

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE KAYNAKLI PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS CİNSİ ÜYELERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Maryam DIANI

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Ağustos

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Maryam DIANI

İmzası

ONAY

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK danışmanlığında Maryam DIANI tarafından hazırlanan bu çalışmatarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Türkiye Kaynaklı Peynir Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus* Cinsi Üyelerinin Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması

Maryam DIANI

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Çalışmamızda ilk olarak peynir izolatu olan 15 adet *Enterococcus faecalis* ve 33 adet *Enterococcus faecium* izolatları ile, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 ve *Enterococcus faecalis* OG1RF kontrol suşlarının biyofilm oluşum özellikleri incelenmiştir. *E. faecalis* izolatların %26.6' si biyofilm üreticisi iken geri kalan izolatların biyofilm üretim özelliğine sahip olmadığı belirlenmiştir. Bunun yanında, *E. faecium* izolatlarının %33'sının biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. 48 Enterokok izolatının MIC değerleri incelendiğinde kanamisin antibiyotiğine karşı 48 izolatın tamamı dirençli bulunurken, izolatların %83.3' ü vankomisin antibiyotiğine karşı direnç profili sergilemiştir. Ayrıca biyofilm üreticisi olan izolatların tamamı planktonik formdayken gentamisine karşı duyarlı olmalarına karşın biyofilm ürettikleri durumlarda gentamisine yüksek düzeyde (32000 mg/L) dirençli hale geçmişlerdir. Benzer şekilde, izolatlar biyofilm oluşturduklarında vankomisin antibiyotiğine dirençlerinin 16000 mg/L'ye kadar yükselmiştir. Hidrofobisite sonuçlarına göre izolatların biyofilm oluşturma düzeyleri ve hidrofobisite yeteneği arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. İzolatların jelatinaz üretim denemesi sonucuna göre *E. faecalis* izolatları içerisinde dört (64, 72, 78, 140 kodlu izolatlar) güçlü proteaz (+++), ve üç (ATCC 29212, 79, 81 kodlu suşlar) negatif proteaz (-) ve kalan dokuz suş zayıf proteaz (+) özelliğinde suş saptanmıştır. *E. faecium* izolatlarında ise bir suş (14 kodlu izolat) proteaz negatif bulunurken, diğer 32 izolatın tamamının zayıf proteaz (+) olduğu belirlenmiştir. İzolatların değişik glukoz konsantasyonda biyofilm üretimleri incelendiğinde; %0.1 ve %1.5'lik glukoz içeren TSB besi ortamında %0.5'lik glukoz içeren TSB besi ortamına

göre daha yüksek miktar biyofilm ürettikleri görülmüştür. Morfotiplendirme denemesinde Enterokok izolatları tarafından üretilen biyofilmlerin tamamının aynı morfotipte olduğu bulunmuştur. *esp* geni araştırılması sonucunda 48 suş arasında toplam 4 suş *esp* genini sahip olduğu belirlenmiştir. *esp* geni bakımından pozitif bulunan iki *E. faecalis* izolatı (81 ve 119 kodlu izolatlar) ve iki *E. faecium* (60 ve 134 kodlu izolatlar) izolatları arasında biyofilm üreticisi olmadığı ve biyofilm üreticisi *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları arasında hiçbirinin *esp* genini içermediği tespit edilmiştir. Enterokokların yüzey proteini kodlayan *esp* geninin biyofilm üreticisi olmayan *S. Typhimurium* LT2 suşuna aktarımı sonucunda, bu genin *S. Typhimurium* LT2 suşunda ifade edildiği qRT-PCR denemesi ile gösterilmiştir. Ayrıca bu bulgu, *esp* geninin Gram pozitif bakteri proteini olmasına rağmen Gram negatif bir bakteride ifade olması ve daha önce biyofilm üreticisi değilken, orta düzeyde biyofilm üreticisine dönüşmesi bakımından da önem taşımaktadır.

2016, 111 sayfa

Anahtar kelimeler: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Biyofilm, qRT-PZR, Klonlama

ABSTRACT

PhD Thesis

Determination Biofilm Producing Characteristics of *Enterococcus* Strains Isolated
From Turkey Originated Cheese Samples

Maryam DIANI

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Nefise AKÇELİK

In this project, firstly, biofilm producing abilities of cheese originated 15 *Enterococcus faecalis* and 33 *Enterococcus faecium* strains, and also *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Enterococcus faecalis* OG1RF control strains was investigated. 26.6% of *E. faecalis* isolates was biofilm producer while, the rest of were not able to produce biofilm. Besides these findings, 33% of *E. faecium* isolates was determined as biofilm producers. Considering the MIC value of 48 enterococci isolate, all of tested 48 strains were resistant against Kanamycin antibiotic and 83.3% of them were also exhibited resistance profile against Vancomycin. In addition, despite of the entire biofilm producer strains were resistant against Gentamicin antibiotic, they improved higher levels of Gentamicin resistance (32,000 mg / L) after they form biofilm structure. Similarly, when isolates form biofilm, their resistance level to Vancomycin antibiotic had risen up to 16000 mg/L. According to results of hydrophobicity assay, there was no any significant relation was found between hydrophobicity and biofilm production of the strains. While considering results of gelatinase production experiments, we found four of *E. faecalis* isolates (64, 72, 78, 140 coded isolates) were strong protease (++++) and three of *E. faecalis* isolates (ATCC 29212, 79, 81 coded strains) were negative protease (-) and the remaining nine strains were detected as weak protease (+) property. Among *E. faecium* isolates, only one strain (14 coded isolates) was found as negative proteases while the other 32 isolates was determined as weak protease (+). While we examined the biofilm producing abilities of strains at different glucose concentrations, we found that while strains grown in TSB medium supplemented with 0.1% and 1.5%

glucose they produced higher levels of biofilm compared to 0.5% glucose. All strains were found to be in the same morphotype. As a result of the investigation for the presence of *esp* gene among strains, this gene was determined in four of the isolates. We found that, none of the two *E. faecalis* isolates (81 and 119 coded isolates) and two *E. faecium* (60 and 134 coded isolates) isolates who contains *esp* gene were biofilm producer, while none of the biofilm producer strains were contains *esp* gene. Following the cloning *esp* gene, encoding Enterococci surface protein, to non-biofilm producer *S. Typhimurium* LT2 strains, we shown by qRT-PCR that this gene is expressed in *S. Typhimurium* LT2. Also, these findings are important because *esp* gene is belong to a Gram positive organism and can expressed in a Gram negative organism and this organism become intermediate level biofilm producer following the transforming this gene.

