR METHODS

The antibiotic resistance of microorganisms is becoming a major problem for health in recent years. One of these microorganisms is *Pseudomonas aeruginosa*: an opportunistic pathogen that can easily infect wounded tissues in immunocompromised people. *P. aeruginosa* can resist against drugs and disinfectants by producing exopolysaccharides that form biofilm. It is known that Quorum Sensing (QS) is one of the most important factors in biofilm formation. Inhibiting QS signals can block bacterial communication and prevent biofilm formation, leaving them more vulnerable.

A lichen secondary metabolite evernic acid was chosen to screen for Quorum Sensing Inhibitor (QSI) activity that may replace or assist antibiotic treatments on *P. aeruginosa*. Accordingly, it was aimed to analyze effects of secondary metabolites on specific QS regulated gene expressions via fluorescent protein method and compare the results with qRT-PCR method. Together with PCR method, GFP based fluorescence method, which enables *in vivo* measurements of live biosensor cells, was employed for QSI and expression analyses. Therefore, real time observations of QS inhibition and relevant gene expressions were conducted and a comparison of two methods was also aimed.

QSI screens have shown that evernic Acid inhibits expressions of QS related *lasB* and *rhlA* genes at certain concentrations. Two quantitative methods were compared for determining natural products with QSI properties on *P. aeruginosa*. It was concluded that fluorescent strains can easily be used in future research and assist in studies on conditions or substances that may affect QS and related gene expressions. Moreover, with the inhibition data, preliminary studies were revealed for drug research to supplement antibiotics.

## SEMBOLLER / SYMBOLS

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
3-oxo-C12-HSL	: N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin Lakton
C4-HSL	: N-bütiril Homoserin Lakton
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
l	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
mg	: Miligram
MgSO <sub>4</sub>	: Magnezyum Sülfat
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre

## KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

AHL	: Açıl Homoserin Lakton (Acyl Homoserine Lactone)
AI	: Otoindüktör (Autoinducer)
CDC	: Hastalıklar Kontrol ve Koruma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Ct	: Eşik Değeri (Crossing Point)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
OD	: Optik Yoğunluk (Optical Density)
PAI	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> otoindüktör molekülleri
PQS	: <i>Pseudomonas</i> Kinolon Sinyali
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFU	: Görelî Floresans Birimleri (Relative Fluorescence Units)
QQ	: Salt Çoğunluk Baskılama (Quorum Quenching)
QS	: Salt Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing)
QSI	: Quorum Sensing İnhibitörü (Quorum Sensing Inhibitor)
UPL	: Universal Probe Library
UV	: Ultraviyole (Ultraviolet)

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES****SAYFA**

<b>Şekil 1.1.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'daki Las/Rhl QS sistemleri ve virulans regülasyonları	4
<b>Şekil 1.2.</b> <i>P. aeruginosa</i> QS sinyal molekülleri	4
<b>Şekil 1.3.</b> Bakterilerde biyofilm oluşumu	6
<b>Şekil 1.4.</b> Yeşil Floresan Proteini (GFP)	10
<b>Şekil 2.1.</b> <i>lasB</i> gen sekansı	17
<b>Şekil 2.2.</b> <i>rhlA</i> gen sekansı	17
<b>Şekil 3.1.</b> <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşunun 7,25-116µM arasındaki konsantrasyonlarda evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği	22
<b>Şekil 3.2.</b> <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> 14'üncü saat evernik asit konsantrasyonuna bağlı inhibisyon grafiği	23
<b>Şekil 3.3.</b> <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) grafiği	25
<b>Şekil 3.4.</b> <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşunun 7,25-116µM arasındaki konsantrasyonlarda evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği	28
<b>Şekil 3.5.</b> <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> 14'üncü saat evernik asit konsantrasyonuna bağlı inhibisyon grafiği	29
<b>Şekil 3.6.</b> <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) grafiği	31
<b>Şekil 3.7.</b> <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşunun penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği.	32
<b>Şekil 3.8.</b> <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşunun penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği.	33
<b>Şekil 3.9.</b> Evernik asit dozları uygulanmış PAO1 suşuna ait <i>lasB</i> gen amplifikasyon grafiği	34
<b>Şekil 3.10.</b> QSI evernik asit uygulaması sonucu <i>lasB</i> geni ekspresyon oranları	35
<b>Şekil 3.11.</b> Evernik asit dozları uygulanmış PAO1 suşuna ait <i>rhlA</i> gen amplifikasyon grafiği	36
<b>Şekil 3.12.</b> QSI evernik asit uygulaması sonucu <i>rhlA</i> geni ekspresyon oranları	37

<b>Şekil 3.13.</b> <i>lasB-gfp</i> suşu QS inhibisyonu oranları ile PAO1 <i>lasB</i> gen ekspresyonu oranlarının karşılaştırılması	38
<b>Şekil 3.14.</b> <i>rhlA-gfp</i> suşu QS inhibisyonu oranları ile PAO1 <i>rhlA</i> gen ekspresyonu oranlarının karşılaştırılması	39



<b>TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Tablo 1.1.</b> <i>P. aeruginosa</i> AHL QS Sistemi	3
<b>Tablo 1.2.</b> AHL biyosensör suş örnekleri	8
<b>Tablo 2.1.</b> Çalışmada kullanılan suşlar	15
<b>Tablo 2.2.</b> Kullanılan primerler	17
<b>Tablo 3.1.</b> <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans miktarları	20
<b>Tablo 3.2.</b> <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) sonuçları	23
<b>Tablo 3.3.</b> <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans miktarları	26
<b>Tablo 3.4.</b> <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) sonuçları	29
<b>Tablo 3.5.</b> İzole edilen RNA moleküllerinin saflık ve konsantrasyon ölçümleri	32
<b>Tablo 3.6.</b> Gerçek zamanlı PZR sonunda gözlenen <i>lasB</i> geni Ct değerleri	33
<b>Tablo 3.7.</b> Gerçek zamanlı PZR sonunda gözlenen <i>rhlA</i> geni Ct değerleri	35

## BÖLÜM 1

### 1. GİRİŞ / INTRODUCTION

Bakteriler, sürekli değişen ortam şartlarına adapte olabilmekte ve bu şartlarda çoğalabilmektedirler. Belli mekanizmalar ile çevre şartlarını algılayabilmekte ve gen ekspresyonlarını düzenleyerek bu şartlara uyum sağlayabilmektedirler. Bu mekanizmalardan biri “İkili Bileşen Sistemi” olarak bilinmektedir. Bu sistem canlıların dış şartlar ile ilgili aldıkları sinyallerin bir regülatör tarafından algılanarak cevap genlerinin ekspresyonunu düzenlemesi olarak tanımlanmaktadır. Fakat bakterilerin sadece çevre şartlarını değil, birbirlerini algılayarak bir iletişim içerisinde oldukları da fark edilmiştir. Bu iletişim, ortama salgıladıkları kimyasal sinyal molekülleri ile gerçekleşmekte ve Quorum Sensing (QS - Salt Çoğunluk Algılama) olarak adlandırılmaktadır [1].

#### 1.1. Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama) Mekanizması

QS, mikroorganizmaların gen ekspresyonlarını sinyal molekülleri aracılığıyla popülasyon yoğunluğuna göre toplu olarak düzenledikleri bir iletişim mekanizması olarak tanımlanmaktadır [2]. Bakteriler, buldukları ortama sürekli, “otoindüktör” (AI) olarak isimlendirilen sinyal molekülleri salgılamaktadırlar. Dolayısıyla bakteriler çoğaldıkça ortamdaki AI yoğunluğu da artmaktadır. Bu yoğunluk belli bir eşiği geçtiğinde bakteriler tarafından algılanarak, QS mekanizması tarafından kontrol edilen genlerin toplu olarak ekspresyonuna fırsat vermektedir.

Bakterilerin tür içi iletişim için salgıladıkları QS sinyal molekülleri farklılık göstermektedir. Gram negatif bakterilerin birçoğunda “Açıl Homoserin Lakton” (AHL) adı verilen ufak AI moleküller sentezlenmekte iken, Gram pozitif bakterilerde “Otoindüktör Peptitler” (AIP) salgılanmaktadır. AHL molekülleri ilk kez *Vibrio fischeri* türünde belirlenmiş, bakterinin biyoluminesans özelliğinin bu sinyal molekülleri belli bir yoğunluğa ulaştığında ortaya çıktığı fark edilmiştir. Bunun yanı sıra bakterilerin türler arası iletişim için “Otoindüktör-2” (AI-2) adı verilen moleküller kullandıkları da belirtilmektedir [3, 4].

Gram negatif bakterilerin farklı türleri açıl zincir uzunlukları farklı AHL molekülleri sentezlemektedirler. AHL molekülleri LuxI tipinde bir sentaz tarafından



sentezlenmekte ve LuxR tipi transkripsiyonal aktivatör proteinlere bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir.

Bakterilerin QS mekanizması aracılığıyla salt çoğunluk miktarını algılayarak belirli genlerin ekspresyonlarını birlikte gerçekleştirmeleri, onlara önemli avantajlar sağlamaktadır. QS ile patojenite, biyofilm oluşumu, konjugasyon, motilite, biyoluminesans gibi birçok fizyolojik özellik kontrol edilmekte, popülasyonun fizyolojisi ve davranışlarında birçok düzenleme yapılabildiğini sağlamaktadır [5]. Özellikle Gram negatif bakterilerde konak hücreyi parçalayıcı enzimlerin de QS sistemi ile regüle edildiği bilinmektedir.

Mikroorganizmalar kendilerini dezenfektanlar, ultraviyole ışınları, pH, sıcaklık, enzimler ve antibiyotikler gibi tehditlerden korumak için biyofilm oluşturmaktadırlar. Planktonik bakteri formlarının yarattığı akut enfeksiyonlar genellikle antibiyotikler ile tedavi edilebilirken, sesil biyofilm formların antibiyotiklere 3000 kat daha dirençli oldukları saptanmıştır [6]. Çeşitli yollarla bulaşan bakteriyel kolonizasyonlar içindeki mikroorganizmaların belli bir popülasyon yoğunluğuna eriştiklerinde, dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurdukları, bu yapıda çoğalarak gelişmeleri sonucu makroskobik olarak görülen ve ortadan kaldırılması çok zor olan biyofilm yapısını oluşturdukları bilinmektedir [7, 8]. Biyofilm tabakasının, besin maddelerini biriktirme, içindeki mikroorganizmaları dezenfektanlar gibi kimyasallardan, antibiyotikten, UV ışınları, pH ve sıcaklık dalgalanmaları gibi fiziksel şartlardan, bakterileri yiyerek beslenen canlılar ve virüs gibi biyolojik tehditlerden koruma gibi birçok avantajı bulunmaktadır [9]. Biyofilm oluşumundaki en önemli etkenlerden birinin QS mekanizması olduğu bilinmektedir [10].

Bakterilerin pek çok davranış ve fizyolojik özelliklerini kontrol eden QS mekanizması, özellikle antibiyotiklere dirençli bakteriler ile mücadelede önemli bir hedef haline gelmiştir.

## **1.2. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa*, çoğunlukla bağışıklık sistemleri yetersiz kişilerde ve kistik fibroz hastalarında kronik enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı bir patojendir [11, 12]. Genellikle toprak ve suda yaşayan, solunum, idrar ve deri enfeksiyonlarına yol açan Gram negatif bir bakteridir. *P. aeruginosa* kaynaklı iltihaplar ölümcül sonuçlara yol

açabilmektedir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi'ne (CDC) göre ABD'de her yıl yaklaşık 51.000 *P. aeruginosa* enfeksiyonu gerçekleşmektedir [13]. Bu enfeksiyonların 6000 vakasında birden fazla ilaca direnç saptanmakta ve 400'ü ölümlerle sonuçlanmaktadır. Ayrıca tüm hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa*'nın sorumlu olduğu düşünülmektedir [14].

### 1.2.1. Morfolojisi ve özellikleri

*P. aeruginosa*, Gram negatif boyanan, 0,5-1,0 x 1,5-5,0µm ebatlarında, basil veya kokobasil morfolojisi gösteren, zorunlu aerob bir bakteridir. 1 adet flagelluma sahiptir ve çok hareketlidir. Mikroskopta çoğunlukla tek tek gözlenebilirler. Optimal 37°C'de sporsuz olarak ürerler. Alginat salgıları sebebiyle çoğunlukla mukoid koloniler meydana getirirler. Üredikleri besiyerlerinde kendilerine has aromatik bir koku oluştururlar. Birçok suşu yeşil renkli piyosiyanın pigmenti oluşturur ve çoğaldıkları ortamları bu renge boyarlar. Bazı suşları fluoresssein [sarı], piyorubin [kırmızı- kahverengi], piyomelanin[siyah] gibi farklı renklerde pigmentler oluşturabilirler [15].

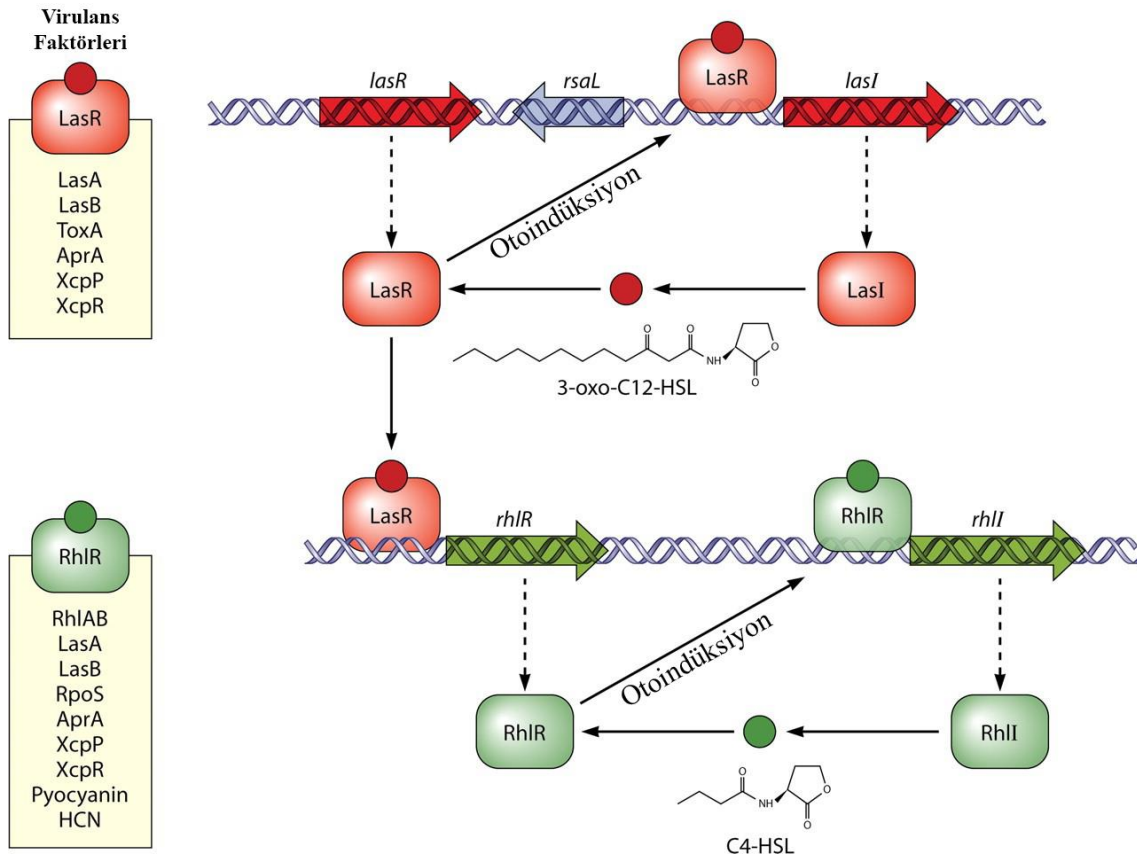
### 1.3. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Mekanizmaları

Birçok bakteri türünde olduğu gibi *P. aeruginosa*'nın da iletişim sinyalleri salgılayarak, QS mekanizması ile bulunduğu ortamdaki bakteri yoğunluğunu belirleyebildiği saptanmıştır. QS sisteminin *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunun yanı sıra çeşitli virulans faktörlerinin üretimini de düzenlediği bilinmektedir (Tablo 1.1) [16, 17, 18, 19]. *P. aeruginosa*'nın ortam koşullarındaki değişikliğe bağlı olarak strese girmesi ve dolayısıyla biyofilm oluşturması QS mekanizması tarafından gen ekspresyonu vasıtasıyla kontrol edilmektedir [20].

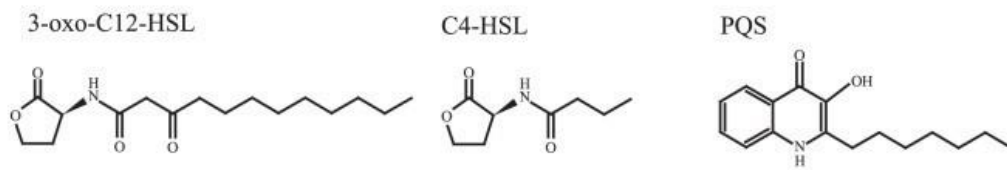
**Tablo 1.1.** *P. aeruginosa* AHL QS Sistemi

Tür	QS Geni	Sinyal molekülü	QS ile düzenlenen fonksiyonlar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>lasI, lasR</i> <i>rhII, rhIR</i>	3-oxo-C <sub>12</sub> -AHL C <sub>4</sub> -AHL	Biyofilm oluşumu, elastaz, Xcp salgısı, lipaz, ekzotoxin A, lektinler, alkalın proteaz, hidrojen siyanit, yayılma, titreşme, piyosiyanın, ramnolipidler, virulans vb. [17].

AHL temelli *P. aeruginosa* QS mekanizması *luxI* ve *luxR* sistemlerine homolog iki önemli sistem ile düzenlenmektedir: *lasI/lasR* ve *rhlI/rhlR* [21]. *lasI* ve *rhlI* genleri, bakterilerin haberleşmesinde görevli olan AI moleküllerinin sentezlenmesinde rol almaktadır [22, 23]. *lasR* ve *rhlR* ise *Pseudomonas* otoindüktör (PAI) moleküllerinin bağlandığı ve diğer virulans veya biyofilm gibi faktörlerden sorumlu genlerin anlatımını başlatan transkripsiyonel aktivatörlerdir. LasI, PAI-1 molekülünü; RhlI ise PAI-2 molekülünü sentezlemektedir (Şekil 1.1). Fakat Las sistemi, Rhl sistemini de kontrol etmektedir. PAI-1 ve PAI-2 sinyalleri, farklı açıl karbon zinciri uzunluklarına sahip AHL molekülleridir ve bunların dışında üçüncü bir QS sistemine ait *Pseudomonas* kinolon sinyali (PQS) bulunmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. *P. aeruginosa*'daki Las/Rhl QS sistemleri ve virulans regülasyonları [24].



Şekil 1.2. *P. aeruginosa* QS sinyal molekülleri [25].

### 1.3.1. *lasI/lasR* sistemi

Yüksek hücre konsantrasyonunda LasI tarafından üretilen bir çeşit AHL olan “N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lakton” (3-oxo-C12-HSL; PAI-1) sinyal molekülleri LasR ile bağlanmakta ve oluşan yapı, *lasI* (PAI-1 sentaz), *lasA* (LasA proteaz), *toxA* (eksotoksin A) ve *lasB* (elastaz) genlerini de içeren 100’e yakın genin regülasyonunu üstlenir. LasR dışında QscR reseptörünün de sinyalleri algılayarak LasR ve RhIR kontrolündeki genlerin fazla ekspresyonunu engellediği düşünülmektedir [26].

### 1.3.2. *rhlI/rhlR* sistemi

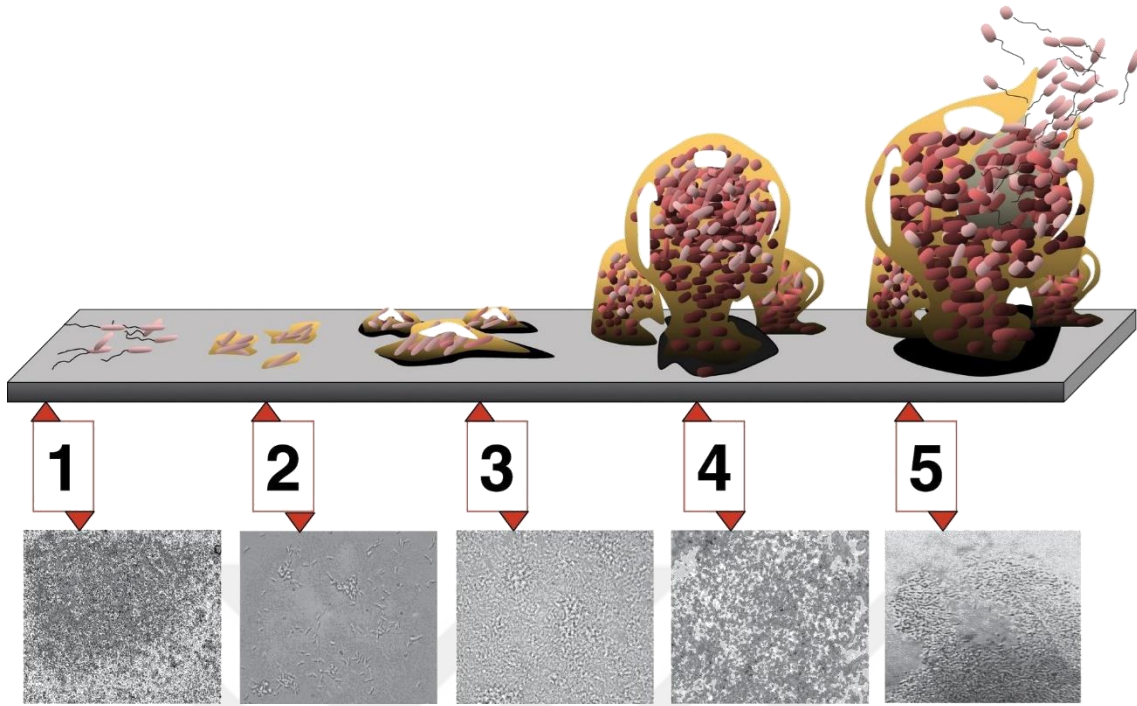
RhII (PAI-2 sentaz) tarafından bir diğer AHL çeşidi olan “N-butanoyl-L-homoserin lakton” (C4-HSL; PAI-2) sinyal molekülleri üretilir. RhIR ile etkileşime geçen PAI-2 molekülleri, *rhlI* (PAI-2 sentaz), *rhlAB* (ramnolipid biyosentezi) ve stres cevabını meydana getiren *rpoS* gibi pek çok genin regülasyonunu üstlenmektedir.

### 1.3.3. Kinolon sinyal sistemi

*P. aeruginosa*, *lasI* ve *rhlI* sistemleri dışında üçüncü bir QS sistemine sahiptir. *Pseudomonas* Kinolon Sinyali (PQS), 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon molekülü ve PqsR reseptör proteini, *pqsABCDE* regülonunu düzenlemektedir. PAI-1 sinyal moleküllerinin yoğunluğu bu operonun ekspresyonunu artırırken, PAI-2 sinyal molekülü azaltmaktadır. PQS ile *las* ve *rhl* sistemleri arasında bir köprü oluşturulduğu ve *rhl* sistemine transkripsiyon başlatıcı bir etki oluşturulduğu düşünülmektedir [27, 28].

### 1.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*'da biyofilm

*Pseudomonas aeruginosa* da pek çok bakteri gibi QS mekanizması yardımıyla biyofilm oluşturmaktadır (Şekil 1.3). Bağışıklık yetersizliği olan kişilerde kronik enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin çoğunun biyofilm formunda oldukları bilinmektedir [29]. *P. aeruginosa* biyofilm oluşturmak için flagella aracılığıyla yüzeye tutunurlar. Daha sonra salgıladıkları polimer matriks içerisinde konak bağışıklık sistemi ve antibiyotikler gibi dış etmenlerden korunaklı olarak çoğalmaya devam ederler [12]. *P. aeruginosa*'nın, planktonik formdan biyofilm formuna dönüşmek için *las* sistemini kullandığı bilinmektedir [30].



**Şekil 1.2.** Bakterilerde biyofilm oluşumu [31].

1- İlk yapışma evresi 2- Dönüşümsüz yapışma evresi 3- Büyüme evresi I 4- Büyüme evresi II 5- Dağılma evresi

#### 1.4. Quorum Sensing İnhibisyonu

Sinyal molekülleri ile çalışan QS mekanizmasının bloke edilmesi ile bakterilerin iletişimi sekteye uğratılabilmekte ve biyofilm oluşturmaları engellenerek daha savunmasız kalmaları sağlanabilmektedir [32]. QS mekanizmasının engellenmesi ile konağın bağışıklık sisteminin tepkisi etkinleştirilmekte ve bakterilerin konaktan uzaklaştırılması mümkün kılınmaktadır [33, 34]. Bakterilerin temel yaşam faaliyetlerine saldırarak öldürmeye çalışmaktansa, onları strese sokmadan ve dirençli biyofilm formlarına dönüşmelerine izin vermeden iletişimlerini keserek virulanslarını engellemek alternatif bir yaklaşımdır. Günümüzde önemli bir sorun haline gelen bakterilerin geliştirdikleri antibiyotik direnci sebebiyle QS inhibisyonu araştırmaları önem kazanmaktadır.

Dong ve ark., bakterilerin QS sinyal mekanizmasını bloke ederek biyofilm oluşturmalarını engellenmek için QS iletişimi engelleme (Quorum Quenching - QQ)'nin kullanılabileceğini ve bu mekanizmanın iki basamakta gerçekleşebildiğini belirtmişlerdir [35]. QQ yolunun basamaklarından birinin sinyalleri QQ enzimleri ile inhibe ederek

Homoserin Lakton (HSL) yoğunluğunu azaltmak olduğunu, ikincisinin ise sinyal alıcılarının inhibisyonu olduğunu; bu işlemin bakteri, hayvan, bitki gibi canlıların içerdiği etken maddeler ile doğal olarak veya sentetik moleküller kullanılarak yapılabileceğini ifade etmişlerdir. Bu aşamada QS sinyal mekanizmasını engellemede kullanılacak, antibiyotik maddelerin yerini alabilecek veya onlara yardımcı olarak kullanılacak doğal moleküllerin belirlenmesine duyulan ihtiyaç ortaya çıkmaktadır [36].

Doğada milyarlarca yıldır var olduğu düşünülen QS sistemini engelleme yetisine sahip, canlıların ürettiği “Quorum Sensing İnhibitörü” (QSI) moleküllerin de var olduğu düşünülmüş ve pek çoğu sekonder metabolitlerden oluşan örneklerle rastlanmıştır [37].

#### **1.4.1. QSI sekonder metabolitler**

İlaç geliştirilmesinde doğa ve özellikle bitkilerdeki zengin primer ve sekonder metabolit çeşitliliği en önemli kaynaklardan biri olarak kabul edilmektedir. Bitkiler ve likenler, çoğu asidik özellikte ve türe özgün olan çeşitli “sekonder metabolitler” üretmektedirler. Liken metabolitleri ile yapılan çok sayıda çalışma, likenlerin antibakteriyel, antiviral, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, antitümöral, antiherbivor, enzim inhibitörü vb. birçok özelliğe sahip olduklarını göstermektedir [38].

Hastalıkların önlenmesinde kullanılan likenlerin iyileştirici özelliklerinin, yapılarında bulunan asit özellikteki sekonder metabolitlerden kaynaklandığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [39, 40]. Likenler çok sayıda biyotik ve abiyotik strese maruz kalırlar ve sekonder metabolitlerin üretimi bu stres ile başa çıkmanın birçok yolundan biridir [41, 42]. Likenlerin metabolizma ürünü olarak ürettikleri 1050’ye yakın özgün sekonder metabolit ortaya çıkarılmıştır [43]. Ayrıca likenlerden elde edilen sekonder metabolitler kullanılarak bazı antibiyotik etkili bileşikler üretilmektedir [44, 45].

Bu bilgiler ışığında *P. aeruginosa*’nın QS sinyal mekanizmasını ve biyofilm oluşturmasını engelleyebilecek liken sekonder metabolitlerini ortaya çıkartmak önem taşımaktadır.

#### **1.5. Quorum Sensing İnhibisyonu Kantitatif Analiz Yöntemleri**

Bakteri türlerinin çoğunun QS mekanizmaları henüz ortaya çıkarılmamıştır.

Araştırmalar sonucunda az sayıda bakterinin QS sistemleri ve ilgili genleri bilinmektedir. Bu sebeple QS sistemlerinin inhibe edilip edilmediğinin tam olarak anlaşılabilmesi, sınırlı sayıda bakteri türü ile gerçekleştirilebilmektedir. Fakat, QS sistemleri bilinen bakteri türleri sayesinde AHL üretemeyen fakat algılayan biyosensör suşlar oluşturulmuş ve incelenmek istenilen bakterilerin AHL sinyalleri kullanıp kullanmadığının veya AHL miktarlarının inhibe edilip edilmediğinin kantitatif analizlerinin yapılmasına imkan sunulmuştur (Tablo 1.2).

*P. aeruginosa*, QS sistemi neredeyse tümüyle ortaya çıkarılmış mikroorganizmalardan biridir. QSI moleküllerin bu bakteri üzerindeki etkinliklerini ölçmek için biyoteknolojik yöntemler yardımıyla oluşturulacak biyosensör suşlar önem taşımaktadır. Bu suşların *P. aeruginosa* sinyalleri olan PAI-1 ve PAI-2 moleküllerini algılamaları ve kantitatif biyokimyasal, biyoluminesans veya floresans ölçüme izin verecek bir gen ekspresyonu gerçekleştirmeleri gerekmektedir. Özellikle floresan ışık üreten suşlar hassas kantitatif ölçümlere ve görüntülemeye izin vermektedir. Kullanılan floresans yöntemi ile ekspresyon analizi için gerekli olan DNA ya da RNA izolasyonuna gerek kalmadan ekspresyon seviyelerinin elde edilebileceği düşünülmektedir.

**Tablo 1.2.** AHL biyosensör suş örnekleri

Suş/Plazmid	Tür	QS Sistemi	Röportör Sistem	AHL Sinyali	Ref.
<i>C. violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum</i>	CviI/R ( <i>C. violaceum</i> )	Violacein pigmenti	C6-AHL	[46]
pSB401	<i>E. coli</i>	LuxI/R ( <i>V. fischeri</i> )	luxCDABE (biyoluminesans)	C6-AHL	[47]
pSB536	<i>E. coli</i>	AhyI/R ( <i>A. hydrophyla</i> )	luxCDABE (biyoluminesans)	C4-AHL	[48]
pSB1075	<i>E. coli</i>	RhlI/R ( <i>P. aeruginosa</i> )	luxCDABE (biyoluminesans)	C12-3-oxo-AHL	[47]
pZLR4	<i>A. tumefaciens</i>	TraI/R ( <i>A. tumefaciens</i> )	$\beta$ -galactosidase	C8-3-oxo-AHL	[49]

### **1.5.1. Kantitatif Revers-Transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (kRT-PZR)**

QS mekanizmasının engellenmesi sonucunda belirli genlerin ekspresyonları da engellenebilmektedir. Genlerin anlatım miktarları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile incelenebilmektedir. Genellikle, hassas ve anında sonuç alınan gerçek zamanlı revers transkriptaz PZR (kRT-PZR) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin temeli incelenecek canlıdan izole edilen RNA moleküllerinden Revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmesine dayanmaktadır. Böylelikle Gerçek-Zamanlı PZR yardımıyla incelenen hedef cDNA moleküllerinin çoğaltılması sırasında floresan probalar aracılığıyla hassas ölçümler alınabilmektedir. Sonuçların analizi ile kantite edilen gen ekspresyon miktarlarının ne kadar arttığı ya da azaldığı hesaplanabilmektedir [50].

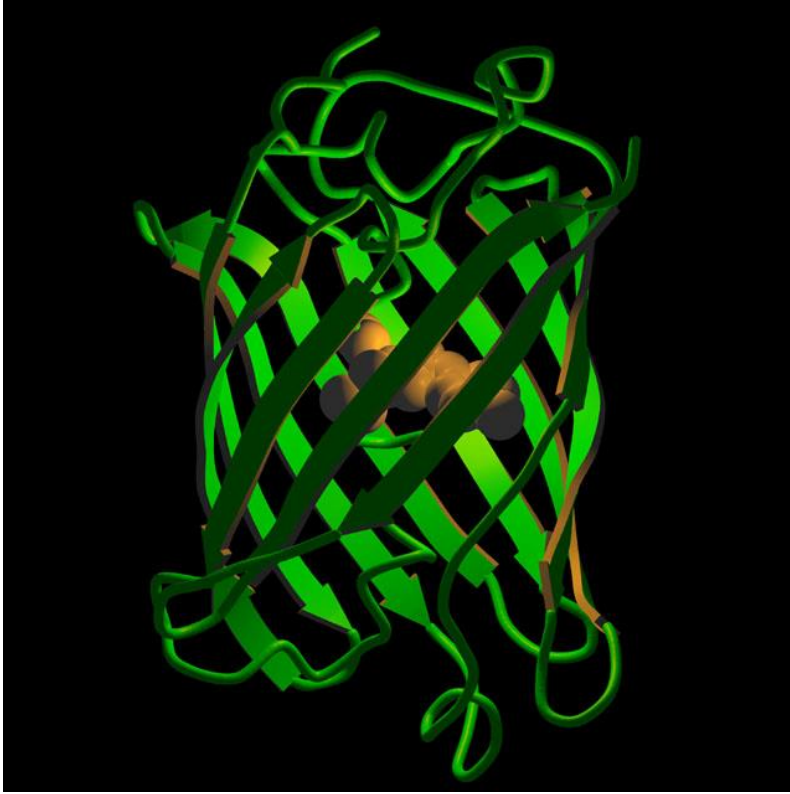
*In vitro* bir yöntem olarak kullanılan kRT-PZR hassas sonuçlar verse de *in vivo* yöntemlere göre daha masraflıdır ve anında sonuç gözlemlenmemektedir. QSI uygulamasının gerçek zamanlı kalitatif ve kantitatif bir şekilde ölçülmesi için daha az masraflı, farklı bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır.

### **1.5.2. Floresan protein ekspresyon analizi**

Bu alanda kullanılacak diğer bir yöntem ise Floresan protein ekspresyon analizi yöntemidir. Floresan protein ekspresyon analizi yönteminin temeli, istenilen genin ekspresyonu yanında ek ürün olarak floresan proteinin de ekspresyonunun gerçekleşmesine dayanır. Floresan teknolojisinin moleküler biyolojideki önemi özellikle Douglas Preshler ve arkadaşlarının 1992 yılında yeşil floresan proteinini (GFP) klonlamaları ile anlaşılmıştır (Şekil 1.4) [51]. *Aequorea victoria* denizanasında doğal olarak bulunan protein, ultraviyole (UV) ışık altında yeşil ışımaya gerçekleştirir. GFP'nin farklı renkleri mutasyonlar yardımı ile oluşturularak özellikle ekspresyon röportörü olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Floresan proteinler, birçok canlıda gen ekspresyonu analizleri için kullanılmış, proteinlerde takı olarak kullanılarak etkileşim incelenmesine olanak sağlamış, proteinlerin hücrede buldukları bölgelerin belirlenmesinde yardımcı olmuştur [52]. Klonlama ile biyosensör canlılar oluşturularak ilgilenilen genlerin anlatımı *in vivo* olarak incelenebilir kılınmıştır [53].



Yöntem yardımı ile QS mekanizması ile regüle edilen genler de floresans ölçümü ile incelenerek ekspresyon analizine tabi tutulabilmektedir. Floresan protein füzyonları ile *P. aeruginosa* için de araştırmalar gerçekleştirilmiştir [54]. Örneğin, QSI için PAI-LasR ile regüle edilen promotör bölgelere sahip bazı genlere GFP eklenerek incelemeler yapılmıştır [55].



**şekil 1.3.** Yeşil Floresan Proteini (GFP) [48].

## BÖLÜM 2

### 2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD

#### 2.1. Materyal

##### 2.1.1. Bakteri suşları

1. *P. aeruginosa* PAO1 Yabanıl tip (Wild type)
2. *P. aeruginosa lasB-gfp*
3. *P. aeruginosa rhlA-gfp*

##### 2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

1. LB Broth Besiyeri (Sigma-Almanya)
2. M9 Minimal Besiyeri (Amresco-ABD)
3. Bacto agar (Sigma-Almanya)
4. Etil Alkol (Merck-ABD)
5. Nitril Eldiven (Pudrasız) (Broche-Türkiye)
6. Alüminyum Folyo
7. Cam Deney Tüpleri
8. Portüp
9. Polistiren 96 Kuyucuklu Siyah Optik Mikroplaka (Thermo NUNC-ABD)
10. Plastik Petri Kapları (Fıratmed-Türkiye)
11. Bek Alevi
12. Platin Öze
13. Eküvyon çubuk
14. Cam baget
15. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-ABD)
16. Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 µl) (Hellma-Almanya)
17. Ultra Saf Su (ddH<sub>2</sub>O)
18. 0.45 µm'lik Filtre (Whatman-İngiltere)
19. Dimetil sülfoksit (Sigma-Almanya)
20. Gliserol (Merck-ABD)
21. High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche-İsviçre)

22. Gerçek zamanlı TaqMan PZR kiti (Roche-İsviçre)
23. cDNA sentez kiti (Roche-İsviçre)
24. HCl (Merck-ABD)
25. Gentamisin (Duchefa-Hollanda)
26. Evernik Asit (Extrasynthase-Fransa)
27. Tiyamin (Duchefa-Hollanda)
28. Kazamino asitler (BD-ABD)
29. Glukoz (Merck-ABD)

### 2.1.3. Kullanılan cihazlar

1. **Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek-ABD):** Bakterilerin floresans ve absorbans ölçümleri, RNA kantifikasyonu ve saflık ölçümü için kullanılmıştır.
2. **Soğutmalı Santrifüj (Beckman-Coulter-ABD):** PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), mRNA (mesajcı ribonükleik asit) ve cDNA (komplementer deoksiribonükleik asit) izolasyonunda kullanılmıştır.
3. **pH Metre (Thermo-ABD):** HCl (Hidroklorik asit) ve KOH (Potasyum hidroksit) kullanılarak kimyasalların pH ayarlamasında kullanılmıştır.
4. **Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur):** Suşların -86 °C'de uzun süreli saklanmasında (3-6 ay) kullanılmıştır.
5. **Derin Dondurucu (Vestel-Türkiye):** Primer, prob, mRNA, cDNA ve PZR kitlerinin -20 °C'de saklanması için kullanılmıştır.
6. **Manyetik Karıştırıcı (WiseStir-Almanya):** Besiyerleri otoklava atılmadan önce karışımın homojenize edilmesi için kullanılmıştır.
7. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD):** Sıvı bakteri kültürlerinin optik yoğunluklarının ölçümünde kullanılmıştır.
8. **Dijital Hassas Terazı (Ohaus-ABD):** Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
9. **İnkübatör (Memmert-Almanya):** Besiyerlerine ekilen suşların inkübasyonu için kullanılmıştır.
10. **Vorteks (Heidolph-Almanya):** Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.

11. **Buzdolabı (Siemens-Almanya):** Kimyasal ve hazırlanan katı-sıvı besiyerlerinin +4 °C’de saklanması için kullanılmıştır.
12. **Otoklav (Nüve-Türkiye):** Besiyerlerinin sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.
13. **Mikropipetler (1000 µl, 100 µl, 10 µl) (Thermo/ FinnpiPETTE-ABD):** Besiyerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.
14. **Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD):** Besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
15. **Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya):** *In vitro* süreçte yapılan bütün deneylerin gerçekleştirilmesi, kimyasalların hazırlanması, mRNA ve cDNA’ların kontamine olmasını engellemek için kullanılmıştır.
16. **Gerçek Zamanlı PZR (Roche LightCycler Nano-İsviçre):** QS inhibisyonunun yabancı tip suşta gen ekspresyonu ölçümü ile incelenmesi için kullanılmıştır.
17. **Termal döngü cihazı (Biorad-ABD):** mRNA’lardan cDNA eldesinde kullanılmıştır.
18. **Ultra Distile Saf Su Cihazı (Millipore-ABD):** Besiyeri ve PZR solüsyonları hazırlanması sırasında kullanılmıştır.