2016, 111 pages

Keywords: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Biofilm, qRT-PCR, Cloning

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince her anlamda desteğini esirgemeyen ve yönlendiren, büyük anlayışıyla her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e, değerli katkıları ve yönlendirmeleri için değerli hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e,

Ayrıca, doktora tez izleme komitemde ve tez jürimde yer alan, tezin başarıyla tamamlanabilmesi için görüş ve düşünceleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. E. Sümer ARAS ve Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a;

Laburatuvar ortamında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma; Özlem GÜNAY EŞİYOK, Neslihan YÜKSEL, Neslihan TAŞKALE'ye;

Değerli Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma;

Bu uzun ve zor yolda her zaman yanımda duran varlığını bana hissettiren desteğini benden esirgemeyen ve tüm kalbiyle beni destekliyen biricik eşim Dr. Nima ARIAFAR'e;

Son olarak; Eğitimim boyunca beni maddi ve manevi destekleyerek, her zaman kararlarıma saygı göstererek yanımda duran anne ve babama;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	viii
SEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
CİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. <i>ENTEROCOCCUS</i> CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	3
2.2. ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS	3
2.2.1. VİRÜLANS FAKTÖRLER	4
2.3. BİYOFİLMİN TANIMI VE TARİHÇESİ	4
2.4. BİYOFİLM GELİŞİMİNİN AŞAMALARI.....	6
2.5. MİKROORGANİZMALARIN BİYOFİLM OLUŞTURMA NEDENLERİ.....	7
2.6. ENTEROKOKLARIN BİYOFİLM OLUŞTURMASINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	9
2.7. ENTEROKOKLARIN ESP PROTEİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMADAKİ ROLÜ.....	10
2.8. ENTEROKOKLARIN PİLİ YAPISININ BİYOFİLM OLUŞTURMADAKİ ROLÜ.....	11
2.9. ENTEROKOKLARDA <i>GELE</i> GENİNİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ.	11

2.10. ENTEROKOKLARDA <i>FSR</i> GENİNİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ	11
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	12
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	14
4.1. MATERYAL	14
4.1.1. BAKTERİLER	14
4.1.2. BESİYERLERİ	15
4.1.3. ANTİBİYOTİKLER	16
4.1.4. ÇÖZELTİLER	17
4.2. YÖNTEM	17
4.2.1. İZOLATLARIN FARKLI İNKÜBASYON SÜRELERİNDE ÜRETTİKLERİ BİYOFİLM YAPILARININ BELİRLENMESİ	17
4.2.2. ENTEROKOKLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN BİYOFİLM YAPILARININ MORFOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ	19
4.2.3. <i>ENTEROCOCCUS</i> CİNSİ ÜYELERİNİN JELATİNAZ ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI	19
4.2.4. FARKLI GLUKOZ KONSANTRASYONLARININ <i>E. FAECALIS</i> VE <i>E. FAECIUM</i> ÖRNEKLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ	19
4.2.5. ÖRNEKLERDE <i>ESP</i> GENİNİN ARAŞTIRILMASI	20
4.2.6. ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ENTEROKOKAL BİYOFİMLER ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ	23
4.2.7. HÜCRE YÜZEYİ HİDROFOBİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI	24
4.2.8. KLONLANACAK <i>ESP</i> PROTEİNİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI	25

4.2.9. ÇOĞALTILAN <i>ESP</i> GENİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN DNA DİZİ ANALİZİ.....	26
4.2.10. <i>ESP</i> PROTEİNİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI	27
4.2.11. <i>ESP</i> GENİ N-TERMİNAL BÖLGESİNİ İÇEREN pBAD24 VEKTÖRÜNÜN <i>ESCHERİCHİA COLİ</i> DH5ALPHA VE <i>SALMONELLA</i> TYPHİMURİUM LT2'YA AKTARIMI.....	30
4.2.12. <i>SALMONELLA</i> TYPHİMURİUM LT2 SUŞUNDA ARABİNOZ VARLIĞINDA <i>ESP</i> PROTEİNİNİN ÜRETİMİNİN TEŞVİKİ	31
4.2.13. POLİSTİREN ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN BELİRLENMESİ... 32	
4.2.14. ÖRNEKLERDEN RNA İZOLASYONU.....	32
4.2.15. cDNA SENTEZİ	33
4.2.16. ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMERLERİN TASARLANMASI	34
4.2.17. GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR (QRT-PZR) İLE BELİRLENMESİ.....	35
4.2.18. ERİME EĞRİSİ ANALİZİ.....	36
4.2.19. AMPLİFİKASYON VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	37
4.2.20. NORMALİZASYON	38
4.2.21. NORMALİZE EDİLEN VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	39
4.2.22. <i>ESP</i> N-TERMİNAL BÖLGESİNİN pET28A VEKTÖRÜ ARACILIĞI İLE <i>E. COLİ</i> DH5 ALPHA VE <i>E. COLİ</i> BL21 SUŞLARINA AKTARIMI	40
4.2.22.1. Enzim kesimi	41
4.2.22.2. Ligasyon.....	42
4.2.23. pET28A+ <i>ESP</i> VEKTÖRÜNÜ İÇEREN <i>E. COLİ</i> BL21 ÖRNEĞİNDEN TOPLAM PROTEİN SAFLAŞTIRMASI	43
4.2.23.1. SDS PAGE	44

4.2.24. pET28A+ESP VEKTÖRÜNÜ İÇEREN <i>E. COLI</i> BL21 ÖRNEĞİNDEN HİSPUR Nİ-NTA KİTİ KULLANILARAK ESP PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRMASI.....	45
4.2.25. SAFLAŞTIRILAN ESP PROTEİNİNİN WESTERN BLOT ANALİZİ	47
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
5.1. İZOLATLARIN FARKLI İNKÜBASYON SÜRELERİNDE ÜRETTİKLERİ BİYOFİLM YAPILARI.....	48
5.2. İZOLATLARIN MORFOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ	49
5.3. <i>ENTEROCOCCUS</i> CİNSİ ÜYELERİNİN JELATİNAZ ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI.....	49
5.4. FARKLI GLUKOZ KONSANTRASYONLARININ <i>E. FAECALIS</i> VE <i>E. FAECIUM</i> ÖRNEKLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ ..	52
5.5. ÖRNEKLERDE <i>ESP</i> GENİNİN ARAŞTIRILMASI	56
5.6. ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ENTEROKOKAL BİYOFİMLER ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	59
5.7. HÜCRE YÜZEYİ HİDROFOBİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI	65
5.8. ESP PROTEİNİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI.....	66
5.9. <i>ESP</i> GENİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN DNA DİZİ ANALİZ.....	67
5.10. <i>ESP</i> PROTEİNİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLAMASI	68
5.11. <i>ESP</i> GENİ N-TERMİNAL BÖLGESİNİ İÇEREN pBAD24 VEKTÖRÜNÜN <i>ESCHERİCHIA COLI</i> DH5 ALPHA VE <i>SALMONELLA</i> TYPHİMURİUM LT2'YA AKTARIMI.....	70
5.12. TRANSFORMASYON REAKSİYONUNUN KONTROLÜ.....	71
5.13. <i>ESP</i> ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ <i>SALMONELLA</i> TYPHİMURİUM LT2 VE <i>ESCHERİCHIA COLI</i> DH5 ALPHA ÖRNEKLERİNİN BİYOFİLM ÜRETİM DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER	73

5.14. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM LT2 VE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH5 ALFA ÖRNEKLERİNDEN RNA İZOLASYONU	74
5.15. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM LT2 VE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH5 ALPHA ÖRNEKLERİNDEN cDNA SENTEZİ.....	75
5.16. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM LT2 VE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH5 ALPHA ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN cDNA ÖRNEKLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN qRT-PZR DENEMESİ SONUÇLARI	75
5.17. ESP N-TERMİNAL BÖLGESİNİN pET28A VEKTÖRÜ ARACILIĞI İLE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH5 ALPHA VE <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21 SUŞLARINA AKTARIMI.....	79
5.18. pET28A+ESP VEKTÖRÜNÜ İÇEREN <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21 ÖRNEĞİNDEN TOPLAM PROTEİN İZOLASYONU	82
5.19. HİSPUR Nİ-NTA KİTİ KULLANILARAK ESP PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILMASI	83
5.20. ESP PROTEİNİNİN WESTERN BLOT ANALİZİ.....	85
<u>6. TARTIŞMA</u>	<u>87</u>
6.1. SONUÇ.....	96
7. KAYNAKLAR.....	97
<u>8. EKLER.....</u>	<u>106</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>109</u>
<u>10.TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>110</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biofilm_2015)	7
Şekil 4.1. Mikrodilüsyon plak yönteminin aşamaları.....	18
<i>esp</i> geninin, Türkiye kaynaklı peynir örneklerinden izole edilen <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> örneklerinde var olup olmadığının araştırılması amacı ile <i>esp</i> gen (Şekil 4.2) dizisine özgü primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 farklı primer çifti <i>esp</i> 11- <i>esp</i> 12, <i>esp</i> 2- <i>esp</i> 5 ve <i>esp</i> 46- <i>esp</i> 47 (Çizelge 4.4) kullanılarak enterokok izolatlarından saflaştırılan DNA örneğinde <i>esp</i> geninin varlığının araştırılması çalışmaları ile eş zamanlı olarak tekrar sayılarındaki farklılıklar incelenmiştir.....	20
Şekil 5.1. <i>E. faecium</i> izolatlarının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda ürettikleri biyofilm miktarları.....	48
Şekil 5.2. <i>E. faecalis</i> izolatlarının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda ürettikleri biyofilm miktarları.....	48
Şekil 5.3. İzolatların biyofilm morfotipleri	49
Şekil 5.4. İzolatların farklı proteaz düzeylerine örnekler	50
Şekil 5.5. Çalışmada kullanılan moleküler markerlar	57
Şekil 5.6. <i>esp</i> 11-12 primer çifti kullanılarak izolatlarda çoğaltılan <i>esp</i> geninin agaroz jel görüntüsü.	57
Şekil 5.7. <i>esp</i> 2-5 primer çifti kullanılarak izolatlarda çoğaltılan <i>esp</i> geninin agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 5.8. <i>esp</i> 46-47 primer çifti kullanılarak izolatlarda çoğaltılan <i>esp</i> geninin agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 5.9. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının hücre yüzey hidrofobisitesi yüzdeleri	65
Şekil 5.10. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının hücre yüzey hidrofobisitesi yüzdeleri.....	65
Şekil 5.11. İzolatlarda çoğaltılan <i>esp</i> geninin N terminal bölgesinin agaroz jel görüntüsü	67
Şekil Hata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı. 12. Ligasyon sonrası elde edilen vektörlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	68
Şekil 5.13. <i>esp</i> geni aktarılmış vektörün enzim kesimi ile kontrolü.....	69
Şekil 5.14. Transformantlardan izole edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü.....	71
Şekil 5.15. A: Enzim kesimi ile transformasyonun kontrolü, B: PCR denemesi ile transformasyonun kontrolü.....	72