#### 2.1.4. Besiyerlerinin Hazırlanması

##### 2.1.4.1. Sıvı besiyeri - Lysogeny Broth (LB)

- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü
- 5 g NaCl

20 g LB broth tartılarak bir miktar distile suda çözülmüştür. Hacmi 1000 ml’ye tamamlanarak ardından otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir.

##### 2.1.4.2. Sıvı minimal besiyeri - M9 Minimal Medium

- 10,5 g M9 Broth
- 5 g Glukoz
- 5 g Kazamino Asitler
- 2 mM MgSO<sub>4</sub>
- 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>

LB besiyerinin oto-floresansı nedeniyle ölçümleri etkilememesi için deneylerde M9 minimal besiyeri kullanılmıştır. Toz halindeki M9 brothdan 10,5 g tartılmış ve bir miktar distile su ile çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri oda sıcaklığına ulaştıktan sonra glukoz, kazamino asitler, tiyamin, MgSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub> eklenmiş, daha sonra son hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Biyosensör suşlar için 30µg/ml son konsantrasyon olacak şekilde gentamisin antibiyotiği eklenmiştir [56, 57].

#### **2.1.4.3. Katı besiyeri - Lysogeny Broth Agar (LB Agar)**

- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü
- 5 g NaCl
- 12 g Bacto agar

LB brothtan toz olarak 20 g tartılmış ve 12 g Bacto agar eklenerek bir miktar distile suda çözdürülmüştür. Ardından hacmi 1000 ml’ye tamamlanmış ve otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Otoklavdan çıktıktan sonra soğutularak steril koşullarda 90mm çapındaki petri kaplarına 15’er ml dağıtılmıştır. Katılaştıran besiyerleri kullanıma kadar +4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

#### **2.1.5. Kimyasalların hazırlanması**

##### **2.1.5.1. Evernik asit QSI çözeltisinin hazırlanması**

Toz halinde temin edilen saf evernik asit (Extrasynthase – Fransa), dimetil silfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. Evernik asit, *Evernia* ve *Usnea* gibi cinslerde bulunan bir liken sekonder metabolitidir. Uygulamada kullanılmak üzere 155 µg/ml konsantrasyonuna seyreltilerek stok çözelti hazırlanmıştır.

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması**

Floresan biyosensör suşlar, QS ile regüle edilen *lasB* (elastaz) ve *rhlA* (ramnosiltransferaz 1 alt birim A) genleri ile GFP füzyonu ve marker olarak gentamisin

direnç geni bulundurmaktadır. Böylece QS mekanizması aktif iken ilgili genlerin ekspresyonu gerçekleşmekte, buna bağlı olarak GFP sentezlenmekte ve floresan ışına ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla floresan miktarı, bakteri yoğunluğu ve QS mekanizmasının çalışmasıyla orantılıdır.

Kullanılan tüm bakteri suşları Kopenhag Üniversitesi, Tim Holm Jakobsen ve Michael Givskov'dan temin edilmiştir (Tablo 2.1). Bakteri stok kültürleri, -86 °C'de %50 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. Stok kültürden deney sırasında kullanılmak üzere LB broth besiyerine ardı ardına 2 kez pasaj alınmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı plağa çizim yöntemi ile kontrol edilmiştir.

**Tablo 2.1.** Çalışmada kullanılan suşlar.

<i>P. aeruginosa</i>	Suş	Açıklama
	PAO1	Yabani tip (Wild type)
	<i>rhlA-gfp</i>	Gm <sup>r-30γ</sup> ; PAO1-ATCC, P <sub>rhlA-gfp</sub> (ASV)-P <sub>lac-rhlR</sub> -mini-Tn5 türevi: pMHRA [56]
	<i>lasB-gfp</i>	Gm <sup>r-30γ</sup> ; PAO1-ATCC, P <sub>lasB-gfp</sub> (ASV)-P <sub>lac-lasR</sub> -mini-Tn5 türevi: pMHLAS [57]

### 2.2.2. Bakteri suşlarının uygulanacak yoğunluklarının belirlenmesi

M9 besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılan bakterilerin konsantrasyonları UV-Vis spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD) yardımıyla belirlenmiştir. 600 nm dalga boyunda optik yoğunlukları (OD) ölçülmüş, gerekli seyreltmeler yapılarak McFarland 1 standardı (yaklaşık 3x10<sup>8</sup> cfu/ml) elde edilmiştir.

### 2.2.3. Floresan biyosensör yöntemiyle QSI taraması

#### 2.2.3.1. QSI doz uygulaması

96 kuyucuklu, floresan ölçümler için özel üretilmiş optik siyah mikrolakaların kuyucuklarına 100'er µl olacak şekilde M9 minimal besiyeri dağıtılmıştır. Mikrolakalarda yatay sıralardaki ilk kuyucuklara 100'er µl stok evernik asit QSI çözeltisi eklendikten sonra pipetaj yapılmış ve 100 µl çekilerek bir sonraki kuyucuğa aktarılmıştır. Tekrar pipetaj yapılarak bir sonraki kuyucuğa 100 µl aktarılmıştır. Bu işlem

tekrarlanarak her kuyucukta ½ oranında azalan bir seri dilüsyon elde edilmiştir. Sıraların son kuyucuklarına QSI çözeltisi eklenmemiş ve doz uygulanmamış olarak bırakılmıştır. McFarland 1 standardına ayarlanmış PAO1 ve biyosensör suşlardan 100 µl negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara eklenmiştir. Son hacme göre (200 µl) negatif kontrol hariç tüm kuyucuklar, McFarland 0,5 konsantrasyonunda bakteri ve 116 µM, 58 µM, 29 µM, 14,5 µM ve 7,25 µM evernik asit çözeltisi konsantrasyonlarına sahip olmuştur.

### **2.2.3.2. Floresan ışımaya ölçümleri**

Belirli mikropilaka kuyucuklarına negatif kontrol olarak sadece besiyeri eklendikten sonra kapağı kapatılarak Multimod mikropilaka okuyucuya (Cytation 3 Biotek-ABD) yerleştirilmiştir. 15 saat boyunca 37 °C’de 180 rpm’de çalkalayarak 15 dakikada bir floresans ve OD 600 nm ölçümleri alınmıştır. GFP floresans ölçümlerinde eksitasyon dalga boyu 485 nm ve emisyon dalga boyu 535 nm olarak ayarlanmıştır. Biyosensör suşlar için elde edilen sonuçlar grafiklere aktarılmıştır. Kontrol olarak *P. aeruginosa* üzerinde QSI özelliği ile literatürde yer alan penisillik asit çözeltisi kullanılmış ve elde edilen sonuçlar test edilen evernik asit örnekleriyle karşılaştırılmıştır.

### **2.2.4. kRT-PZR yöntemi ile gen ekspresyon analizi**

#### **2.2.4.1. Hedef genlere uygun primer ve problemlerin tasarımı**

Karşılaştırma için hedef gen bölgeleri olarak floresan biyosensör suşlarda GFP füzyonu yapılan *lasB* ve *rhlA* genleri, referans gen olarak da *rpoD* geni seçilmiştir. Bu gen bölgelerinin sekansları *Pseudomonas* Genome Database’den ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) elde edilmiş, uygun primer ve problemler *Roche Universal Probe Library*’den (UPL) (<http://www.roche-applied-science.com/>) belirlenmiştir (Şekil 2.1 ve 2.2 ve Tablo 2.2).

```

>PA3724 |lasB
ATGAAGAAGGTTTCTACGCTTGACCTGTGTTGTCGTTGCGATCATGGGTGTTTCGCCGGCCGCTTTTGCCGCGACCTGATCGACGTGTCCAACTCCCA
GCAAGGCTGCCAGGGCGCCGCCGGCCGCTCACCTTGCAGCCGCGGTTCGGCGCTGGCGGTGCCGACGAACTGAAAGCGATCCGCAGCAGCACCCTGCC
CAACGGCAAGCAGGTACCCCGCTACGAGCAATTCCACAAACGGCGTACGGGTGGTTCGGCGAAGCCATCACCGAAGTCAAGGGTCCCGGCAAGAGCGTGGCG
GCGCAGCGCAGCGCCATTTCTGTCGCAACATCGCTGCCGACCTGCCGGGCAGCACCACCGCGGCGGTATCCGCGAGCAGGTGCTGGCCAGGCCAAGA
GCCTGAAGGCCAGGGCCGCAAGACCAGAGAATGACAAAGTGGAACTGGTGTATCCGCTGGCGGAGAACACATCGCCCAACTGGTCTACAACGTCTCCTA
CCTGATTCGCGGCGAGGACTGTGTCGCGCCGATTTCTGTCATCGACGCCAAGACCGCGAAGTGTCTCGATCAGTGGGAAGGCTGGCCACGCCAGGGCG
GGCGCCCCGGCGGCAACAGAAAGATCGGCAAGTACACTACGGTAGCGACTACGGTCCGCTGATCGTCAACGACCGCTGCGAGATGGACGACGGCAACG
TCATCACCGTGCACATGAACAGCAGCACCAGCAGCAGCAAGACCAGCCGTTCCGCTTCGCTGCCGACCAACACTACAAGCAGGTCAACGGCGCCTA
TTCGCGCTGAACGACGCGCATTTCTTCGCGGCGTGGTGTTCAACTGTACCGGGACTGGTTCGGCACCAGCCGCTGACCCACAAGCTGTACATGAAG
GTGCACTACGGCGCAGCGTGGAGAAGCCTACTGGGACGGCAGCGATGCTCTTCGGCGACGGCGCCACCATGTTCTATCCGCTGGTGTGCTGGAGC
TGGCGGCCACAGAGTCAAGCCAGCGCTTACCAGCAGAACTCCGGGCTGATCTACCGCGGCAATCAGGCGGAATGAACGAAGCGTTCCTCCGACATGGC
CGCGAGGCTGCCAGTTCTATATGCGCGGCAAGAACGACTTCTGATCGGCTACGACATCAAGAAGGGCAGCGGTGCGCTGCGTACATGGACCAGCCC
AGCCGCGACGGCGATCCATCGACAACCGCTCGCAGTACTACAACGGCATCGAGTGCACCCTCCAGCGCGGTGTACAACCGTGGCTTCTACCTGTTGG
CCAATTCCGCGGCTGGGATACCCGCAAGCCCTTCGAGGTGTTGTCGACGCCAACCGCTACTACTGGACCGCCACCAGCAACTACAACAGCGCGCCCTG
CGGGGTGATTCGCTCGCGCAGAACCGCAACTACTCGCGGCTGACGTCACCCGGCGTTCAGCACCGTTCGGCGTACCTGCCGAGCGCGTTGTA

```

Şekil 2.1. *lasB* gen sekansı

```

>PA3479 |rhlA
ATCGCGCGGAAAGTCTGTTGGTATCGGTTTGCAAGGGCCCTGCCGGTACATGTCGAGCGGTGGGCGAGGATCCCGGGCGCAGCAGCGTGTGCTGGTCA
ACGGCGGATGGCGACCACCGCTCGTTCGCCGGACCTGCAAGTGCCTGGCCGAACATTTCAACGTGGTGTGTTGACCTGCCCTTCGCCGGCGATC
GCGTCAAGCACAACCCGACGCGCGGTTGATCACCAGGACGACGAGGTGGAAATCCTCCTGGCGCTGATCGAGCGCTTCGAGGTCAATCACCTGGTCTCC
GCGTCTGGGCGGTATCTCCAGCTGCTGGCGCTGTGTCGCGCAATCCGCGCGGATCCGAGCTCGGTGGTGTGATGGCATTTCGCCCTGGACTGAACAGG
CGATGCTCGACTACGTTCGGCGGGCGCAGGCGCTGATCGAGCTGGACGACAAAGTGGCGATCGGCCATCTGCTCAACGAGACCGTTCGGCAAAATACCTGCC
GCAGCGCCTGAAAGCCAGCAACCAACAGCACATGGCTTCGCTGGCCACCGCGGAATACGAGCAGGCGCGCTTTCACATCGAACAGGTGCTGGCGCTCAAC
GATCGGGCTACTTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGCCAGTGCATTTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAATACACCACCGCGGAGGACGCCGCCAGT
TCCGCGACTACCTGCCGCACTGCAAGTTTCTCGCGGTTGGAGGGCACCGGGCATTTCTCGACTGGAGTCCAAAGCTGGCAGCGGTACCGGTGCACCGCGC
CCTGCTCGAGCACCTGCTGAAGCAACCGGAGCCGACGCGGGCGGAACGCGCGGGGATTCCACGAGATGGCCATCGGCTACCGCTGA

```

Şekil 2.2. *rhlA* gen sekansı

Tablo 2.2. Kullanılan primerler.

Primer	Uzunluk	Pozisyon	Tm	%GC	Dizi
<i>lasB</i> F	19	418 - 436	55,1	53	cgcaagaccgagaatgaca
<i>lasB</i> R	19	469 - 487	55,4	53	agaccagttgggcatgtt
<i>rhlA</i> F	18	512 - 529	56,2	56	aagccagcaaccatcagc
<i>rhlA</i> R	19	571 - 589	55,9	53	gcacctggtcgtatgtgaaa
<i>rpoD</i> F	20	435 - 454	55,4	55	tccaccgacaacagctacg
<i>rpoD</i> R	18	478 - 495	57,4	66,7	gagctggaaccgtggact

#### 2.2.4.2. RNA izolasyonu

116 µM, 58 µM, 29 µM, 14,5 µM ve 7,25 µM evernik asit dozları uygulanmış yabanıl tip olan PAO1 suş örneklerinden her doza ait RNA izole edilme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin total RNA izolasyonları işlemleri için Roche *High Pure RNA Isolation Kiti* kullanılmıştır. İzole edilen RNA miktarı ve kalitesi OD ölçümleri ile



Cytation 3 multimode okuyucuda belirlenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -86 °C’da muhafaza edilmiştir.

### 2.2.4.3. cDNA sentezi

Elde edilen RNA’lardan cDNA sentezi Roche *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buz üzerinde çalışılmış her örnek için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

RNA	10 µl
Anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> primer	1 µl
Random hekzamer primer	1 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>13 µl</b>

Örnekler 65 °C’de 10 dakika boyunca bekletildikten sonra buz üstüne alınmıştır. Daha sonra her bir örnek için aşağıdaki karışım hazırlanmış ve örneklere toplam hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir.

5x RT Tamponu	4 µl
RNaz inhibitörü	0,5 µl
dNTP 10mM	2 µl
Revers transkriptaz	0,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

Örnekler kısaca santrifüj edilip termal döngü cihazına konulmuş ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

25 °C 10 dakika

55 °C 30 dakika

85 °C 5 dakika

Elde edilen cDNA’lar kRT-PZR uygulaması gerçekleşene kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### 2.2.4.4. kRT-PZR ile cDNA'ların çoğaltılması

cDNA'lar belirlenen primer ve probalar kullanılarak gerçek zamanlı PZR cihazında çoğaltılmış ve ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. kRT-PZR yöntemi Roche *FastStart Essential DNA Probes Master* kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma Roche LightCycler Nano cihazında gerçekleştirilmiş ve cDNA'ların çoğalma miktarı TaqMan probalar ile ölçülmüştür. Aşağıda belirtilen karışım hazırlanmış ve ilgili protokol uygulanmıştır.

##### PZR Karışımı:

Prob	0,2 µl
Primer F	0,2 µl
Primer R	0,2 µl
Master Miks	10 µl
H <sub>2</sub> O	4,4 µl
cDNA	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

##### PCR Döngüsü:

	45 döngü		
Denatürasyon:	95°C	10 dk	
Amplifikasyon döngüsü:	95°C	20 sn	Denatürasyon
	55°C	40 sn	Yapışma
	72°C	1 sn	Uzama

#### 2.2.4.5. kRT-PZR bulgularının analizi

kRT-PZR sonucunda elde edilen “Eşik Değeri” (Crossing Threshold, Ct) değerleri ile hedef genin çoğalmaya başladığı döngüler belirlenebilmiştir. Düşük Ct değerine sahip bir örneğin, gen ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu ifade ettiği bilinmektedir. Evrenik asit uygulaması sonucu elde edilen hedef genlere ait Ct değerleri, referans gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak normalize edilmiş ve kontrol grubuna oranları Pfaffl yöntemine göre hesaplanmıştır (Denklem 2.1) [58].

$$Oran = \frac{2^{\Delta Ct_{örnek}(Ct_{kontrol}-Ct_{örnek})}}{2^{\Delta Ct_{Referans}(Ct_{kontrol}-Ct_{örnek})}} \quad \text{Denklem (2.1)}$$

## BÖLÜM 3

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA / RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Bulgular

##### 3.1.1. QS inhibisyonu floresan ışına yöntemi bulguları

###### 3.1.1.1. *lasB-gfp* biyosensör suşu bulguları

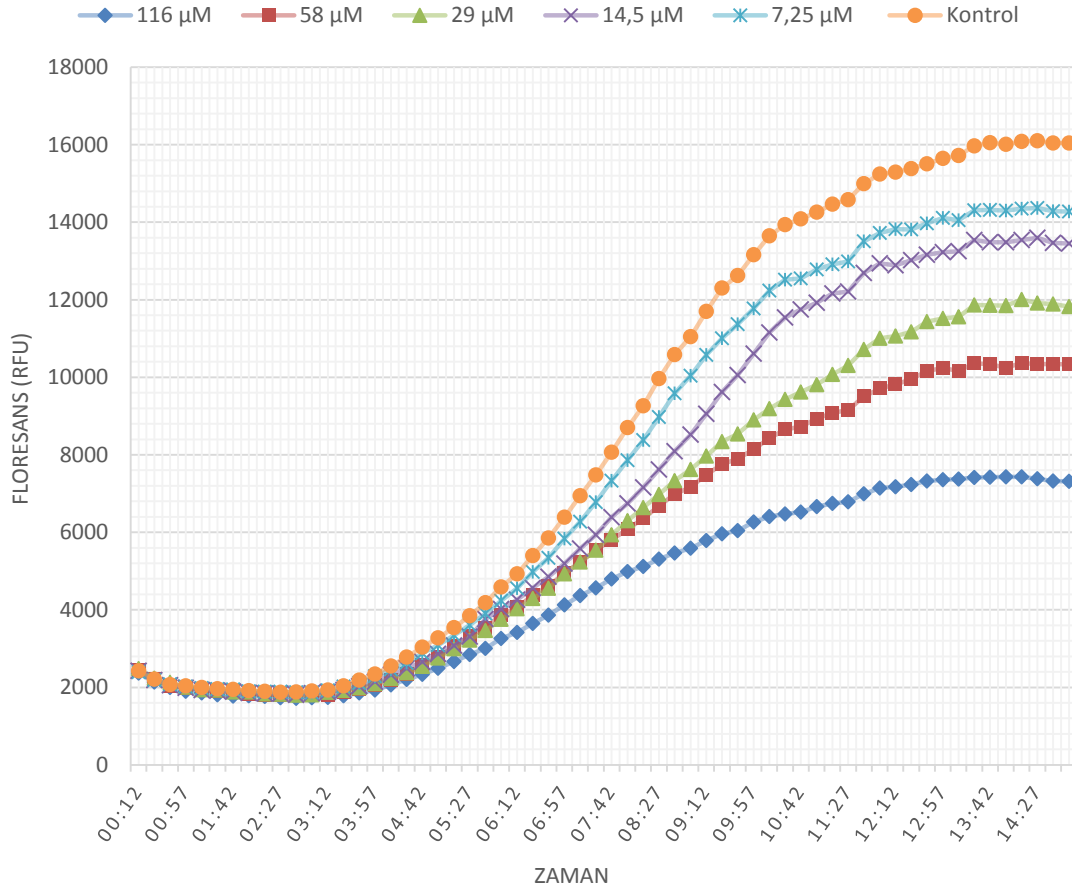
116  $\mu\text{M}$ , 58  $\mu\text{M}$ , 29  $\mu\text{M}$ , 14,5  $\mu\text{M}$  ve 7,25  $\mu\text{M}$  evernik asit dozları uygulanmış bakterilerden 15 saat boyunca 15 dakikada bir alınan floresan ışına ve OD (600nm) ölçümleri sonunda elde edilen verilerle (Tablo 3.1 ve 3.2) zamana karşı floresans ve absorbans grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.1 ve 3.3). Deney 3 defa tekrarlanmış ve değerlerin ortalamaları alınmıştır.