Şekil 5.16. esp geni içeren Salmonella Typhimurium LT2 ve E.coli DH5α suşlarının arabinoz ile indükledikten sonra ve esp geni içermeyen doğal suşların 24 saat'te biyofilm üretim düzeyleri	73
Şekil 5.17. RNA bantlarının agaroz jel görüntüsü.....	74
Şekil 5.18. pBAD24 vektörü ile esp geni içeren Salmonella Typhimurium LT2 ve E.coli DH5α suşlarının ve esp geni içermeyen doğal suşların cDNA'ları.....	75
Şekil 5.19. gapA geni için 10 – 10 ⁻⁶ dilüsyonlarla oluşturulan (a) Amplifikasyon eğrileri, (b) standart eğrisi, (c) erime eğrileri, (d) erime eğrisi analizine göre oluşan erime pikleri görülmektedir. NK: Negatif Kontrol.....	78
Şekil 5.20. Boş pBAD24 vektörü ve esp genini içeren pBAD24 vektörlerini taşıyan LT2 cDNA ları ile gerçekleştirilen qRT-PCR denemesi sonucunda elde edilen esp ifadesi ...	79
Şekil 5.21. pET28a ve pET28a+esp vektörleri içeren E.coli DH5α suşundan plazmid izolasyonu.....	80
Şekil 5.22. E. coli DH5a suşundan izole edilen pET28a +esp vektöründen esp geninin PCR ile çoğaltılması.....	81
Şekil 5.23. pET28a ve pET28a +esp vektörlerini içeren E.coli BL21 suşundan plazmid izolasyonu.....	82
Şekil 5.24. E. coli BL21 bakteri örneklerinin ve pET28a +esp genini içeren E.coli BL21 bakteri örneklerinin SDS page görüntüsü.....	83
Şekil 5.25. pET28a+esp genini içeren E. coli BL21 bakteri örneğinin HisPur Ni-NTA	84
Şekil 5.26. pET28a+esp genini içeren E. coli BL21 bakteri örneğinin Western Blot görüntüsü	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4. 1. <i>Enterococcus faecium</i> izolatları	14
Çizelge 4. 2. <i>Enterococcus faecalis</i> izolatları.....	15
Çizelge 4. 3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler	17
Çizelge 4. 4. <i>esp</i> geninin varlığının araştırılmasında kullanılan primer çiftleri	21
Çizelge 4. 5. <i>esp</i> 11-12 primer çifti ile yapılan PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	22
Çizelge 4. 6. <i>esp</i> 2-5 primer çifti ile yapılan PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	22
Çizelge 4. 7. <i>esp</i> 46-47 primer çifti ile yapılan PzR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	23
Çizelge 4. 8. <i>esp</i> 1-2 primer çifti ile yapılan PCR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	25
Çizelge 4. 9. Sekans PzR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları	26
Çizelge 4. 10. cDNA sentez protokolü.....	34
Çizelge 4. 11. Ters Transkripsiyon sıcaklık döngüsü.....	34
Çizelge 4. 12. qRT-PZR için kullanılan primerler	35
Çizelge 4. 13. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı	35
Çizelge 4. 14. LightCycler cihazında kullanılan qRT-PZR programı.....	35
Çizelge 5.1. <i>E. Faecium</i> izolatlarının jelatinaz üretim özellikleri	51
Çizelge 5.2. <i>E. Faecalis</i> izolatlarının jelatinaz üretim özellikleri.....	52
Çizelge 5.3. <i>E. Faecium</i> izolatlarının biyofilm üretimleri üzerine glukozun etkisi	54
Çizelge 5.4. <i>E. Faecalis</i> izolatlarının biyofilm üretimleri üzerine glukozun etkisi	55
Çizelge 5.5. <i>E. Faecium</i> ve <i>e. Faecalis</i> suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık düzeyleri.	60
Çizelge 5.6. <i>Enterococcus</i> suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri.....	62
Çizelge 5.7. Gentamisin antibiyotiği için mbic sonuçları	64
Çizelge 5.8. Vankomisin antibiyotiği için mbic sonuçları	64

SİMGELER DİZİNİ

ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz çifti
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EtBr	Etidium bromide
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ESP	Enterokokal Yüzey Proteini
EPS	Ekzo Polisakkarit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
UV	Ultra Viyole
VRE	Vankomisin dirençli enterokolar

1. GİRİŞ

Enterokoklar, genel olarak laktik asit bakterileri içerisinde yer alan bir bakteri grubu olup Gram (+), katalaz (-), oksidaz (-), fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, hareketsiz, homofermantatif, diplokok ya da zincir görünümündeki bakterilerdir (1). Enterokoklar, insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde ve çeşitli süt ürünlerinde hakim floranın bir bölümünü oluştururlar. Özellikle lipolitik ve proteolitik aktiviteleri ile peynirin olgunlaşması sırasında tat ve aroma oluşumunda önemli etkiye sahiptirler. Bakteriyosin üretimi, probiyotik karakterleri, starter kültür olarak kullanılabilirlikleri gibi önemli biyoteknolojik özelliklere sahip olmalarının yanı sıra bazı enfeksiyonların da en önemli nedenleridir. Aynı zamanda birçok antibiyotiğe karşı direnç göstermeleri, gıdalarda kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu nedenle enterokokların peynir üretiminde güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için, suşların ayrıntılı incelenmesi zorunludur (2). Enterokoklar; ağız florasında, insan ve hayvanların genital sisteminde ve bağırsak florasında doğal olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir. Ayrıca, üriner sistem, dolaşım sistemi, karın içi ve pelvik sistemler ve merkezi sinir sistemini enfekte etme özelliği olan yaygın nazokomiyal (hastane orijinli) ajanları oldukları da bilinmektedir (3).

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (4). Bir başka tanımlamaya göre biyofilm; birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesidir (5). Değişik mikrobiyal türlerin, kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları bir mikro-ekosistemdir (6,7). Enfeksiyon hastalıkları ile biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bu mikroorganizmalar özellikle kalp iç zarı iltihabı, periodontit, kistik fibrozis gibi hastalıklara neden olur (6). 1930'lu yıllardan bugüne kadar yoğun bir şekilde araştırılan biyofilm tabakası, endüstriyel ve evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, gemi karinalarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde önemli derecede ekonomik kayıplara yol açmaktadır (8). Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler (EPS), hücresel savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekzopolisakkaritler, bulunduğu bakteriyi enflamatuar hücrelerin fagositozundan ve antimikrobialerin etkisinden korurlar (9).

Biyofilmler biyotik veya abiyotik yüzeylerde oluşabilirler. Biyofilm yapılarının oluştuğu yüzeyler arasında; canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Bakteriler bir yüzeye tutunup biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden hafif durulama ile uzaklaştırılmazlar. Biyofilmde konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküller de bulunmaktadır (10). Biyofilmde bulunan bakterilerin sentezlediği polisakkaridler, biyofilmin ana ekstraselüler komponentini oluşturur. Bu matriksin içerisinde yaşayan organizmalara bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler gösterebilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (11).



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. ENTEROCOCCUS CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Streptococcaceae familyası içinde yer alan Enterokoklar; katalaz negatif, Gram pozitif koklardır. Toprakta, suda, gıdalarda, hayvan ve insan bağırsak sisteminde, safra yollarında, ağızda ve deride normal flora olarak yer alır. Uygun gelişme ortamını bulması halinde, insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. Son yıllarda klinik olarak diğer streptokokların duyarlı olduğu antimikrobilyallere karşı direnç göstermeleri nedeniyle, özellikle nazokomiyal enfeksiyonlara neden olmalarından dolayı araştırmaların odağı haline gelmişlerdir (12–14).

Önceleri *Streptococcus* cinsi içinde yer alan ve Lancefield serolojik D grubuna ait olan bu cins, fekal streptokok olarak kabul edilmekteydi. 1984 yılında DNA-DNA hibritleşme ve 16S RNA dizi analizi çalışmaları sonucunda *Streptococcus faecium* ve *Streptococcus faecalis* türlerinin diğer streptokollardan önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiş ve Schleifer ve Balz (1984) tarafından *Enterococcus* cinsi olarak ayrılmıştır. Bugüne kadar, 16S rRNA dizisi veya DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile 28 farklı *Enterococcus* cinsi tanımlanmıştır. Bunlardan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* en sık saptanan türlerdir (1).

Optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C olup, birçoğu 10 ile 45 °C arasında değişen sıcaklıklarda gelişebilirler. Aynı zamanda %6.5 tuz varlığında ve pH 9.6' da gelişme gösterirken, 60 °C'de 30 dakika canlı kalabilir ve NaCl'lu ortamlarda, %40 safra tuzu içeren besiyerinde üreyebilirler (1,2).

2.2. ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS

Enterokokların virülansı düşüktür ancak toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. Enterokoklar doğada; toprakta, suda, bitkilerde, kuşlarda, böceklerde ve memeli hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda, yaygın olarak bulunduğu yerin mide-bağırsak sistemi olması nedeniyle, hem hastane hem de hastane dışı ortamda endojen kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. *E. faecalis* diğer enterokok türleri ile kıyaslandığında, en yüksek oranda bulunduğu yerin dışkı olduğu

görülmektedir. *E. faecalis* en yaygın bilinen türdür ve insanlarda görülen enterokok kaynaklı enfeksiyonlarının %90'ından sorumludur (15). Geriye kalan enterokokal enfeksiyonlardan ise *E. faecium*' un sorumlu olduğu belirlenmiştir (15,16)

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının bazıları insan ve hayvan eritrositleri için hemolitik aktiviteye sahip sitolizin üretirler. *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin ürettiği agregasyon maddesinin, söz konusu bakterinin renal hücrelere ve kalp kapaklarına bağlanmasını daha kolay hale getirdiği yapılan araştırmalar sonucunda bulunmuştur. Ayrıca; dolaşım sistemi, pelvik sistemler, merkezi sinir sistemini, üriner sistem ve karın içini enfekte etme yeteneğine sahip olan yaygın hastane kaynaklı ajanlardır (17).

2.2.1. VİRÜLANS FAKTÖRLER

Enterokokların virülansında, genomda bulunan patojenite adaları ve plazmidlerde kodlanan virülans genleri rol oynar. Bu bakterilerin başlıca virülans faktörleri arasında; agregasyon faktörü (AF), enterokok yüzey proteini (ESP), hiyaluronidaz (HYL), hemolizin ve jelatinaz yer almaktadır (11,18). Çalışmalar sonucunda enterokokal bakteriyemilerde %42-68 oranında mortalite bildirilmekle birlikte bu hastaların çoğunda polimikrobiyal bakteriyemi bulunması nedeniyle, enterokokların mortalitedeki rolleri tam olarak tespit edilememektedir. Diğer çalışmalarda da enterokokların mortalitedeki rolleri %31-37 oranında saptanmıştır (19).

2.3. BİYOFİLMİN TANIMI VE TARİHÇESİ

Bakteriyel biyofilm kavramı ilk kez 1683 yılında Antonie van Leeuwenhoek tarafından, insan dışından kazındığı plakları kendi ilkel mikroskobunda incelemesi sonucunda gözlemlediği yapılara “animalcule” (küçük hayvancıklar) adını vermesiyle tanımlanmıştır. 250 yıl sonra, Claude E. ZoBell ışık mikroskobunda bazı deniz bakterilerinin cam slaytların yüzeylerine tutunup mikrokoloniler oluşturduğunu tespit etmiştir (20). Bu araştırmacı aynı zamanda cam yüzeylerdeki bu yapıların yıkama ya da çalkalamayla dağılmadığını da belirlemiştir. Henrici 1933 yılında kümelenmiş bakterilerin fotoğrafını çekmeyi başarmış ve bu yapılar için; “su kökenli bakterilerin birçoğu serbest ve tek yüzen mikroorganizma şeklinde değil, bir yüzeye tutunarak bir arada üremektedirler” ifadesini kullanmıştır. Characklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikroorganizmaların oluşturduğu

biyofilmlerin klor gibi dezenfektanlara dahi dirençli olabileceklerini keşfetmiştir (21). Sonrasında bakterilerin biyofilmler içerisinde çok çeşitli yollarla organize olabilecekleri saptanmıştır. Örneğin; farklı bakteriyel türler ağızda farklı mikroflora üyeleri ile birlikte tutunma özelliği göstermektedir. Mikroelektrot teknolojisiyle birlikte ışık mikroskopisinde sağlanan gelişmeler sonucunda, bakteriyel biyofilmlerin bir yüzeye tutunmuş mikrokolonilerden oluştuğunu ve bu mikrokolonilerle birlikte biyofilmlerin organize ve gelişkin bir şekilde fonksiyonel heterojenite gösterdiklerinin anlaşılması mümkün olmuştur. Biyofilm üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda, biyofilmlerin ekolojik ve endüstriyel sistemlerin dışında, halk sağlığı açısından da ciddi bir önem taşıdığı ortaya konmuştur (22).

Klinik mikrobiyoloji alanında ise ilk kez Høiby (1977) *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin kronik enfekte hastaların akciğerlerinde kümелendiğini tespit etmiştir. Bu alanda biyofilm terimi ilk kez 1978 yılında Costerton ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve aynı araştırmacı tarafından 1987 yılında bu doğa fenomeni kapalı bir yaşam şekli olarak ifade edilmiştir. 1993 yılında Amerikan Mikrobiyoloji Derneği biyofilm kavramını uygun bulduğunu açıklamıştır (10). Costerton ve arkadaşları tarafından (1999) biyofilm; “bir yüzeye tutunmuş ve kendisi tarafından üretilen polimerik bir matriks içerisine gömülen, bakteri topluluğu” olarak tanımlanmıştır.

Biyolojik bir oluşum olan biyofilm; canlı veya cansız bir yüzeye ya da birbirlerine tutunarak değişime uğramış, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (EPS-Extracelluler polymeric substances) içine gömülü olan, pek çok açıdan-genetik yapı, çoğalma, protein sentezi gibi- planktonik hücrelerden farklılıklar içeren mikroorganizmalardan oluşmaktadır (11). Üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapısı, içerisinde su kanallarının da bulunduğu çok katlı bir organizasyondur. EPS, hem kimyasal hem de fiziksel olarak değişkenlik gösterir. EPS'nin temel bileşeni olan polisakkarit çok oranda su içermekle birlikte, yapısında hidrofilik ve hidrofobik kısımlar taşımaktadır (18).