**Tablo 3.1.** *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans miktarları. Kontrol grubuna evernik asit uygulaması yapılmamıştır. Floresans verileri RFU (*Relative Fluorescence Units*) cinsindedir.

Zaman	116 $\mu\text{M}$	58 $\mu\text{M}$	29 $\mu\text{M}$	14,5 $\mu\text{M}$	7,25 $\mu\text{M}$	Kontrol
00:12	2370 $\pm$ 14	2430 $\pm$ 36	2486 $\pm$ 31	2424 $\pm$ 15	2395 $\pm$ 44	2429 $\pm$ 32
00:27	2136 $\pm$ 10	2201 $\pm$ 100	2235 $\pm$ 17	2184 $\pm$ 6	2185 $\pm$ 52	2210 $\pm$ 18
00:42	1992 $\pm$ 5	2043 $\pm$ 154	2129 $\pm$ 20	2057 $\pm$ 10	2078 $\pm$ 50	2071 $\pm$ 25
00:57	1896 $\pm$ 9	1988 $\pm$ 149	2008 $\pm$ 21	1991 $\pm$ 17	2021 $\pm$ 29	2037 $\pm$ 33
01:12	1853 $\pm$ 11	1943 $\pm$ 137	1939 $\pm$ 34	1933 $\pm$ 6	1978 $\pm$ 34	1995 $\pm$ 26
01:27	1809 $\pm$ 8	1897 $\pm$ 133	1928 $\pm$ 53	1911 $\pm$ 10	1951 $\pm$ 33	1963 $\pm$ 21
01:42	1773 $\pm$ 1	1878 $\pm$ 90	1884 $\pm$ 59	1885 $\pm$ 17	1946 $\pm$ 26	1948 $\pm$ 33
01:57	1784 $\pm$ 14	1833 $\pm$ 94	1883 $\pm$ 46	1858 $\pm$ 20	1893 $\pm$ 40	1911 $\pm$ 10
02:12	1761 $\pm$ 19	1804 $\pm$ 97	1830 $\pm$ 42	1836 $\pm$ 12	1889 $\pm$ 40	1893 $\pm$ 4
02:27	1734 $\pm$ 12	1804 $\pm$ 87	1821 $\pm$ 46	1836 $\pm$ 23	1885 $\pm$ 32	1876 $\pm$ 8
02:42	1713 $\pm$ 20	1797 $\pm$ 129	1800 $\pm$ 58	1810 $\pm$ 17	1869 $\pm$ 26	1877 $\pm$ 9
02:57	1733 $\pm$ 12	1810 $\pm$ 177	1803 $\pm$ 76	1844 $\pm$ 13	1866 $\pm$ 54	1902 $\pm$ 32
03:12	1741 $\pm$ 15	1803 $\pm$ 294	1873 $\pm$ 109	1882 $\pm$ 27	1923 $\pm$ 75	1926 $\pm$ 84
03:27	1783 $\pm$ 19	1876 $\pm$ 379	1924 $\pm$ 165	1933 $\pm$ 34	2018 $\pm$ 89	2034 $\pm$ 147
03:42	1856 $\pm$ 22	1964 $\pm$ 472	1984 $\pm$ 226	2030 $\pm$ 26	2109 $\pm$ 123	2188 $\pm$ 206
03:57	1929 $\pm$ 43	2069 $\pm$ 591	2091 $\pm$ 277	2147 $\pm$ 26	2281 $\pm$ 134	2343 $\pm$ 273
04:12	2064 $\pm$ 39	2188 $\pm$ 705	2227 $\pm$ 338	2325 $\pm$ 46	2456 $\pm$ 174	2552 $\pm$ 351
04:27	2206 $\pm$ 50	2338 $\pm$ 849	2378 $\pm$ 390	2491 $\pm$ 42	2631 $\pm$ 212	2781 $\pm$ 411
04:42	2332 $\pm$ 67	2575 $\pm$ 931	2542 $\pm$ 462	2657 $\pm$ 51	2877 $\pm$ 236	3038 $\pm$ 457

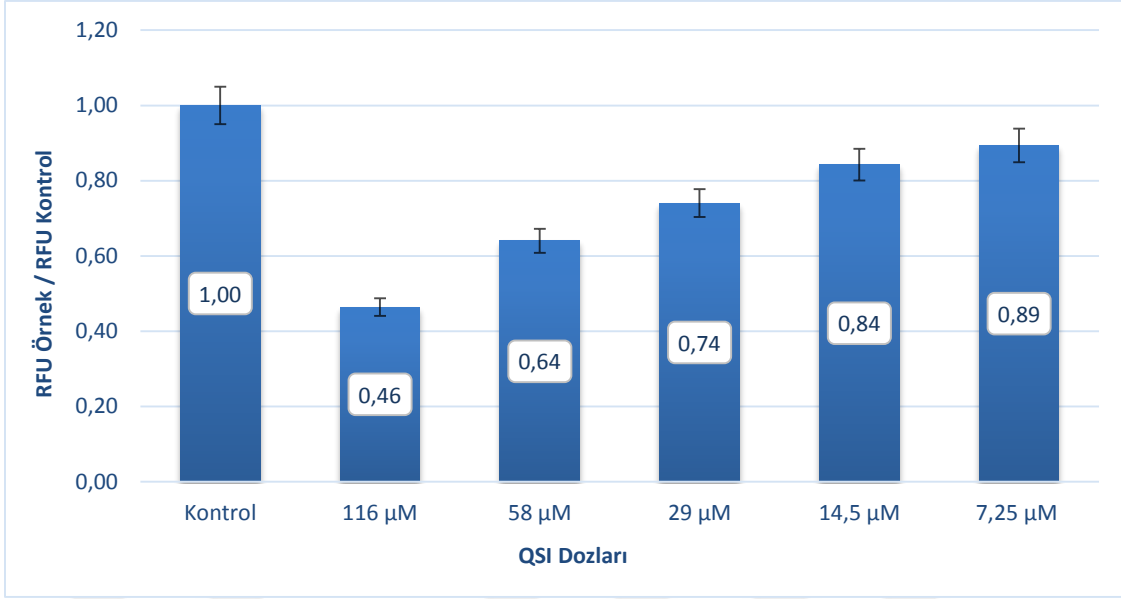
**Tablo 3.1.** Devam.

04:57	2493±90	2769±1088	2755±527	2863±46	3087±275	3276±515
05:12	2664±91	3051±1133	2999±598	3081±72	3340±315	3537±551
05:27	2847±83	3324±1238	3219±662	3306±91	3608±363	3848±626
05:42	3003±106	3539±1340	3465±733	3763±190	3905±370	4181±660
05:57	3256±83	3873±1433	3756±798	4022±185	4238±422	4593±759
06:12	3415±104	4064±1506	4024±846	4259±188	4555±438	4924±766
06:27	3650±84	4371±1526	4290±896	4562±194	4976±451	5400±794
06:42	3865±82	4617±1561	4552±922	4855±199	5343±458	5855±801
06:57	4125±68	4948±1539	4924±964	5191±206	5834±455	6393±799
07:12	4362±44	5232±1533	5234±1010	5581±226	6274±461	6941±783
07:27	4561±48	5537±1527	5540±1006	5934±215	6775±433	7483±694
07:42	4792±59	5803±1560	5934±1028	6391±189	7328±432	8067±657
07:57	4982±45	6085±1546	6296±1036	6743±189	7856±399	8705±585
08:12	5115±73	6358±1536	6641±976	7155±160	8376±401	9265±504
08:27	5305±78	6675±1563	6979±979	7621±184	8977±381	9966±386
08:42	5465±94	6985±1528	7332±976	8090±157	9585±365	10585±302
08:57	5588±107	7163±1446	7622±969	8522±164	10037±372	11050±204
09:12	5787±129	7491±1393	7964±975	9060±181	10577±355	11699±138
09:27	5956±167	7753±1340	8339±913	9621±188	11007±366	12306±48
09:42	6046±164	7904±1319	8539±950	10056±233	11372±328	12626±51
09:57	6264±152	8144±1254	8901±941	10612±312	11772±283	13158±28
10:12	6403±151	8427±1148	9186±951	11152±363	12236±229	13650±78
10:27	6471±198	8648±1022	9430±957	11539±377	12517±235	13938±115
10:42	6523±241	8723±934	9619±988	11750±373	12548±254	14084±185
10:57	6662±254	8936±822	9809±1011	11922±379	12782±209	14257±240
11:12	6744±283	9084±787	10070±995	12162±403	12913±187	14468±293
11:27	6785±295	9156±764	10303±884	12212±402	12991±181	14579±332
11:42	6992±350	9505±666	10716±967	12690±412	13510±125	14995±346
11:57	7140±380	9708±620	11009±936	12942±402	13724±117	15239±356
12:12	7175±408	9817±551	11065±852	12888±350	13821±94	15292±415
12:27	7235±424	9949±471	11167±824	13021±319	13813±154	15380±462
12:42	7321±442	10163±407	11433±795	13159±259	13974±127	15505±503
12:57	7356±434	10234±316	11514±853	13231±210	14109±116	15650±509
13:12	7370±478	10163±307	11561±826	13256±229	14056±153	15722±451
13:27	7416±522	10364±258	11862±788	13540±231	14311±213	15965±467
13:42	7421±544	10335±246	11854±862	13479±163	14321±221	16053±469
13:57	7428±566	10246±274	11850±887	13487±150	14302±217	16009±499
14:12	7430±584	10366±232	12005±892	13544±124	14348±279	16081±488
14:27	7382±595	10337±243	11913±996	13599±158	14368±325	16104±469
14:42	7320±593	10343±218	11889±1017	13469±141	14285±306	16044±474
14:57	7317±595	10331±241	11827±1028	13453±144	14272±355	16045±491



**Şekil 3.1.** *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun 7,25-116 µM arasındaki konsantrasyonlarda evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği. Kontrol grubuna evernik asit uygulaması yapılmamıştır.

Örneklerin inkübasyonunun 14'üncü saatindeki floresan ölçümler göz önüne alınarak karşılaştırıldığında evernik asit dozları uygulanan bakterilerin doz uygulanmamış olan kontrol grubuna göre GFP miktarında azalmalar belirlenmiştir. GFP miktarındaki azalma, *lasB* gen ekspresyonunun engellendiğini göstermektedir. Evernik asit uygulaması sonucu elde edilen RFU miktarları, uygulama yapılmamış kontrol grubuna oranlanmış ve 116 µM için 0,46; 58 µM için 0,64; 29 µM için 0,74; 14,5 µM için 0,84 ve 7,25 µM için 0,89 oranlarında floresans gözlenmiştir (Şekil 3.2).



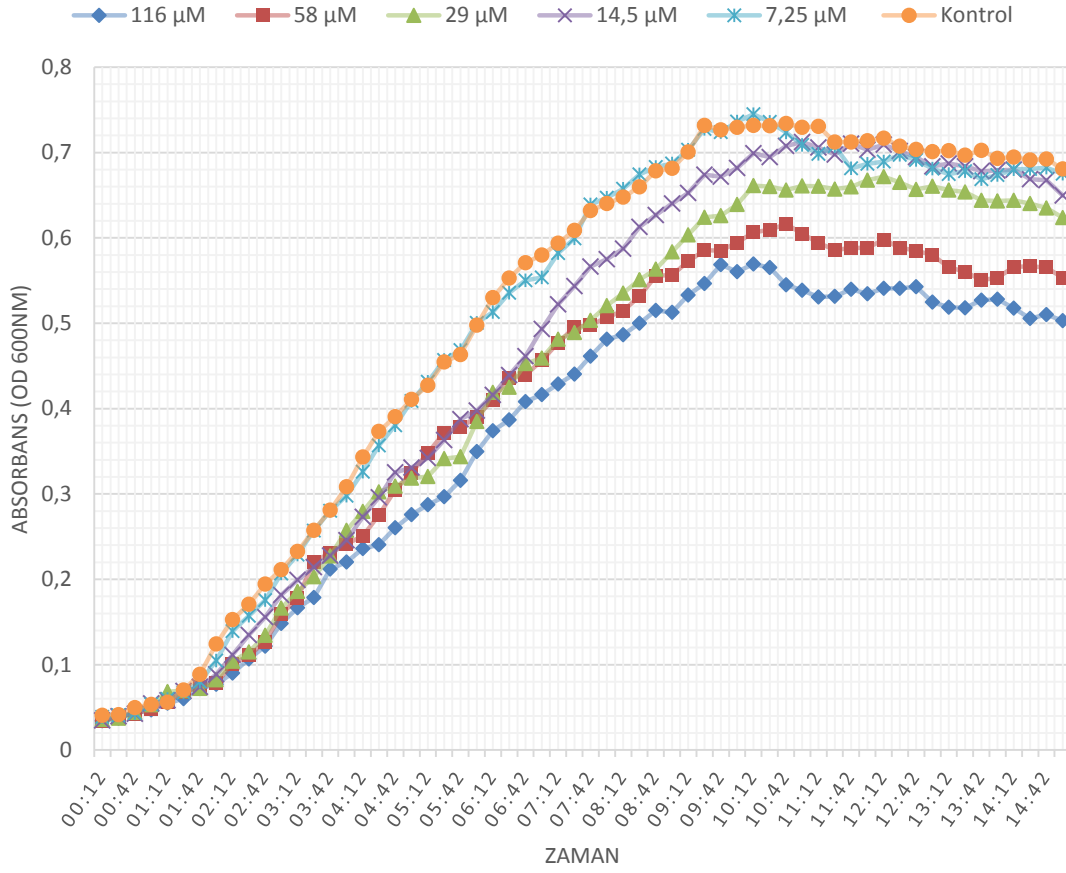
**Şekil 3.2.** *P. aeruginosa lasB-gfp* 14'üncü saat evernik asit konsantrasyonuna bağlı inhibisyon grafiği.

**Tablo 3.2.** *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) sonuçları. Kontrol grubuna evernik asit uygulaması yapılmamıştır.

Zaman	116 µM	58 µM	29 µM	14,5 µM	7,25 µM	Kontrol
00:12	0,0344±0,00	0,034±0,00	0,0357±0,00	0,0345±0,00	0,0388±0,00	0,0405±0,01
00:27	0,0373±0,00	0,0401±0,01	0,0374±0,00	0,0394±0,00	0,0406±0,00	0,0414±0,01
00:42	0,0434±0,00	0,0426±0,01	0,0441±0,01	0,0427±0,00	0,0433±0,00	0,0495±0,01
00:57	0,0471±0,00	0,0478±0,01	0,0529±0,00	0,0545±0,00	0,0538±0,00	0,0535±0,01
01:12	0,0549±0,00	0,0566±0,02	0,0686±0,01	0,0584±0,00	0,0598±0,00	0,0562±0,01
01:27	0,0602±0,00	0,0685±0,02	0,0697±0,01	0,0691±0,00	0,0673±0,00	0,0702±0,01
01:42	0,0725±0,01	0,0734±0,02	0,0721±0,01	0,0741±0,01	0,0802±0,00	0,0887±0,01
01:57	0,0772±0,01	0,079±0,02	0,0822±0,02	0,0887±0,01	0,1046±0,01	0,1241±0,01
02:12	0,0901±0,01	0,1008±0,03	0,104±0,03	0,1116±0,01	0,1394±0,01	0,1528±0,01
02:27	0,1066±0,00	0,1107±0,04	0,115±0,03	0,1348±0,01	0,1574±0,01	0,1708±0,01
02:42	0,1218±0,00	0,127±0,05	0,1345±0,04	0,1557±0,01	0,1756±0,01	0,1943±0,02
02:57	0,1484±0,01	0,1586±0,06	0,1664±0,04	0,1815±0,01	0,2069±0,01	0,2111±0,02
03:12	0,1667±0,01	0,1782±0,06	0,1856±0,04	0,1994±0,01	0,229±0,01	0,2325±0,02
03:27	0,1788±0,00	0,2204±0,06	0,2031±0,04	0,2144±0,01	0,2569±0,01	0,2574±0,01
03:42	0,212±0,01	0,2312±0,06	0,2274±0,04	0,2277±0,02	0,2802±0,01	0,2811±0,01
03:57	0,2201±0,00	0,2416±0,07	0,2574±0,04	0,2459±0,02	0,298±0,01	0,3084±0,02
04:12	0,236±0,01	0,2507±0,08	0,2797±0,05	0,2733±0,02	0,3261±0,01	0,3432±0,01
04:27	0,2406±0,01	0,2753±0,08	0,3024±0,05	0,296±0,02	0,3567±0,01	0,3734±0,01
04:42	0,2605±0,00	0,3046±0,08	0,3091±0,06	0,3254±0,02	0,3804±0,00	0,3904±0,01

**Tablo 3.2.** Devam.

04:57	0,2759±0,02	0,325±0,07	0,3185±0,06	0,331±0,02	0,409±0,00	0,4108±0,00
05:12	0,2873±0,02	0,3482±0,07	0,3205±0,06	0,3422±0,02	0,4315±0,01	0,4274±0,01
05:27	0,2966±0,02	0,3716±0,08	0,3413±0,06	0,3632±0,02	0,4569±0,01	0,4545±0,01
05:42	0,3158±0,02	0,3781±0,07	0,3437±0,06	0,3875±0,05	0,4684±0,01	0,4632±0,01
05:57	0,3495±0,01	0,3907±0,07	0,3848±0,06	0,3975±0,04	0,5003±0,02	0,4978±0,02
06:12	0,3742±0,01	0,4104±0,06	0,4189±0,05	0,416±0,03	0,513±0,01	0,5301±0,03
06:27	0,3869±0,01	0,4363±0,06	0,4252±0,06	0,4392±0,03	0,5355±0,01	0,5528±0,04
06:42	0,4081±0,01	0,4394±0,05	0,4529±0,05	0,4614±0,02	0,5502±0,01	0,5708±0,04
06:57	0,4165±0,01	0,4566±0,05	0,4591±0,05	0,4933±0,02	0,5537±0,01	0,58±0,04
07:12	0,4286±0,01	0,4773±0,04	0,4811±0,05	0,522±0,02	0,5821±0,01	0,5936±0,04
07:27	0,4403±0,01	0,4954±0,04	0,4893±0,05	0,5437±0,02	0,5993±0,02	0,6086±0,05
07:42	0,4614±0,01	0,4979±0,04	0,5033±0,05	0,5663±0,02	0,6392±0,02	0,6321±0,06
07:57	0,4813±0,02	0,5067±0,04	0,5206±0,04	0,5751±0,01	0,6469±0,02	0,6401±0,06
08:12	0,4865±0,02	0,5145±0,03	0,5352±0,04	0,5874±0,01	0,6576±0,03	0,6478±0,06
08:27	0,5001±0,02	0,5316±0,03	0,5511±0,04	0,6128±0,01	0,6744±0,02	0,6599±0,06
08:42	0,5151±0,02	0,5555±0,02	0,5634±0,04	0,6267±0,02	0,6832±0,02	0,6785±0,06
08:57	0,5128±0,04	0,5566±0,03	0,5835±0,04	0,6401±0,02	0,687±0,02	0,6817±0,06
09:12	0,5331±0,04	0,5725±0,02	0,6036±0,04	0,6528±0,02	0,7032±0,03	0,7008±0,07
09:27	0,5464±0,05	0,5856±0,02	0,6241±0,05	0,6741±0,02	0,7277±0,02	0,7317±0,08
09:42	0,5687±0,06	0,5853±0,02	0,6259±0,04	0,6719±0,01	0,7238±0,02	0,7265±0,07
09:57	0,5604±0,07	0,5944±0,02	0,6391±0,04	0,6819±0,02	0,7361±0,03	0,7295±0,07
10:12	0,5695±0,06	0,6067±0,02	0,6613±0,04	0,699±0,02	0,745±0,03	0,7317±0,07
10:27	0,5651±0,05	0,6096±0,02	0,6601±0,04	0,6948±0,01	0,7359±0,03	0,7313±0,07
10:42	0,5449±0,04	0,6163±0,02	0,656±0,04	0,7077±0,02	0,7234±0,02	0,7342±0,08
10:57	0,5387±0,03	0,6051±0,02	0,6609±0,04	0,7123±0,02	0,709±0,02	0,7294±0,08
11:12	0,5309±0,03	0,5942±0,01	0,6605±0,04	0,706±0,02	0,6984±0,02	0,7305±0,07
11:27	0,5317±0,04	0,586±0,01	0,6571±0,03	0,6976±0,02	0,7074±0,02	0,7122±0,06
11:42	0,5397±0,04	0,5883±0,01	0,6599±0,03	0,7104±0,02	0,6815±0,01	0,7122±0,06
11:57	0,5345±0,04	0,5887±0,01	0,6677±0,03	0,7032±0,02	0,6867±0,02	0,7139±0,06
12:12	0,541±0,04	0,598±0,02	0,6717±0,03	0,7094±0,02	0,6893±0,02	0,7166±0,06
12:27	0,541±0,04	0,5885±0,02	0,6652±0,03	0,7016±0,02	0,6972±0,02	0,7074±0,06
12:42	0,5429±0,04	0,5853±0,01	0,6569±0,02	0,6948±0,02	0,6913±0,03	0,7037±0,06
12:57	0,5248±0,03	0,5799±0,01	0,6607±0,03	0,6838±0,02	0,681±0,01	0,7009±0,05
13:12	0,5186±0,03	0,5656±0,01	0,656±0,03	0,687±0,02	0,6746±0,02	0,7022±0,05
13:27	0,5182±0,02	0,5603±0,01	0,6538±0,03	0,6837±0,02	0,678±0,02	0,697±0,05
13:42	0,5271±0,03	0,5508±0,01	0,6442±0,02	0,6783±0,02	0,6686±0,02	0,7026±0,05
13:57	0,5281±0,03	0,5534±0,01	0,6432±0,02	0,6788±0,02	0,6736±0,02	0,6933±0,04
14:12	0,5178±0,03	0,5662±0,02	0,6439±0,03	0,6801±0,03	0,6805±0,03	0,6947±0,05
14:27	0,5056±0,02	0,5669±0,02	0,6401±0,03	0,6687±0,03	0,6808±0,03	0,6911±0,04
14:42	0,5103±0,02	0,5654±0,02	0,6352±0,03	0,6678±0,03	0,6822±0,03	0,6923±0,04
14:57	0,5031±0,02	0,5532±0,02	0,6238±0,03	0,6495±0,02	0,6753±0,02	0,6809±0,04