Polisakkaritin yanı sıra EPS'nin yapısında yer alan diğer makromoleküller, protein ve nükleik asittir. Biyofilm yapısının içinde çevre ve konakçı kaynaklı partiküller de yer almaktadır. Bu yapının içine gömülü olarak bulunan bakterilerin, pek çok dış faktöre karşı korunduğu bilinmektedir. Yapılan fosil araştırmaları sonucunda, üç milyar yıldan fazla

süredir mikroorganizmaların biyofilm yapısı oluşturdukları belirlenmiştir (23). Biyofilmler hem canlı (biyotik) hem de cansız (abiyotik) yüzeylerde oluşabilirler. (24).

Biyofilm matriksi içinde yaşayan organizmalara bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler gösterebilir. Gram negatif bakterilerin içerdiği biyofilm yapıları nötral veya polianyonik özellik taşırken, Gram pozitif bakterilerin biyofilm yapısının katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir. Biyofilm yapısını yalnızca bir yüzeye yapışmış ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabaka olarak ifade etmek yanlış olacaktır. Bu yapı içerisinde yer alan organizmalar, küçük sosyal gruplar şeklinde organize olmuşlardır ve koordinasyon yeteneğine sahiptirler (25).

Daha önce de ifade edildiği gibi, biyofilm yapısı içerisinde su kanalları bulunmaktadır ve bu kanallar aracılığı ile yapıda bulunan mikroorganizmalar arasında hem besin maddesi ve oksijen hem de oluşan atık ürünlerin taşınması gerçekleştirilir (26). Olgun bir biyofilm yapısı incelendiğinde, yapının %15'nin hücreler, %85'inin ise matriks tarafından oluşturulduğu görülmüştür. Hücreleri saran matriks, farklı yükseklikte bulunan kuleler şeklinde yapılanmıştır (11).

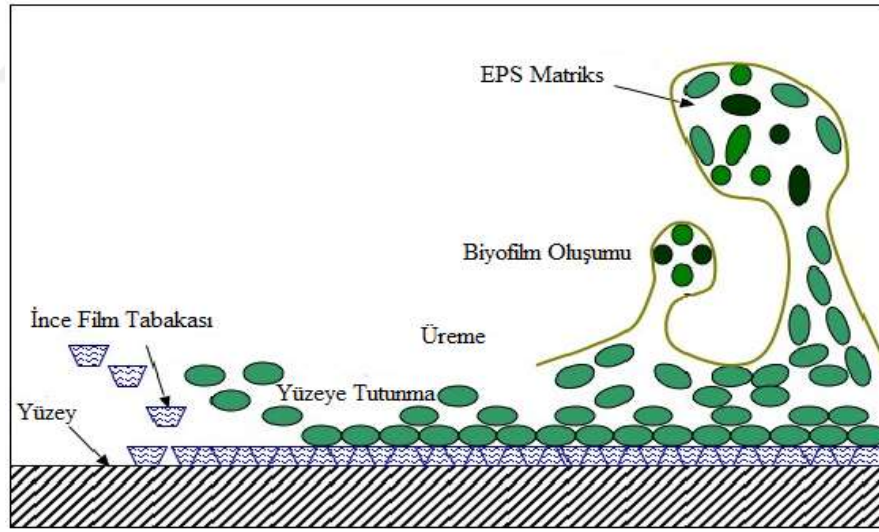
2.4. BİYOFİLM GELİŞİMİNİN AŞAMALARI

Biyofilm yapısının meydana gelişi dört basamakta gerçekleşmektedir (27) (Şekil 2.1):

- 1- İnce tabaka oluşumu: Doğal ortamda mikroorganizmalar direk olarak herhangi bir yüzeye bağlı değildir, uygun bir yüzey bulmaları halinde film benzeri ince bir tabaka oluşturdukları bilinmektedir.
- 2- Tutunma: İkinci aşamada tam temas gerçekleşmektedir. Bu aşamada iki durum söz konusudur. Mikroorganizmalar uygun bir yüzey bulduklarında, o yüzeye ya geçici (geri dönüşümlü) ya da kalıcı (geri dönüşümsüz) olarak tutunurlar. İlk tutunma aşamasında geri dönüşümlü tutunma ile bakteri hücresi ve tutunduğu yüzeyde çeşitli zayıf etkileşimler gerçekleşmektedir. Bu etkileşimlere örnek olarak: olarak hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler ve Van der Waals güçleri örnek verilebilir (5,28,29). Bu aşamada bakteri hücreleri yüzeye çok yakın olmalarına karşın henüz yüzey ile temasa geçmemiştir. Mikroorganizma, bir sonraki aşama

olan geri dönüşümlü tutunma için ortamdaki besin miktarını araştırır ve bu şartlar uygun ise bu aşamaya geçer.

- 3- Bir sonraki aşama, büyümenin, kolonizasyonun, mikrokoloninin ve biyofilm yapısının teşkil edildiği aşamadır. Bu aşamada ayrıca fenotipik ve genotipik çeşitli değişiklikler de gerçekleşir. Ekzopolisakkarit yapı ortamda serbest olarak bulunan bakteri hücrelerini yakalar. İlk tutunan hücre, tutunduğu yüzeyde çoğalmaya başlar ve ardından başka bakterilerin de yüzeye tutunması için uygun zemin hazırlanmış olur. Koruyucu tabaka olan ekzopolisakkarit yapının sentezlenmesini takiben, bakteriler bu yapıya gömülür ve çeşitli çevresel faktörlerden korunarak yaşamlarına devam ederler.
- 4- Yapıdan kopma aşaması: Yapıda bulunan bakteriler zaman içerisinde farklı bölgelere, yüzeylere dağılım gösterirler. Bunun için ise, çeşitli dağılım mekanizmalarına gereksinim duyarlar. Bu kopma aşamasında tek bir bakteri yapıdan kopabileceği gibi, koloni halinde kopuşlar da gerçekleşebilir. Ayrılmada zaman zaman çevresel faktörler, dış etmenler de rol almakla beraber, hücresel uyarım ile de kopmalar gerçekleşebilmektedir (30).



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biofilm> 2015)

2.5. MİKROORGANİZMALARIN BİYOFİLM OLUŞTURMA NEDENLERİ

Bakteriler çeşitli ortamlarda oluşturdukları biyofilm yapıları sayesinde birtakım avantajlara sahip olurlar. Planktonik formdaki bakteriler ile kıyaslandığında ise, biyofilm yapısındaki

bakteriler antibiyotikler, dezenfektanlar ve ısı gibi çeşitli faktörlere karşı planktonik formlarına kıyasla büyük oranda dirençlidir. Oldukça zorlu çevresel koşullar altında canlı kalmak, besin maddelerine ulaşmak, daha önce sahip olmadığı genetik özelliklerin kazanımı gibi organizmaya önemli faydalar sağlayacak özellikler, biyofilm yapısının oluşumu sonucunda elde edilmektedir (31).