**Şekil 3.3.** *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) grafiği.

### 3.1.1.2. *rhlA-gfp* biyosensör suşu bulguları

116 µM, 58 µM, 29 µM, 14,5 µM ve 7,25 µM evernik asit dozları uygulanmış bakterilerden 15 saat boyunca 15 dakikada bir alınan floresan ışımaya ve OD (600nm) ölçümleri sonunda elde edilen verilerle (Tablo 3.3 ve 3.4) zamana karşı floresans ve absorbans grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.4 ve 3.6). Deney 3 defa tekrarlanmış ve değerlerin ortalamaları alınmıştır.

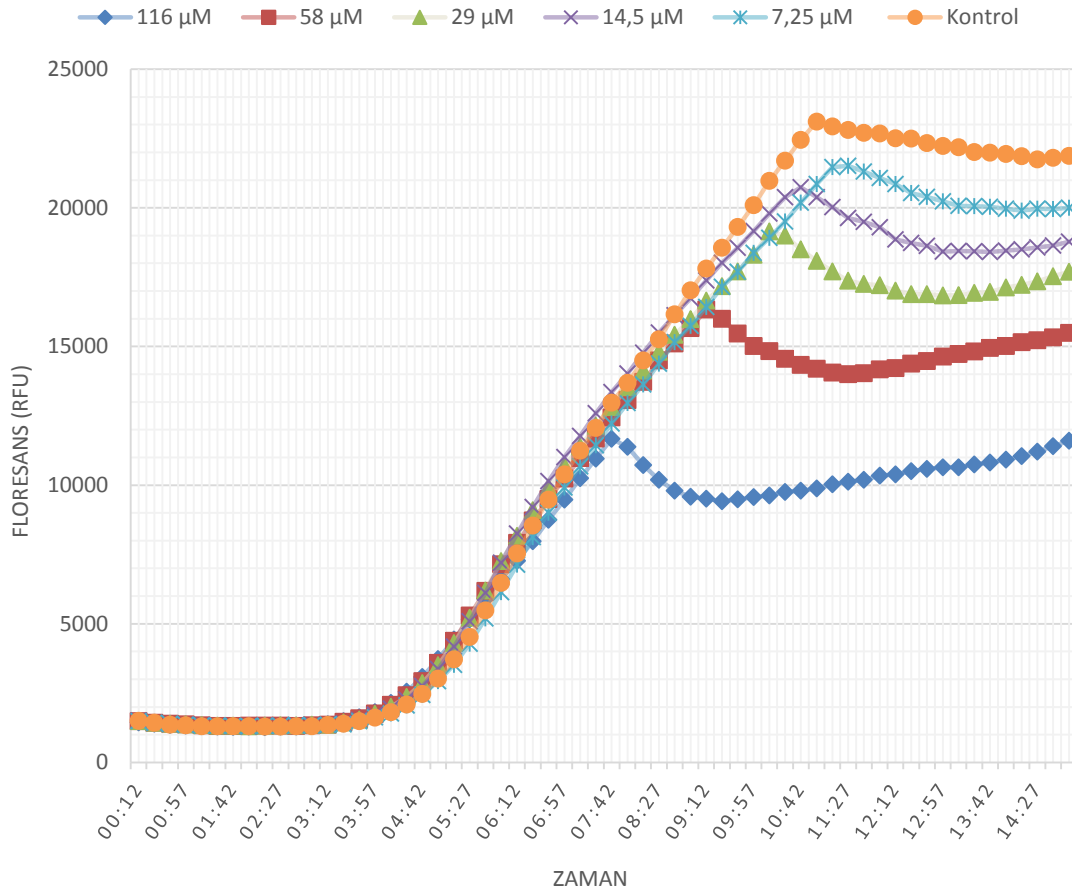


**Tablo 3.3.** *P. aeruginosa rhIA-gfp* suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans miktarları. Kontrol grubuna evernik asit uygulaması yapılmamıştır. Floresans verileri RFU (*Relative Fluorescence Units*) cinsindedir.

Zaman	116 µM	58 µM	29 µM	14,5 µM	7,25 µM	Kontrol
00:12	1443±18	1485±10	1490±4	1506±9	1494±10	1504±5
00:27	1400±9	1432±4	1436±9	1421±7	1429±11	1428±5
00:42	1349±5	1396±7	1398±0	1388±10	1391±10	1365±12
00:57	1330±3	1368±7	1373±14	1361±7	1356±5	1336±19
01:12	1309±5	1342±9	1351±12	1348±11	1324±14	1306±22
01:27	1292±7	1317±14	1330±11	1325±4	1328±2	1303±14
01:42	1280±13	1313±11	1330±9	1319±9	1314±4	1305±13
01:57	1290±8	1321±5	1302±8	1295±18	1300±15	1301±8
02:12	1266±20	1321±9	1322±5	1321±5	1324±9	1289±16
02:27	1288±9	1329±9	1342±10	1330±4	1317±9	1287±22
02:42	1295±15	1313±18	1335±7	1333±4	1345±7	1307±10
02:57	1317±19	1342±9	1358±14	1350±6	1330±4	1300±19
03:12	1378±5	1366±12	1366±8	1347±16	1356±6	1353±12
03:27	1485±15	1466±8	1438±7	1404±13	1375±25	1394±4
03:42	1630±19	1591±17	1549±10	1533±24	1488±17	1488±6
03:57	1813±41	1767±22	1756±21	1719±38	1628±53	1610±5
04:12	2144±45	2075±19	2012±32	1937±49	1771±106	1806±19
04:27	2554±80	2425±46	2366±50	2263±80	2056±150	2088±39
04:42	3085±121	2930±60	2860±78	2763±129	2434±244	2470±53
04:57	3727±146	3587±89	3505±126	3375±184	2935±351	3025±95
05:12	4431±176	4386±117	4300±186	4175±279	3525±494	3718±134
05:27	5159±219	5298±159	5214±236	5093±367	4279±626	4525±179
05:42	5900±230	6186±174	6202±300	6116±462	5198±721	5486±222
05:57	6608±285	7141±220	7262±359	7203±533	6139±817	6473±251
06:12	7272±359	7918±299	8166±399	8256±590	7135±848	7532±299
06:27	7972±393	8724±302	9090±407	9206±616	8127±876	8543±302
06:42	8746±456	9496±403	9920±436	10147±649	9002±910	9479±315
06:57	9480±508	10239±476	10705±452	11006±703	9910±923	10391±302
07:12	10250±531	10972±561	11396±481	11776±721	10675±993	11239±323
07:27	10953±309	11685±664	12144±521	12589±749	11434±1048	12057±319
07:42	11671±307	12437±772	12814±531	13354±807	12224±1065	12977±367
07:57	11375±609	13061±817	13528±577	14021±822	12961±1109	13694±349
08:12	10718±558	13722±895	14123±640	14775±859	13635±1150	14494±351
08:27	10187±396	14500±1010	14811±689	15503±952	14379±1154	15260±361
08:42	9800±290	15112±1044	15424±703	16130±987	15151±1132	16155±360
08:57	9582±224	15664±990	15980±671	16740±1020	15744±1149	17023±445
09:12	9510±184	16327±651	16651±716	17382±1046	16420±1157	17807±452

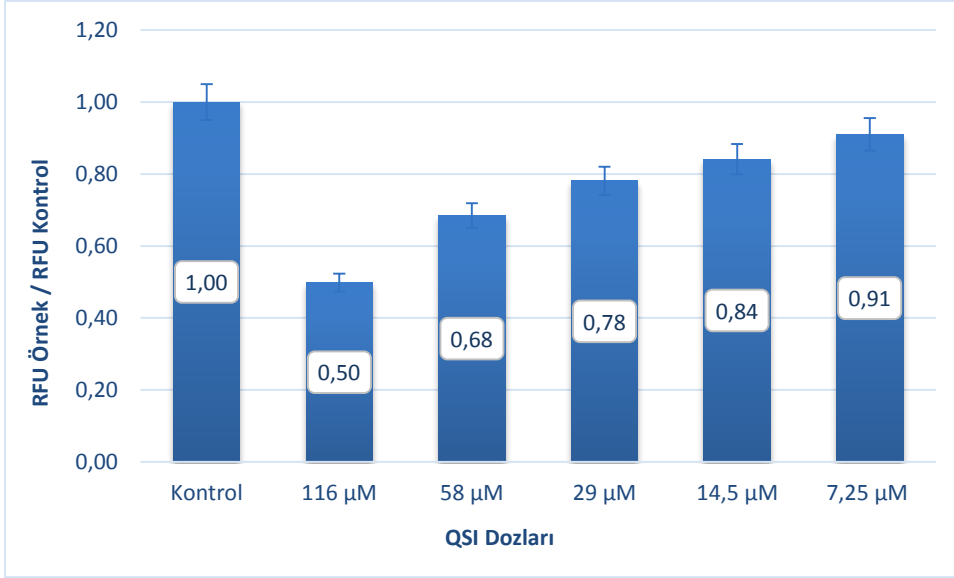
**Tablo 3.3.** Devam.

09:27	9413±246	15998±201	17178±711	18021±1033	17146±1110	18558±373
09:42	9487±260	15466±230	17700±692	18557±1066	17695±1091	19313±262
09:57	9563±311	15018±250	18311±709	19159±1037	18376±1089	20090±252
10:12	9625±380	14833±243	19149±837	19799±1067	18914±1115	20967±236
10:27	9755±390	14554±170	19000±658	20383±967	19511±897	21695±222
10:42	9795±419	14333±142	18507±573	20740±844	20189±523	22448±248
10:57	9881±378	14201±112	18092±601	20381±475	20854±563	23104±244
11:12	10034±326	14054±94	17701±571	20031±429	21468±626	22929±412
11:27	10119±286	14002±69	17368±487	19637±525	21519±742	22808±431
11:42	10194±306	14032±92	17260±493	19494±589	21302±726	22708±419
11:57	10338±341	14169±70	17204±493	19294±583	21077±644	22684±366
12:12	10390±330	14216±72	17012±459	18859±501	20862±619	22511±343
12:27	10499±295	14386±50	16884±411	18732±407	20535±521	22490±333
12:42	10583±250	14477±77	16888±394	18624±315	20400±430	22335±376
12:57	10636±195	14632±89	16835±372	18424±272	20230±333	22229±366
13:12	10643±152	14727±112	16850±340	18447±245	20075±301	22183±319
13:27	10745±133	14817±128	16937±362	18428±218	20064±267	22008±314
13:42	10812±156	14946±129	16963±344	18411±173	20036±202	21989±309
13:57	10924±220	15019±141	17132±373	18455±170	19971±183	21938±298
14:12	11043±288	15156±160	17218±355	18503±128	19896±191	21857±265
14:27	11204±364	15228±189	17350±376	18573±111	19972±157	21740±319
14:42	11400±449	15326±186	17529±383	18644±108	19958±189	21807±336
14:57	11594±561	15494±175	17690±384	18782±149	19999±229	21868±369



**Şekil 3.4.** *P. aeruginosa rhIA-gfp* suşunun 7,25-116 µM arasındaki konsantrasyonlarda evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği. Kontrol grubuna evernik asit uygulaması yapılmamıştır.

Örneklerin inkübasyonunun 14'üncü saatindeki ölçümler göz önüne alındığında evernik asit dozları uygulanan bakterilerin doz uygulanmamış olan kontrol grubuna göre GFP miktarında azalmalar belirlenmiştir. GFP miktarındaki azalma, *rhIA* gen ekspresyonunun engellendiğini göstermektedir. Elde edilen floresans miktarları evernik asit uygulanmamış kontrol grubuyla oranlanmış ve bulgulara göre *rhIA* gen ekspresyonunda, kontrol grubuna göre 116 µM için 0,50; 58 µM için 0,68; 29 µM için 0,78; 14,5 µM için 0,84 ve 7,25 µM için 0,91 oranlarında floresans gözlenmiştir (Şekil 3.5).



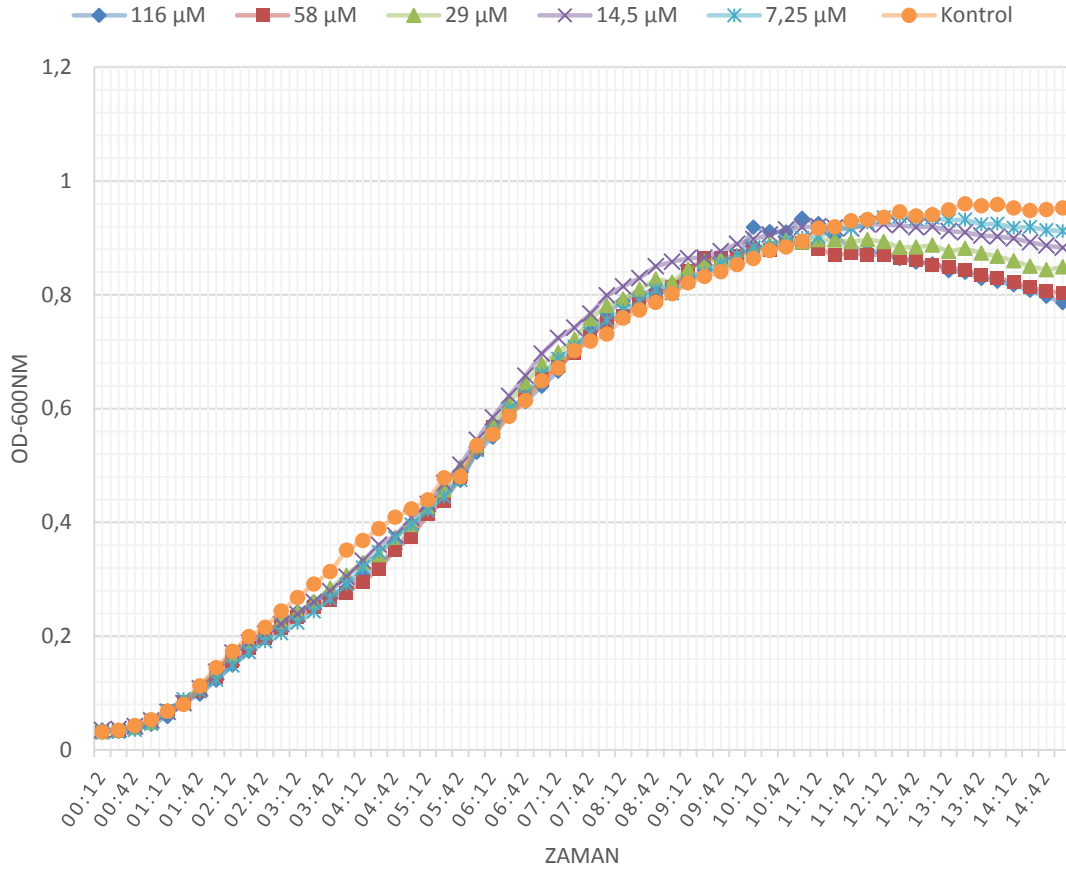
**Şekil 3.5.** *P. aeruginosa rhlA-gfp* 14'üncü saat evernik asit konsantrasyonuna bağılı inhibisyon grafiğı.

**Tablo 3.4.** *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) sonuçları. Kontrol grubuna evernik asit uygulaması yapılmamıştır.

Zaman	116 µM	58 µM	29 µM	14,5 µM	7,25 µM	Kontrol
00:12	0,0353±0,00	0,0325±0,00	0,0325±0,00	0,0349±0,00	0,0305±0,00	0,0316±0,00
00:27	0,0331±0,00	0,0341±0,00	0,0353±0,00	0,0366±0,00	0,032±0,00	0,0348±0,00
00:42	0,0371±0,00	0,0393±0,00	0,0397±0,00	0,0418±0,00	0,0353±0,00	0,0429±0,00
00:57	0,045±0,00	0,0483±0,00	0,0489±0,00	0,0518±0,00	0,046±0,00	0,0531±0,00
01:12	0,0588±0,00	0,0683±0,00	0,0689±0,00	0,0674±0,00	0,0686±0,00	0,0682±0,00
01:27	0,0832±0,01	0,0841±0,00	0,0851±0,00	0,0823±0,00	0,0895±0,00	0,0803±0,01
01:42	0,0979±0,00	0,1032±0,00	0,1126±0,00	0,1083±0,00	0,1034±0,01	0,1128±0,00
01:57	0,1226±0,00	0,1291±0,00	0,1393±0,00	0,1375±0,00	0,1233±0,01	0,1447±0,00
02:12	0,1491±0,00	0,1565±0,01	0,1685±0,00	0,1715±0,01	0,148±0,01	0,1736±0,00
02:27	0,174±0,00	0,1787±0,01	0,1904±0,00	0,1884±0,00	0,1717±0,01	0,1995±0,00
02:42	0,1997±0,01	0,1964±0,00	0,2069±0,00	0,2042±0,00	0,1908±0,01	0,2155±0,00
02:57	0,2274±0,01	0,2142±0,01	0,2255±0,00	0,2214±0,01	0,2049±0,02	0,2443±0,01
03:12	0,2427±0,01	0,233±0,01	0,2417±0,00	0,2386±0,00	0,2236±0,02	0,2682±0,01
03:27	0,2603±0,01	0,2508±0,01	0,2601±0,00	0,2602±0,01	0,243±0,02	0,2915±0,01
03:42	0,2742±0,01	0,2639±0,01	0,2845±0,01	0,2793±0,01	0,2656±0,02	0,3133±0,01
03:57	0,2843±0,01	0,2765±0,01	0,3074±0,01	0,3045±0,01	0,2911±0,02	0,3512±0,02
04:12	0,3071±0,01	0,2954±0,01	0,3292±0,01	0,3328±0,01	0,3208±0,02	0,3683±0,02
04:27	0,3265±0,01	0,3184±0,01	0,3434±0,01	0,3609±0,02	0,3481±0,02	0,3891±0,01
04:42	0,3533±0,02	0,352±0,01	0,3735±0,02	0,3773±0,02	0,3726±0,02	0,4092±0,01

**Tablo 3.4.** Devam.

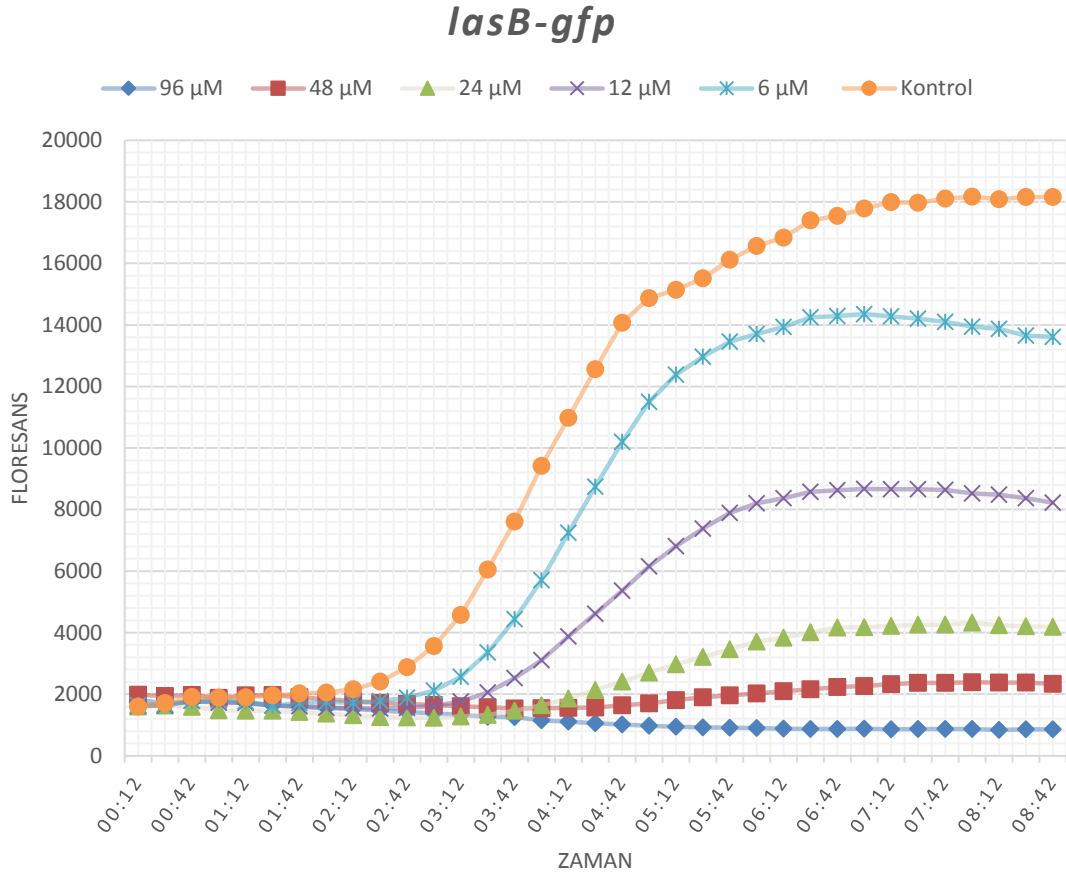
04:57	0,3882±0,02	0,3749±0,01	0,3964±0,02	0,4081±0,02	0,3965±0,02	0,4238±0,01
05:12	0,4225±0,02	0,4147±0,01	0,4283±0,02	0,432±0,01	0,4208±0,03	0,4398±0,01
05:27	0,4564±0,02	0,4378±0,01	0,457±0,02	0,4694±0,01	0,4454±0,03	0,4785±0,01
05:42	0,474±0,01	0,4805±0,02	0,4972±0,03	0,5014±0,02	0,4742±0,04	0,4799±0,01
05:57	0,5236±0,02	0,5296±0,02	0,5353±0,03	0,5454±0,02	0,5265±0,04	0,5351±0,02
06:12	0,5499±0,03	0,5678±0,02	0,5725±0,02	0,5845±0,02	0,5595±0,05	0,5549±0,02
06:27	0,5914±0,03	0,5913±0,01	0,6098±0,03	0,6221±0,02	0,5987±0,04	0,5866±0,01
06:42	0,6125±0,03	0,6208±0,02	0,6449±0,03	0,6576±0,02	0,6228±0,04	0,6137±0,03
06:57	0,6394±0,03	0,6515±0,02	0,6778±0,02	0,6968±0,03	0,6607±0,04	0,6488±0,04
07:12	0,6658±0,03	0,674±0,02	0,6991±0,02	0,7241±0,03	0,6876±0,04	0,6712±0,04
07:27	0,7099±0,04	0,6981±0,02	0,7221±0,03	0,742±0,02	0,709±0,04	0,7016±0,04
07:42	0,7358±0,04	0,728±0,02	0,7578±0,02	0,7667±0,02	0,7321±0,04	0,7184±0,03
07:57	0,7693±0,04	0,752±0,03	0,7812±0,02	0,7987±0,03	0,7557±0,03	0,7309±0,02
08:12	0,7882±0,03	0,7635±0,03	0,7924±0,02	0,8148±0,02	0,7728±0,03	0,7589±0,02
08:27	0,8019±0,03	0,7832±0,03	0,8094±0,02	0,8291±0,02	0,7889±0,02	0,7732±0,02
08:42	0,8078±0,03	0,7983±0,03	0,8276±0,02	0,8501±0,02	0,8083±0,02	0,7866±0,01
08:57	0,8184±0,03	0,8144±0,02	0,8223±0,02	0,8581±0,02	0,8026±0,03	0,8016±0,01
09:12	0,8285±0,03	0,8423±0,03	0,845±0,02	0,8641±0,02	0,8244±0,02	0,8211±0,01
09:27	0,8433±0,03	0,864±0,03	0,8584±0,03	0,8655±0,01	0,8377±0,02	0,8324±0,01
09:42	0,8425±0,04	0,8643±0,02	0,8623±0,02	0,8768±0,02	0,8545±0,02	0,8407±0,02
09:57	0,8642±0,05	0,8689±0,02	0,865±0,02	0,8895±0,02	0,8697±0,02	0,853±0,01
10:12	0,9189±0,07	0,8808±0,01	0,8761±0,02	0,8979±0,03	0,8836±0,02	0,8637±0,01
10:27	0,911±0,06	0,8792±0,01	0,8887±0,02	0,9058±0,03	0,8856±0,02	0,8776±0,01
10:42	0,9102±0,07	0,8884±0,02	0,896±0,02	0,915±0,03	0,8931±0,02	0,8841±0,01
10:57	0,9347±0,08	0,8913±0,03	0,8926±0,02	0,919±0,03	0,9004±0,02	0,8942±0,02
11:12	0,9251±0,08	0,8809±0,02	0,8968±0,02	0,9205±0,03	0,9017±0,02	0,917±0,02
11:27	0,9038±0,08	0,8696±0,02	0,8961±0,02	0,9182±0,02	0,9141±0,02	0,9194±0,01
11:42	0,8814±0,07	0,8729±0,02	0,8933±0,02	0,9168±0,02	0,9167±0,02	0,9299±0,01
11:57	0,8772±0,07	0,8702±0,02	0,8966±0,02	0,9238±0,02	0,9273±0,02	0,9321±0,02
12:12	0,8744±0,07	0,8704±0,02	0,8933±0,02	0,9239±0,02	0,936±0,02	0,9364±0,01
12:27	0,8634±0,07	0,8655±0,02	0,8835±0,02	0,9224±0,02	0,9377±0,02	0,9458±0,02
12:42	0,8573±0,07	0,8604±0,02	0,8839±0,02	0,9187±0,02	0,9335±0,02	0,9382±0,01
12:57	0,8541±0,07	0,8527±0,02	0,8872±0,02	0,92±0,02	0,9354±0,02	0,9409±0,01
13:12	0,8424±0,07	0,8492±0,02	0,8762±0,02	0,9123±0,02	0,9308±0,02	0,9493±0,02
13:27	0,8394±0,08	0,8439±0,02	0,8819±0,02	0,9099±0,02	0,9321±0,02	0,9596±0,02
13:42	0,829±0,07	0,8337±0,02	0,8733±0,02	0,9044±0,02	0,9241±0,02	0,9567±0,02
13:57	0,8235±0,08	0,8294±0,02	0,8678±0,02	0,9027±0,02	0,9252±0,02	0,9585±0,02
14:12	0,8177±0,07	0,8234±0,02	0,8598±0,02	0,899±0,02	0,9178±0,02	0,9524±0,02
14:27	0,808±0,07	0,8142±0,02	0,8504±0,02	0,8926±0,02	0,9195±0,03	0,9482±0,02
14:42	0,7972±0,07	0,8062±0,02	0,8438±0,02	0,887±0,02	0,9139±0,02	0,9495±0,02
14:57	0,7861±0,07	0,8028±0,02	0,8492±0,03	0,883±0,02	0,9119±0,02	0,9524±0,02



**Şekil 3.6.** *P. aeruginosa rhIA-gfp* suşunun evernik asit ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans (OD-600nm) grafiği.

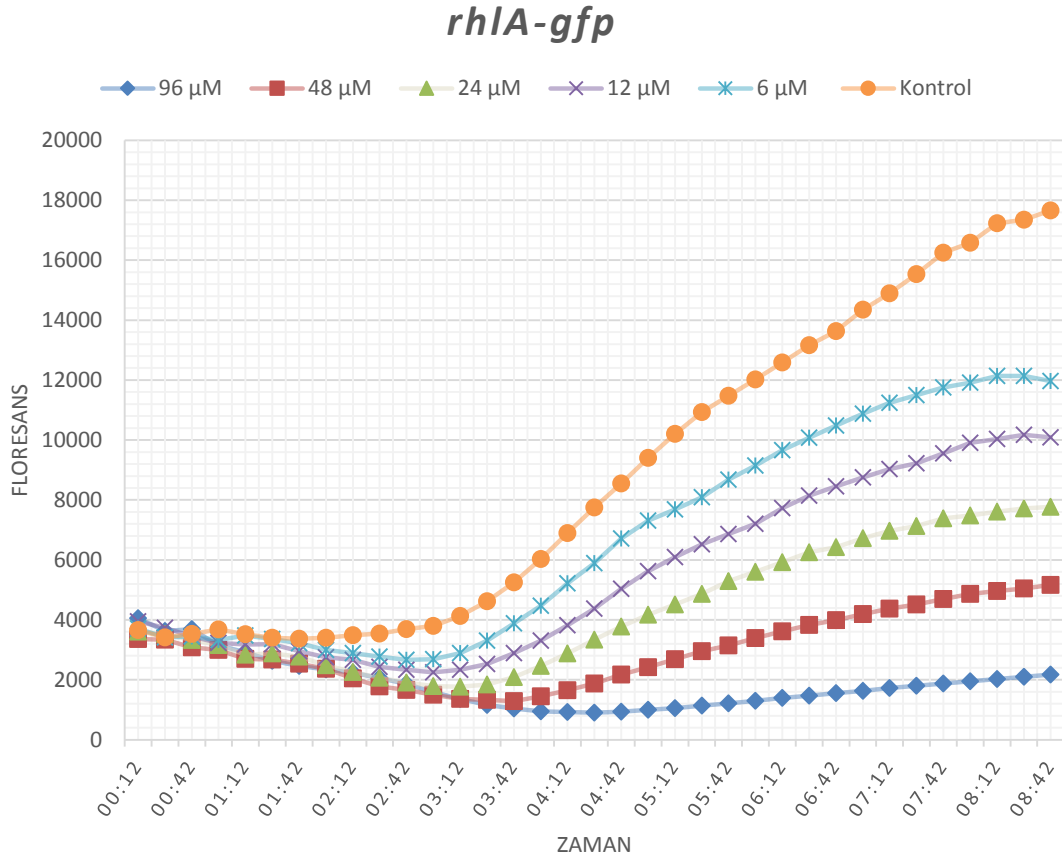
### 3.1.1.3. Penisillik asit uygulaması

*P. aeruginosa lasB-gfp* ve *rhIA-gfp* suşlarına sırasıyla 96 µM, 48 µM, 24 µM, 12 µM ve 6 µM konsantrasyonlarında Penisillik asit uygulanmış ve 15 dakikada bir floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 3.7 ve 3.8).



**Şekil 3.7.** *P. aeruginosa lasB-gfp* suşunun penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği.

Penisillik asit uygulaması sonucunda 96 µM dozun *lasB-gfp* suşunda QS mekanizmasını neredeyse tamamıyla inhibe ettiği gözlenmiştir.



**Şekil 3.8.** *P. aeruginosa rhIA-gfp* suşunun penisillik asit ile muamelesi sonucu elde edilen floresans grafiği.

Penisillik asit uygulaması sonucunda 96 µM dozun *rhIA-gfp* suşunda QS mekanizmasını neredeyse tamamıyla inhibe ettiği gözlenmiştir.

### 3.1.2. QS inhibisyonu kRT-PZR yöntemi bulguları

*P. aeruginosa* PAO1 yabanıl tip suşa, floresan biyosensör suşlarla aynı dozlarda evernik asit konsantrasyonları (116 µM, 58 µM, 29 µM, 14,5 µM ve 7,25 µM) uygulanmıştır. Bakterinin 15 saat boyunca 15 dakikada bir absorbans (OD-600nm) ölçümü alınmıştır. 15 saat uygulama sonunda bakterilerden izole edilen RNA'ların 260 ve 280 nm'de absorbansları Multimod okuyucu (Biotek-Almanya) yardımıyla ölçülerek saflık dereceleri ve konsantrasyonları hesaplanmıştır (Tablo 3.5).

LightCycler® Nano (Roche-Almanya) gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılarak yapılan çalışmada *lasB*, *rhIA* gen ekspresyonları *rpoD* geni referans alınarak incelenmiş, Ct değerleri analiz edilerek gen ekspresyon oranları denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır.

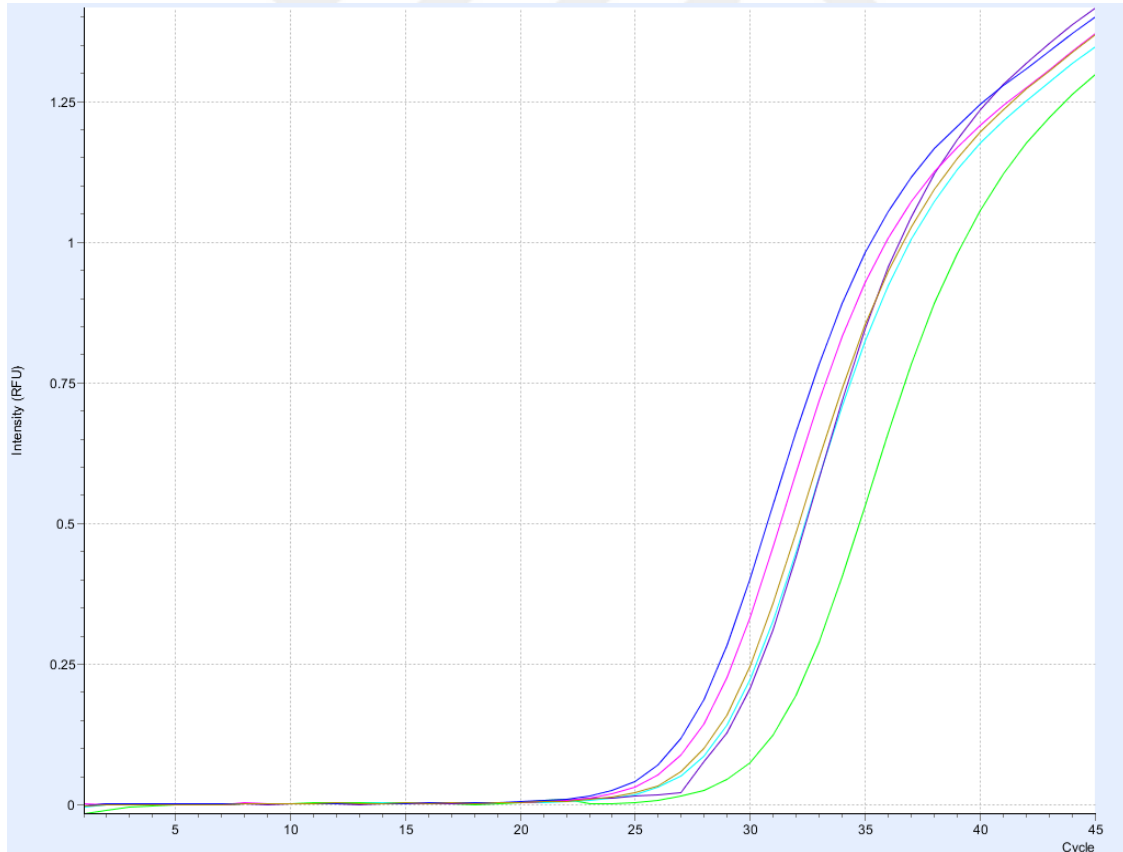


**Tablo 3.5.** İzole edilen RNA moleküllerinin saflık ve konsantrasyon ölçümleri.

Örnek	OD-260 nm	OD-280 nm	Saflık (260/280)	ng/ $\mu$ L
116 $\mu$ M	0,042	0,021	2,004	33,403
58 $\mu$ M	0,055	0,027	2,026	43,728
29 $\mu$ M	0,046	0,023	2,031	36,606
14,5 $\mu$ M	0,057	0,028	1,992	45,353
7,25 $\mu$ M	0,044	0,023	1,934	34,894
Kontrol	0,096	0,047	2,042	77,079

### 3.1.2.1. *lasB* gen ekspresyonu bulguları

Gerçek zamanlı PZR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon grafikleri Şekil 3.7 ve Ct değerleri Tablo 3.6’da verilmiştir.

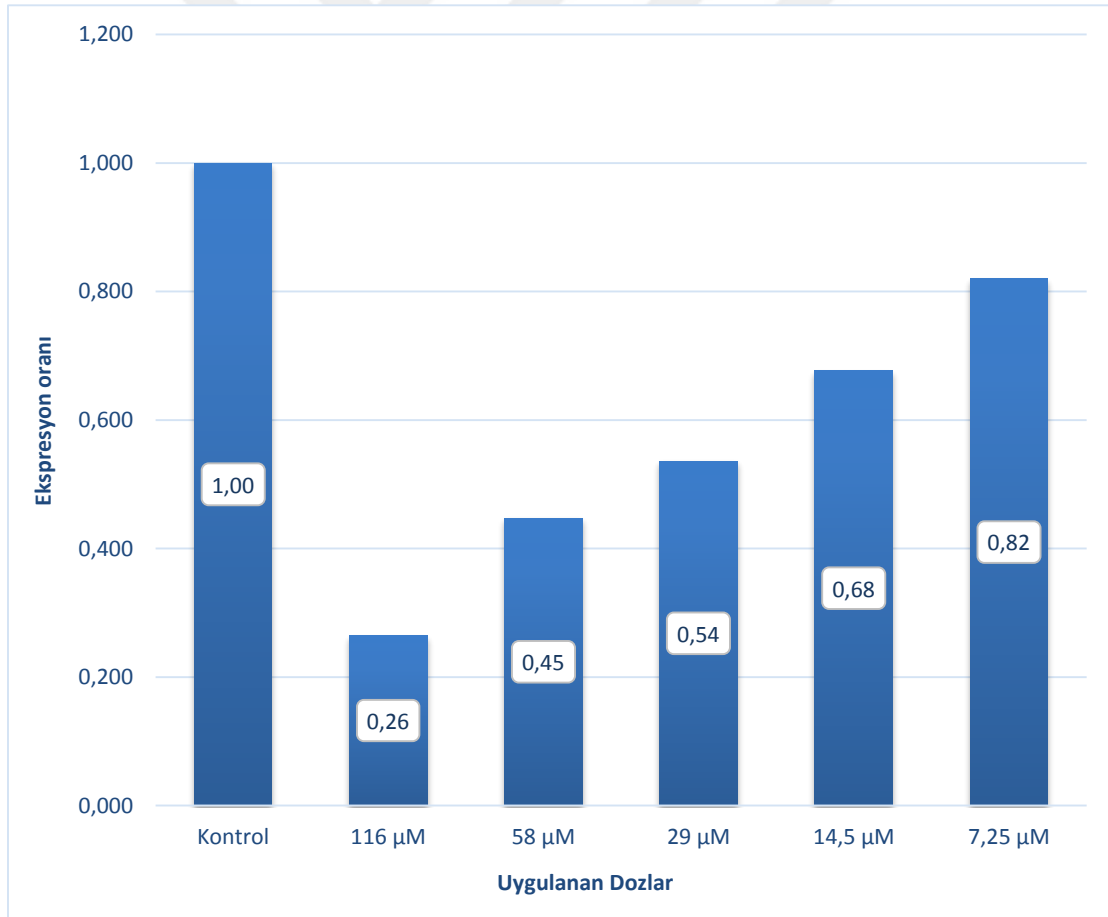


**Şekil 3.9.** Evernik asit dozları uygulanmış PAO1 suşuna ait *lasB* gen amplifikasyon grafiği.

**Tablo 3.6.** Gerçek zamanlı PZR sonunda gözlenen *lasB* geni Ct değerleri.

	<b>Ct Örnek (<i>lasB</i>)</b>	<b>Ct Referans (<i>rpoD</i>)</b>
Kontrol	22,794	25,054
116 µM	24,657	24,997
58 µM	24,252	25,352
29 µM	24,162	25,522
14,5 µM	23,22	24,916
7,25 µM	22,085	24,059

Elde edilen sonuçlar Pfaffl yöntemine göre analiz edilerek doz uygulanmamış gruba göre gen ekspresyon oranları kantite edilmiştir (Şekil 3.8).