- Zararlı çevresel faktörlerden korunmak: EPS yapısı biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmaya göre değişim göstermekle birlikte, farklı rollere de sahiptir. EPS yapısı bir bariyer gibi görev yaparak mikroorganizmaları öldürebilecek maddelerin örneğin antimikrobiyal ajanların biyofilm yapısı içerisine girişini engellemenin veya sınırlandırmanın yanı sıra ortamın pH'sının değişmesi, Ultraviyole ışık etkisi, ortamdaki çözünen madde konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikler, aşırı susuzluk gibi faktörlere karşı koruma sağlar. Doğal ortamların yanı sıra çeşitli endüstriyel ortamlarda oluşan biyofilm yapılarının; virüslere ve çeşitli ajanlara karşı hassas oldukları bilinmektedir. Sağlık alanına bakıldığında, biyofilm yapısında bulunan bakterilerin konak savunma sistemlerine direnç gösterebildikleri ve planktonik formlarına karşı dezenfektanlara ve tedavide kullanılan ilaçlara 100 kata kadar daha dirençli oldukları bilinmektedir (24). Bununla birlikte, biyofilm yapısında bulunan ve koruyucu bir kalkan görevi gören ekzopolisakkarit yapı, insan ve hayvan savunma sisteminde yer alan makrofajların, bakteri hücrelerini fagosite etmelerine de engel olur (32).
- Besin eldesi: Biyofilm yapısında yer alan ve geçirgen olan su kanalları, yapının içerisinde bulunan mikroorganizmaları çepe çevre sarmakta ve ortamda bulunan besinlerin yapıdaki mikroorganizmalar arasında orantılı olarak dağıtılmasını sağlamaktadır. Bu su kanalları besin maddelerinin dağıtılmasının yanı sıra, ortamda biriken ve mikroorganizmalar için toksik olan atık maddelerin de uzaklaştırılmasına olanak verir (33).
- Biyofilm yapısında bulunan bakteriler, mobil genetik elemanlar sayesinde birbirlerinden yeni özellikler kazanırlar. Bu yeni kazanılan özelliklere verilebilecek en güzel örneklerden biri, antibiyotik direnç genlerinin biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar arasında kazanımı sonucunda çoklu ilaç direncine sahip organizmaların çoğalmasdır. Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar EPS

yapısı içerisinde sıkıca paketlenmeleri için, konjugasyon ile gen aktarımı da daha kolay olmaktadır (25).

Biyofilm yapısı rastgele oluşmamaktadır. Bu yapılar, yakın ya da uzak akraba bakteri türlerinin bir amaç için bir araya geldiği yapılardır (10). Canlı sistemlerdeki biyofilm yapılarına en iyi örneklerden biri sığır bağırsaklarındaki biyofilm yapısıdır. Sığırların selülozu sindirmesine, bağırsaktaki biyofilm yapısında bulunan en az 5 farklı türdeki bakteri yardımcı olur. Bakteriler selülozu yıkmak için biyofilm yapısında birlikte hareket ederler. Biyofilm ve selüloz arasındaki bölgede, selülozu glukozla dönüşümünü sağlayan *Fibrobacter succinogenes* yer alır. Glukoz oluşturulduktan sonra *Butyirivibrio* bakterisi glukozu butirata dönüştürür. Daha sonra biyofilm yapısında yer alan ve farklı türlerdeki bakteriler tarafından butirat, asetata çevirilir. En sonunda ise özel metanojenik bakteriler asetatı metana dönüştürülür. Biyofilm yapısında bulunan bir bakteri kolonisi için artık olarak görülen bir madde, bir başka bakteri kolonisi için besin görevi görmektedir. Metanojenik bakteriler açısından oksijenin toksik etkisi vardır. Dolayısıyla, biyofilm yapısındaki metanojenik bakterilerin canlı kalabilmeleri için, oksijenin toksik etkisinden korunmaları zorunludur. Biyofilm yapısında bulunan bir başka bakteri tarafından metanojenik bakterilerin oksijenin toksik etkisinden korunduğu bilinmektedir. Bu tür hücrel etkileşimlerin tesadüfen ortaya çıkması olası değildir. Mikroorganizmaların bir arada yaşamak için geliştirdikleri yollar olduğu anlaşılmaktadır (10).

2.6. ENTEROKOKLARIN BİYOFİLM OLUŞTURMASINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Enterokoklar, antimikrobiyal direnç ve yatay gen transfer özellikleri nedeniyle tıbbi açıdan tehlikeli bakterilerdir (34–36). Enterokokların biyofilm oluşturmada rol alan faktörler henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, çoğu bilim insanı tarafından araştırılmaktadır (37).

E. faecalis' in de içinde yer aldığı G(+) bakterilerde, karbonhidrat metabolizması biyofilm oluşumunu düzenleyebilir (38,39). *E. faecalis* bakterisi, hiç glukoz içermeyen bir ortamda (Tryptic Soy Broth) (TSB) geliştirildiğinde biyofilm yapısı oluşturmazken, gelişme ortamına %1 glukoz ilavesi ile biyofilm oluşturma özelliği gösterdiği belirlenmiştir (40). Bir başka çalışmada ise tam tersi bir bulgu elde edilmiş, bakterinin gelişme ortamında glukoz bulunmazken biyofilm üretim özelliği gösteren *E. faecalis* bakterisinin biyofilm

oluşturma oranı, glukoz konsantrasyonunun %0.2' ye yükseltilmesiyle azalmıştır (41). Oldukça yüksek sayıda örnekle, 61 adet *E. faecium* klinik izolatu ile gerçekleştirilen bir başka denemede ise, glukoz konsantrasyonu %0.25'ten %1'e yükseldiğinde izolatların biyofilm üretim oranları artmış fakat, glukoz konsantrasyonu %1.25'e çıkartıldığında ise suşların biyofilm üretim düzeyleri düşmüştür. Aynı çalışmada suşların optimum biyofilm üretiminin %1 glukoz varlığında ve 48 saat inkübasyon sonucunda gerçekleştiği belirlenmiştir (42).