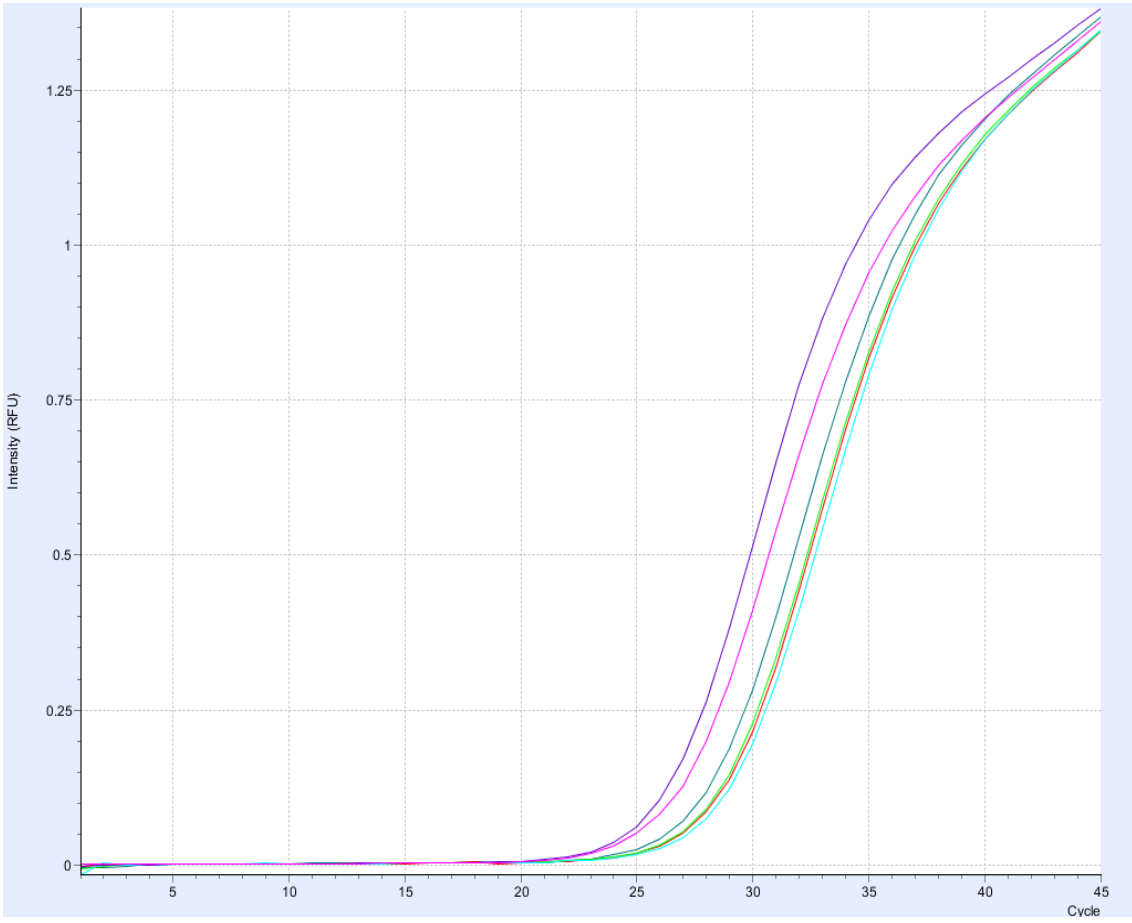


**Şekil 3.10.** QSI evernik asit uygulaması sonucu *lasB* geni ekspresyon oranları.

Sonuçlar analiz edildiğinde evernik asit uygulanan PAO1 suşlarının elastaz geni ekspresyonları doz uygulanmamış kontrol grubuna göre, 116 µM için %74; 58 µM için %55; 29 µM için %46; 14,5 µM için %32 ve 7,25 µM için %18 oranlarında inhibe olmuştur.

### 3.1.2.2. *rhlA* gen ekspresyonu bulguları

Gerçek zamanlı PZR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon grafikleri Şekil 3.9 ve Ct değerleri Tablo 3.7’de verilmiştir.

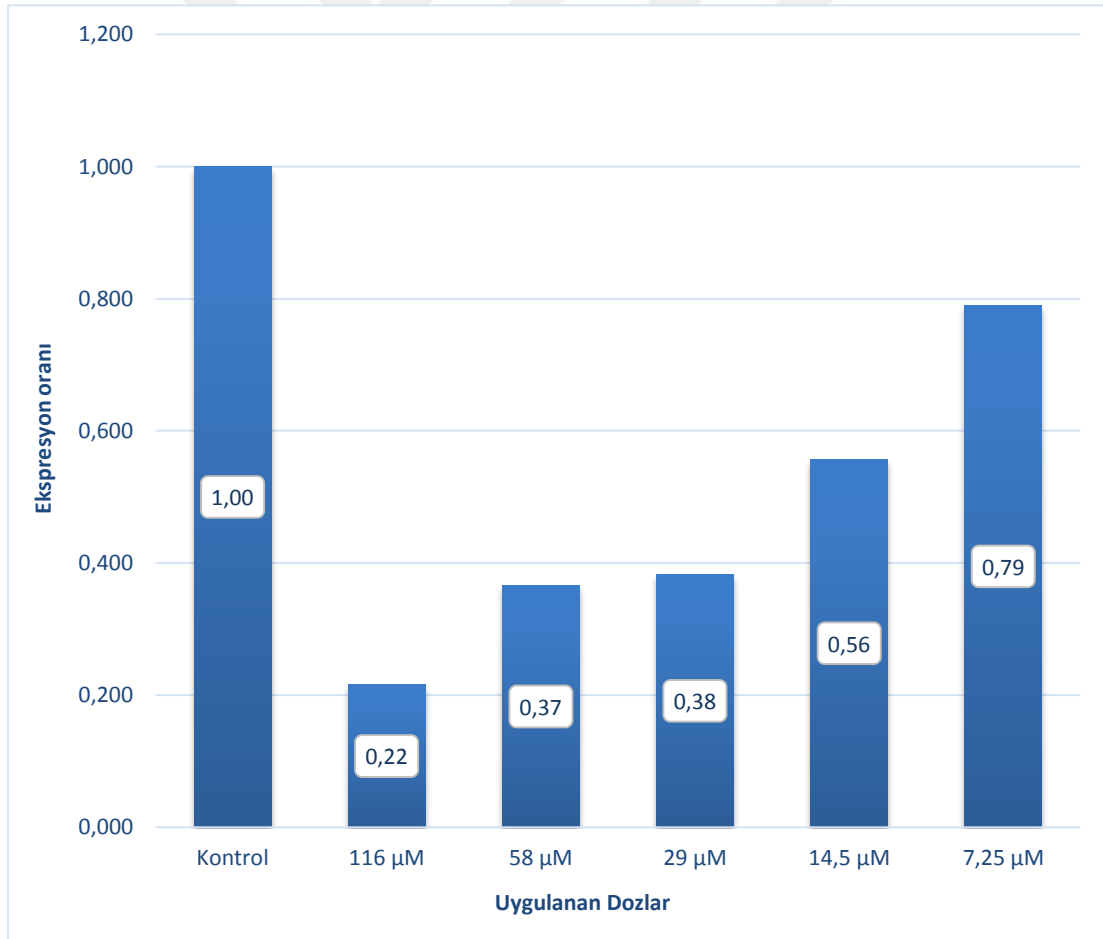


Şekil 3.11. Evernik asit dozları uygulanmış PAO1 suşuna ait *rhlA* gen amplifikasyon grafiği.

**Tablo 3.7.** Gerçek zamanlı PZR sonunda gözlenen *rhlA* geni Ct değerleri.

	<b>Ct Örnek (<i>rhlA</i>)</b>	<b>Ct Referans (<i>rpoD</i>)</b>
Kontrol	26,178	25,054
116 µM	28,337	24,997
58 µM	27,928	25,352
29 µM	28,034	25,522
14,5 µM	26,884	24,916
7,25 µM	25,524	24,059

Elde edilen sonuçlar Pfaffl yöntemine göre analiz edilerek evernik asit dozu uygulanmamış gruba göre gen ekspresyon oranları kantite edilmiştir (Şekil 3.10).



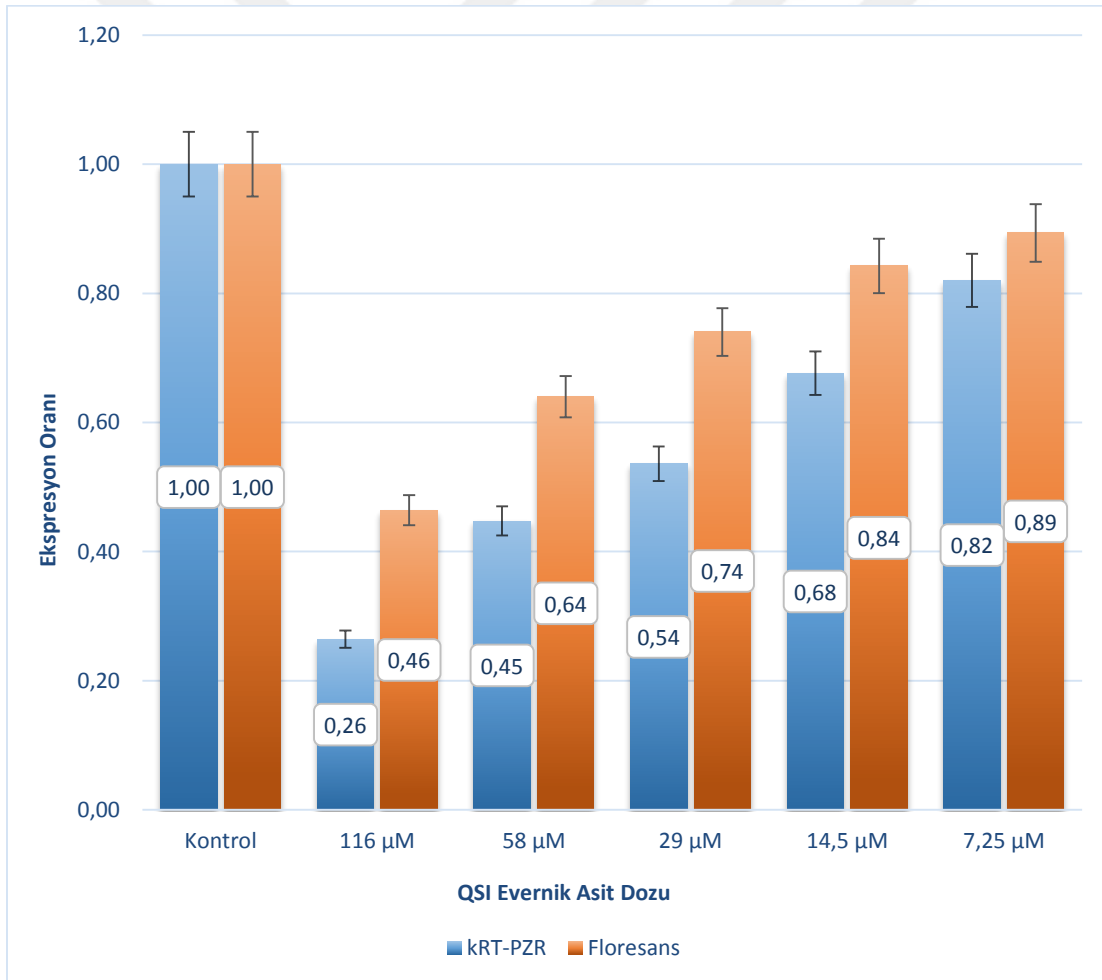
**Şekil 3.12.** QSI evernik asit uygulaması sonucu *rhlA* geni ekspresyon oranları.

Sonuçlar analiz edildiğinde evernik asit uygulanan PAO1 suşlarında ramnosiltransferaz 1 alt birim A geni ekspresyonlarının, doz uygulanmamış kontrol grubuna göre, 116 µM için %78; 58 µM için %63; 29 µM için %62; 14,5 µM için %44 ve 7,25 µM için %21 oranlarında inhibe olduğu görülmüştür.

### 3.1.3. Floresan ışımaya ve kRT-PZR yöntemleri ile elde edilen bulguların karşılaştırılması

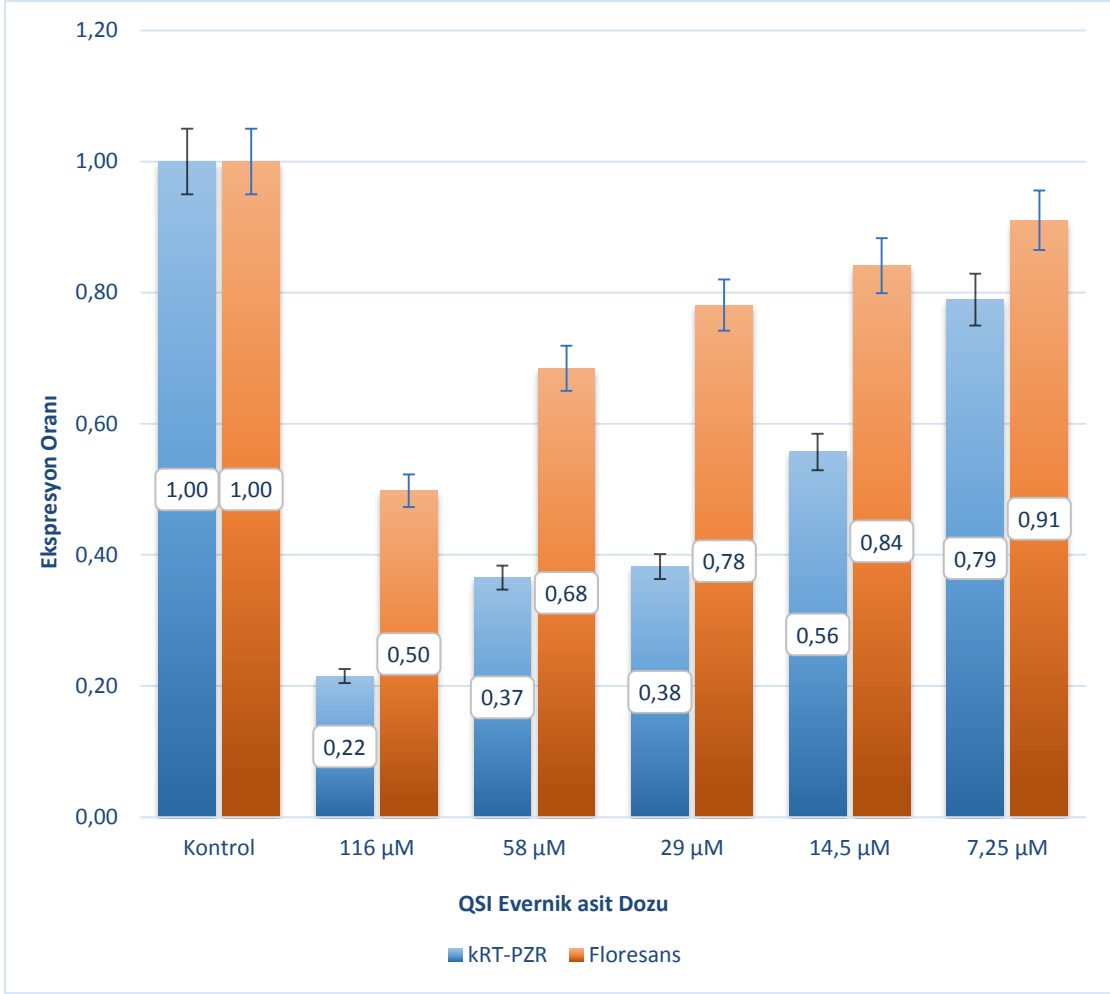
İki yöntem uygulaması sonucunda elde edilen veriler oransal olarak benzerlik göstermektedir (Şekil 3.11 ve 3.12).

#### 3.1.3.1. *lasB* ölçümlerinin karşılaştırılması



Şekil 3.13. *lasB-gfp* suşu QS inhibisyonu oranları ile PAO1 *lasB* gen ekspresyonu oranlarının karşılaştırılması.

### 3.1.3.2. *rhIA* ölçümlerinin karşılaştırılması



Şekil 3.14. *rhIA-gfp* suşu QS inhibisyonu oranları ile PAO1 *rhIA* gen ekspresyonu oranlarının karşılaştırılması.

## 3.2. Tartışma

Günümüzde bakterilerin geliştirdikleri antibiyotik dirençleri önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bakteriler onlara zarar verecek ortam şartlarına maruz kaldıklarında strese girmektedirler ve mücadele için biyofilm üretmektedirler. Böylece biyofilm tabakası içerisinde antikor ve antibiyotikler gibi onlara zarar verebilecek pek çok maddeye karşı oldukça savunmalı hale gelmektedirler [59]. Biyofilmin içine girebilen antibiyotik miktarının az olması, bakterilere rahat üreme ve antibiyotik direnci geliştirebilme imkânı sunmaktadır [60]. QS mekanizmaları hakkında gün geçtikçe daha çok bilgi edinilmekte ve antibiyotik tedavisinin yerini alabilecek, farklı bir yaklaşım ile

enfeksiyonlara karşı savaşa destek olabilecek QSI moleküllerin keşfi için olanaklar sağlanmaktadır. Bakterileri strese sokmadan iletişimlerinin engellenerek virulanslarının azaltılması, antibiyotik direnci sorununu ortadan kaldıracak bir yaklaşım olarak görülmektedir [61]. Bu bağlamda doğal QSI moleküllerin keşfi önem arz etmektedir.

İlaç araştırmalarında bitkiler, mantarlar ya da onlardan elde edilen doğal ürünler önemli bir kaynak oluşturmaktadır [62, 63, 64]. Bu bakımdan çalışmada özgün fitokimyasal içeren ve etnobotanik değere sahip olduğu bilinen likenlere ait olan sekonder metabolitlerden “evernik asit” seçilmiştir. Likenler, diğer doğal kaynaklarda sentezlenemeyen ve çoğu asidik karakterde özgün “sekonder metabolitler” üretmektedirler. Bu maddelerin birçoğunun bitkilerde sentezlenememesi ve tamamen likenlere özgü olmaları likenlerin tercih edilmesindeki önemli etkenlerdendir.

*P. aeruginosa*, QS çalışmalarında model organizmalardan biri haline gelmiştir [56]. QS ile regüle edilen genlerinin çoğu bilinmektedir. Biyofilm oluşumu ve virulans dahil pek çok fizyolojik davranışı QS mekanizması ile düzenlenmektedir. Enfeksiyonlar açısından önem taşıyan ve QS ile regüle edildiği bilinen elastaz ve ramnosiltransferaz 1 enzimlerine ait *lasB* ve *rhlA* genleri bu çalışmada hedef genler olarak seçilmiştir. Evernik asit dozları uygulaması ile QS inhibisyonu gerçekleştirilerek bu genlerin ekspresyon miktarlarının azaldığı uygulanan iki farklı yöntem ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Bunlar kRT-PZR ve floresan ışımaya yöntemleridir.

Floresan ışımaya yönteminde iki adet floresan biyosensör *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır: *lasB-gfp* ve *rhlA-gfp*. Bu bakterilerin floresan ışımaya miktarları, sitoplazmalarında bulunan GFP miktarı ile doğru orantılıdır. Bakteriler GFP sentezini ancak bağlı oldukları *lasB* ve *rhlA* genlerinin ekspresyonu ile gerçekleştirmekte ve bu genler sadece QS sinyallerinin ilgili reseptörler tarafından algılanması sonucunda regüle edilmektedirler. Kısaca, ölçümleri gerçekleştirilen floresan ışımaya değerleri QS mekanizmasının çalışmasına bağlıdır.

Floresan ölçümleri sonucunda elde edilen veriler 116 µM evernik asit dozunun *P. aeruginosa*'nın LasIR ve RhlIR QS sistemlerini kontrole oranla yaklaşık %50 inhibe ettiğini göstermektedir. İnhibisyon değerlerinin doğruluğunu belirlemek için bakteri miktarı da gözlenmiş ve floresan ışımaya miktarındaki azalmanın bakteri ölümüne dayalı olmadığı anlaşılmıştır. Rasmussen ve ark. 2005 yılında *Penicillium* cinsine ait türlerden

elde ettikleri penisillik asit ile yaptıkları çalışmada *lasB-gfp* suşunu kullanarak 80 µM konsantrasyonda QS mekanizmasını neredeyse tamamen inhibe ettiklerini belirtmişlerdir [66]. Bu çalışmada *P. aeruginosa* üzerine QS inhibisyon etkisi bilinen penisillik asit'in 96 µM, 48 µM, 24 µM, 12 µM ve 6 µM dozlarındaki QSI özelliği *lasB-gfp* ve *rhlA-gfp* floresan suşları ile incelenmiştir. 24 µM konsantrasyonunda %56, 96 µM konsantrasyonunda ise neredeyse tamamen inhibisyon gözlenmiştir. Böylelikle elde edilen floresan grafiklerin literatür ile karşılaştırılması yapılarak floresan biyosensör suşların tutarlılığı kontrol edilmiştir. Jakobsen ve ark., 2012 yılında pek çok bitki özütünü QSI özellikleri için taramış; *Ginkgo biloba*, frenk maydanozu ve kekik gibi bitkilerin özütleri ile olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Fakat özellikle yaban turpundan elde ettikleri “iberin” molekülünü *P. aeruginosa* üzerinde uygulayarak, 100 µM dozun *lasB-gfp* füzyonu ekspresyonunu tamamen inhibe edebildiğini belirtmişlerdir [65]. Evernik asit 116 µM doz ile bu bağlamda %100 inhibisyon sağlamamıştır, fakat denenebilecek yüksek dozlarda daha etkili olabileceği düşünülmektedir.

kRT-PZR hassas bir yöntem olup, QS gen ekspresyon miktarlarının kantitatif olarak hesaplanmasına olanak sağlamaktadır [67]. 2015 yılında Kim ve ark., zencefilden elde ettikleri 6-gingerol molekülünü *P. aeruginosa* üzerinde 10µM konsantrasyonunda uygulamış ve kRT-PZR yöntemi ile analizler sonucunda *lasB* ve *rhlA* gibi QS bağlı genlerde %74-86 down-regülasyon belirlemişlerdir [68].

Bu çalışmada *P. aeruginosa* PAO1 suşunda *lasB* ve *rhlA* genlerinin ekspresyonu kRT-PZR yöntemi ile incelenmiş ve evernik asitin QSI özelliği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular *lasB* ve *rhlA* gen ekspresyonlarının 116 µM evernik asit dozu uygulamasında kontrol grubuna göre yaklaşık %80 azaldığını göstermiştir. Dozların seri dilüsyon örneklerinde ekspresyon seviyelerinin düzenli artarak kontrol grubuna yaklaştıkları görülmüştür. 2008 yılında Park ve ark., yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* QS sistemini ateş karıncası *Solenopsis invicta* tarafından üretilen solenopsin A molekülü ile inhibe etmişlerdir. Yaptıkları kRT-PZR çalışmaları sonucu 50 µM konsantrasyonda iki gen ekspresyonunun da yaklaşık %50 azaldığını belirlemişlerdir [69]. Evernik asitin bu bağlamda 58 µM konsantrasyonda *lasB* genini %55, *rhlA* genini ise %63 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu evernik asidin solenopsin A molekülünden daha fazla QSI etkisine sahip olduğunu göstermektedir.



Floresan biyosensör yöntemi ile karşılaştırıldığında, kRT- PZR yöntemi ile yapılacak ölçümler için fazladan zaman, hassasiyet ve maliyet gerekmektedir. Ayrıca kRT-PZR yöntemi uygulama süresince *in vivo* olarak anında gözleme izin vermez; ancak deney sonunda mRNA izolasyonu, cDNA sentezi ve PZR aşamaları sonunda veri elde edilir. Floresan yöntemde ise biyosensör suşlar aracılığıyla gerçek zamanlı gözlem yapılabilmekte ve deney sırasında veriler elde edilmektedir. Floresan yöntem ile QSI aktivitesi ölçülebilmesi için biyosensör bir suş gerekmektedir; PZR yönteminde ise yabancı tip suşlar ile çalışılmaktadır. Floresan yöntemde GFP'ler canlı hücreler tarafından sentezlenmektedir ve sitoplazmadaki yarı-ömürleri aktarılabilecek GFP türü seçilerek önceden belirlenmiştir. Bu yüzden alınan ölçümler sadece canlı bakterilere aittir. kRT-PZR yöntem için çok hassas bir çalışma gereklidir. RNA'lar çok kolay kontamine olup bozulabilmektedirler. Üstelik düşük hacimlerle çalışıldığı için hassas ölçüm ve aktarım önem taşımaktadır.

Kullanılan iki yöntem ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında QSI dozu azaldıkça gen ekspresyonlarında birbirine benzer bir artış oranı olduğu gözlenmiştir. kRT-PZR ölçümlerinde floresans ölçümlerine göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Aradaki bu farkın sebebinin transkripsiyon sonucu sentezlenen mRNA miktarı ile bu mRNA'lardan translasyon sonucu oluşturulan protein miktarının ve sitoplazmada bulunma sürelerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

## BÖLÜM 4

### 4. SONUÇLAR / CONCLUSIONS

*P. aeruginosa*'nın belli bir popülasyon yoğunluğuna eriştiğinde, dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurduğu, bu yapıda çoğalarak gelişmesi sonucu makroskopik olarak görülen ve ortadan kaldırılması çok zor olan biyofilm yapısını oluşturduğu bilinmektedir [7, 12]. QS mekanizmasının inhibisyonu, bakterilerin popülasyon yoğunluklarını algılamalarını engellemekte, biyofilm oluşumu ve virulans gibi fizyolojik aktiviteleri sınırlamaktadır. Bu çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* QS mekanizması üzerine etkili, biyofilm oluşumunu engelleyerek tedaviye yardımcı olabileceği düşünülen evernik asit sekonder metabolitinin moleküler düzeyde QS bağlantılı gen ekspresyonuna etkisinin floresan protein ışına yöntemi ile incelenmesi ve elde edilen verilerin kRT-PZR sonuçları ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Likenlerden elde edilen bir sekonder metabolit olan evernik asit ile yapılan uygulamalarda belirlenen QS inhibisyon miktarları, likenlere özgü sekonder metabolitlerin bu konudaki potansiyellerinin araştırılması gerekliliğini göstermiştir. Bitki ve likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin QSI ilaçlara dönüştürülme potansiyelleri günümüzde önem taşımaktadır. Fakat bununla ilgili olarak kantitatif inhibisyon ölçümleri yapabilmek için QS mekanizması engellenmek istenilen mikroorganizmaya ait bu konuda detaylı bilgi gerekmektedir.

Kantitatif QS inhibisyonu analizi için uygulanan iki yöntem sonucunda benzer bulgular elde edilmiştir. Bu bağlamda, ölçümleri yapabilecek ilgili cihazlar bulunduğu varsayıldığında floresan ışına yöntemi maliyet ve zaman açısından avantajlı görülmektedir. Günümüzde biyoteknolojik yöntemlerin ilerlemesi ile biyosensör canlılar oluşturularak *in vivo* çalışmalara olanak sağlanmıştır. Floresans yöntemi ile DNA ya da RNA izolasyonuna gerek kalmadan QS inhibisyon seviyelerinin elde edilebileceği düşünülmektedir. PZR yöntemleri için gereken izolasyon, cDNA oluşturma, primer kullanımı gibi gerekli adımlara da ihtiyaç duyulmadan, uygulama anında sadece floresan ışına miktarı ölçülerek analiz yapılması bu yöntemi öne çıkarmaktadır. Böylelikle PZR yöntemine göre daha kısa sürede sonuç elde edilebildiği görülmüştür.

QSI moleküllerin ilaç haline getirilmesi için pek çok farmakolojik çalışma gerekmektedir. Bu sebeple QSI potansiyeline sahip sekonder metabolit moleküllerinin hızlı şekilde taranması ve belirlenmesi önem taşımaktadır. Liken sekonder metabolitlerinden biri olan evernik asitin *P. aeruginosa* için QSI özelliğinin incelenmesi sonucunda elde edilen veriler, olası QSI moleküllerin hızlı şekilde taranması için floresan ışımaya yönteminin uygun olduğunu göstermiştir.



## KAYNAKLAR / REFERENCES

- [1] Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology*, 176(2), 269.
- [2] Bassler, B. (2015) Manipulating Quorum Sensing to Control Bacterial Pathogenicity. *The FASEB Journal*, 29(1 Supplement), 88-1. Fuqua 2001
- [3] Rul, F., Monnet, V. (2015) How microbes communicate in food: a review of signaling molecules and their impact on food quality. *Current Opinion in Food Science*, 2, 100-105.
- [4] Zhu, J., Kaufmann, G.F. (2013) Quo vadis quorum quenching?. *Current opinion in pharmacology*, 13(5), 688-698.
- [5] Girard, G., Bloemberg, G.V. (2008) Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*.
- [6] Mohamed, J.A., Huang, D.B. (2007) Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*, 56(12), 1581-1588.
- [7] Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., Biggs, C.A. (2011) "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1869-1881.
- [8] Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108.
- [9] Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- [10] Carlier, A., Pessi, G., Eberl, L. (2015) Microbial Biofilms and Quorum Sensing. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 45-52). Springer International Publishing.
- [11] Koch, C., Hoiby, N. (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *The Lancet*, 341(8852), 1065-1069.
- [12] Proesmans, M., Vermeulen, F., Boulanger, L., Verhaegen, J., De Boeck, K. (2013) Comparison of two treatment regimens for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic fibrosis*, 12(1), 29-34.

- [13] CDC (2014) *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- [14] Gül M., Şensoy A., Çetin B., Korkmaz F., Seber E. (2004) Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Seftazidime Duyarlılığın E-Test ve Disk Difüzyon Yöntemleri ile Araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 34, 33-36.
- [15] Allydice-Francis, K., Brown, P.D. (2012) Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. International journal of microbiology, 2012.
- [16] Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. Analytical and bioanalytical chemistry, 387(2), 409-414.
- [17] Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., & Iglewski, B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. Journal of bacteriology, 185(7), 2080-2095.
- [18] Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N. (2000) The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes and infection, 2(14), 1721-1731.
- [19] Smith, R.S., Iglewski, B.H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Current opinion in microbiology, 6(1), 56-60.
- [20] Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M. L., Givskov, M., Eberl, L., Tolker-Nielsen, T. (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. Environmental microbiology, 16(7), 1961-1981.
- [21] Maurer, C.K., Lu, C., Empting, M., Hartmann, R.W. (2015) Synthetic Quorum Sensing Inhibitors (QSIs) Blocking Receptor Signaling or Signal Molecule Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight (pp. 303-317). Springer India.
- [22] Fuqua, C., Greenberg, E.P. (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3(9), 685-695.
- [23] Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS microbiology reviews, 25(4), 365-404.

- [24] Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J. (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46-65.
- [25] Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., Nomura, N. (2013) Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and Environments*, 28(1), 13-24.
- [26] Lequette, Y. et al. (2006) A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology* 188, 3365-3370
- [27] McGrath, S., Wade, D.S. and Pesci, E.C. (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) FEMS. *Microbiology Letters* 230, 27-34.
- [28] Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Cámara, M., Williams, P. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular microbiology*, 50(1), 29-43.
- [29] Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., Greenberg, E.P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407(6805), 762-764.
- [30] Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- [31] Monroe, D. (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol*, 5(11), e307.
- [32] Christiaen, S.E., Matthijs, N., Zhang, X.H., Nelis, H.J., Bossier, P., Coenye, T. (2014) Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Pathogens and disease*, 70(3), 271-279.
- [33] Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Rasmussen, T.B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H.P., Rygaard, J., Moser, C., Eberl, L., Høiby, N. (2005) Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151(12), 3873-3880.

- [34] Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. The EMBO journal, 22(15), 3803-3815.
- [35] Dong, Y.H., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 362(1483), 1201-1211.
- [36] Pompilio, A., Crocetta, V., Pomponio, S., Fiscarelli, E., Di Bonaventura, G. (2015) In vitro activity of colistin against biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* is significantly improved under “cystic fibrosis-like” physicochemical conditions. Diagnostic microbiology and infectious disease.
- [37] Younis, K.M., Usup, G., Ahmad, A. (2015) Secondary metabolites produced by marine streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*. Environmental Science and Pollution Research, 1-12.
- [38] Ranković, B., Kosanić, M. (2015) Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. In Lichen Secondary Metabolites (pp. 1-26). Springer International Publishing.
- [39] Romagni, J.G., Dayan, F.E. (2002) Structural diversity of lichen metabolites and their potential use. In Advances in Microbial Toxin Research and its Biotechnological Exploitation (pp. 151-169). Springer US.
- [40] Çobanoğlu, G., Yavuz, M., Costache, I., Radu, I. (2010) Additional and new lichen records from Cozia National Park, Romania. Mycotaxon, 114(1), 193-196.
- [41] Lawrey, J.D. (2009) Chemical defense in lichen symbioses. Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 167-182.
- [42] Deduke, C., Timsina, B., Piercey-Normore, M.D. (2012) Effect of environmental change on secondary metabolite production in lichen-forming fungi. INTECH Open Access Publisher.
- [43] Shukla, V., Joshi, G.P., Rawat, M.S.M. (2010) Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. Phytochemistry Reviews, 9(2), 303-314.
- [44] Coskun, Z.M., Ersoz, M., Acikgoz, B., Karalti, I., Cobanoglu, G., Sesal, C. (2015) Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Methanolic Extracts from Different *Cladonia* Species on Human Breast Cancer Cells. Folia Biologica (Praha), 61, 97-103.

- [45] Açıkgöz, B., Karaltı, İ., Ersöz, M., Coşkun, Z. M., Çobanoğlu, G., Sesal, C. (2013) Screening of antimicrobial activity and cytotoxic effects of two *Cladonia* species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(5-6), 191-197.
- [46] McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703-3711.
- [47] Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jørgensen, F., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Williams, P., Stewart, G.S. (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS microbiology letters*, 163(2), 185-192.
- [48] Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S., Stewart, G.S. (1997) Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Journal of bacteriology*, 179(17), 5271-5281.
- [49] Farrand S.K., Qin Y. Oger P. (2002) Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods Enzymology* 358, 452–484.
- [50] Raso, A., Biassoni, R. (2014) Twenty years of qPCR: a mature technology?. In *Quantitative Real-Time PCR* (pp. 1-3). Springer New York.
- [51] Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233. Chicago
- [52] Netterwald J. (2007) Fluorescent Proteins and Gene Expression. *G P magazine* 6(5), 14-16.
- [53] Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 509-544.
- [54] Hornef, M.W., Roggenkamp, A., Geiger, A.M., Hogardt, M., Jacobi, C.A., Heesemann, J. (2000) Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: a GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microbial pathogenesis*, 29(6), 329-343.



- [55] Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Christensen, L.D., Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2011) Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition in vitro. In *Quorum Sensing* (pp. 253-263). Humana Press.
- [56] Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87-102.
- [57] Yang, L., Rytke, M.T., Jakobsen, T.H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2009) Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2432-2443.
- [58] Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- [59] Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 34-40.
- [60] Brackman, G., Coenye, T. (2015) Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 5-11.
- [61] Hentzer M., Eberl L., Nielsen J., Givskov M. (2003) Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs* 17, 241-250.
- [62] Azimi, H., Khakshur, A.A., Aghdasi, I., Fallah-Tafti, M., Abdollahi, M. (2012) A review of animal and human studies for management of benign prostatic hyperplasia with natural products: perspective of new pharmacological agents. *Inflammation Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation Allergy)*, 11(3), 207-221.
- [63] Savo, V., Joy, R., Caneva, G., McClatchey, W.C. (2015) Plant selection for ethnobotanical uses on the Amalfi Coast (Southern Italy). *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 11(1), 1.
- [64] Issam, A.A., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2015) Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*, 22(2), 245-255.
- [65] Jakobsen, T.H., Bragason, S.K., Phipps, R.K., Christensen, L.D., van Gennip, M., Alhede, M., Skindersoe, M., Larsen, T.O., Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2012) Food as a source for QS inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing

inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology, AEM-05992.

[66] Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O., Andersen, J.B., Koch, B., Larsen, T.O., Hentzer, M, Eberl, L. (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. Microbiology, 151(5), 1325-1340.

[67] Wood L.F., Ohman D.E. (2012) Identification of Genes in The  $\sigma^{22}$  Regulon of *Pseudomonas aeruginosa* Required for Cell Envelope Homeostasis in Either the Planktonic or the Sessile Mode of Growth. mBio, 3(3), 1-11.

[68] Kim, H.S., Lee, S.H., Byun, Y., Park, H.D. (2015) 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. Scientific reports, 5.

[69] Park, J., Kaufmann, G.F., Bowen, J.P., Arbiser, J.L., Janda, K.D. (2008) Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Infectious Diseases, 198(8), 1198-1201.

## ÖZGEÇMİŞ

**ADI SOYADI** : Barış GÖKALSIN  
**YAZIŞMA ADRESİ** : Fahrettin Kerim Gökay Cad. Pembe Köşk Sok.  
Pembe Köşk Apt. No:1 D:14 Göztepe/İSTANBUL  
**DOĞUM TARİHİ ve YERİ** : 20.11.1984 İSTANBUL  
**E-POSTA** : [bgokalsin@gmail.com](mailto:bgokalsin@gmail.com)  
**ÖĞRENİM DURUMU** : Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Ortaöğretim	Sayısal	Özel Kalamış Lisesi	1999
Lisans	İşletme	Anadolu Üniversitesi	2012
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2014

## Yayınlar

### Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Quorum Sensing Inhibition Properties of Evernic Acid on *Pseudomonas aeruginosa*, 2nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2015.

Balıkesir Bölgesinden Toplanan Liken Örneklerine Ait Özütlerin *Escherichia coli* Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri, 2nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2015.

Balıkesir Bölgesinden Toplanan *Platismatia glauca* Likenine Ait Aseton Özütünün *Escherichia coli* Quorum Sensing Mekanizmasına Etkisi, 2nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2015.

The Effects of Ultrasound Application on Green Algae *Chlorella variabilis*, International Congress on Applied Biological Sciences, Makedonya, 2015.

*Stevia rebaudiana* (Bertoni)'nın Büyümesi ve Steviol Glikozit Üretimi Üzerine Kitosan ve Kitosan Nanoparçacıkların Etkilerinin Araştırılması, 22. Uusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 2014.