E. faecalis' in biyofilm oluşturmasını etkileyen bir diğer faktör de ortamın ozmotik basıncının değişimidir. Gelişme ortamının ozmolaritesinin yüksek olması (%2-3 NaCl) halinde *E. faecalis*' in gelişmesinde bir değişim olmamakta ancak biyofilm oluşumu olumsuz etkilenmektedir. Sonuç olarak, *E. faecalis* türünün, ortamda gerçekleşen değişiklikleri çeşitli sinyallerle kontrol ettiği ve buna bağlı olarak biyofilm oluşumunu düzenlediği saptanmıştır (41).

2.7. ENTEROKOKLARIN ESP PROTEİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMADAKİ ROLÜ

esp geninin ürünü olan Esp proteini 202 kDa büyüklüğünde bir proteindir ve hücre yüzeyinde yer almaktadır. Esp proteini son derece korunmuş geniş bir dizi A ve C tekrar bölgelerden ve N ve C terminal bölgelerinden oluşmaktadır. A tekrar bölge sayısı 1-3 arasında ve C tekrar bölge sayısı 4-10 arasında değişkenlik göstermektedir. C tekrar bölgenin görevi henüz tam olarak tanımlanmamıştır, A tekrar bölgesinin ise biyofilm oluşumunda etkili olmadığı belirlenmiştir. N-terminal kısmı tekrar bölge içermemekte ve 694 amino asitten oluşmaktadır. Yalnızca N-terminal bölgesinin bulunması halinde dahi, organizmaların biyofilm oluşturabildikleri, dolayısı ile yalnızca bu bölgenin biyofilm üretimi için yeterli olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirlense de, doğruluğu farklı araştırmacılar tarafından göstermediği için halen tartışma konusudur (43-45).

2.8. ENTEROKOKLARIN PİLİ YAPISININ BİYOFİLM OLUŞTURMADAKİ ROLÜ

Enterokoklarda Ace proteini, Esp proteini, Fsr proteini ve proteaz biyofilm oluşumunda rol alırlar. Bir yüzeye tutunmuş halde bulunan ve EPS içine gömülmüş olan bakteriler, yüksek antibiyotik direncine, yavaş üreme oranına ve yüksek yatay gen transferi özelliğine sahiptir (46). Enterokoklar sahip oldukları piluslarla konakçı dokularına bağlanabilir. Bu doğrultuda konakçı hücrelerine sıkıca tutunması için yukarıda saydığımız proteinler kullanılmaktadır (47,48).

2.9. ENTEROKOKLARDA *gelE* GENİNİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ

E. faecalis jelatinazı (GelE), kollajen, jelatin ve kazein hidrolize edebilen bir ekstraselüler çinko metaloproteazdır. Jelatinaz ve serin proteaz (SprE) *fsr* lokusu tarafından kodlanan ve quorum-sensing sistemi tarafından regüle edilen *gelE-sprE* operonunda kodlanmaktadır (49). Peritonit (karın zarı iltihabı), endokardit (50), endoftalmit (göz iltihabı) (51) ve *in vitro* translokasyon modellerinde kuvvetli bir şekilde virülansda etkisi olan jelatinazın, biyofilm oluşumunda da yüksek etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (41,52,53).

2.10. ENTEROKOKLARDA *fsr* GENİNİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ

Enterokoklarda bulunan *fsr* lokusu, stafilokokların *agr* lokusuyla homologdur. *E. faecalis* *fsr* lokusu: *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC* olarak tanımlanan üç geni içerir. *fsrC*' nin alt sentez yönünde, jelatinaz (metalloproteaz) için kodlayan *gelE* ve serin proteaz için kodlayan *sprE* olan iki ORF' dir (54). Bu lokus virülansın ve metabolizmanın global regülatörüdür (55). Ayrıca bu bölge *E. faecalis*'de jelatinaz ve serin proteazın ifadesi için bir pozitif regülatör olmasının yanı sıra, *fsrB* ve *fsrC* genlerinin ifadesi için bir oto regülatördür (54). *E. faecalis*'in diğer genleri olan *epa*, *atn* (56), *bop* (57), *salA* ve *salB* (58) biyofilim oluşumunda etkili oldukları gösterilmiştir. Birçok patojende biyofilm üretiminin, quorum-sensing sistemi tarafından düzenlendiği görülmüştür. Bu kapsamda *E. faecalis*' in biyofilim oluşumunda *fsr*' nin belirgin bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (38,52,56).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Biyofilm biyolojik bir oluşumdur ve değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (Extracellular polymeric substances-EPS) içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden; çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan mikroorganizmalardan oluşmaktadır (11). Biyofilmin üç boyutlu yapısına bakıldığında, EPS ile çevrelenmiş olup, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakalarını içerdiği görülmektedir (18).

Biyofilm oluşumu bakterilerin canlı ya da cansız yüzeylere tutunmasını gelişme ve olgunlaşmanın takip ettiği dinamik bir süreçtir. Yapısal olarak biyofilmler tek ya da birden fazla türden oluşan mikrobiyel komitelerin hücre dışı polimerik yapılar tarafından kaplanması sonucunda oluşmaktadır. Biyofilm yapıları, bakterilere çevresel koşullara dayanıklı olmaları konusunda büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu yapılar biyofilm içerisindeki bakterilere, planktonik büyüme gösteren bakterilere kıyasla antimikrobiyel ajanlara karşı direnç ve konakçı bağışıklık sistemlerinden kaçınmalarını sağlamak başta olmak üzere çeşitli avantajlar sunmaktadır.

Enterokoklar; ağız florasında, insan ve hayvanların genital sisteminde ve bağırsak florasında doğal olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir. Ayrıca, üriner sistem, dolaşım sistemi, karın içi ve pelvik sistemler ve merkezi sinir sistemini enfekte etme özelliği olan yaygın nazokomiyal ajanları oldukları da bilinmektedir (3,59). Genelde gıdalarda enterokokların bulunması fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda enterokokların gıdaların organoleptik özelliklerine katkıda bulunması, patojenlere karşı bakteriyosin üretme yetenekleri ve probiyotik özellikleri nedeniyle, peynir gibi çeşitli gıdaların üretiminde starter ve koruyucu kültür olarak kullanılmaya başlanılmışlardır. Pastörizasyon sıcaklıklarına gösterdikleri direnç ile ekstrem pH değerleri ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi farklı gelişme şartlarına kolayca adapte olabilmeye yetenekleri nedeniyle, hem çiğ materyalde hem de pastörize edilmiş ürünlerde yaygın olarak bulunurlar. Bu nedenle fermente edilmiş ürünlerde, özellikle de peynirde mikrofloranın önemli kısmını oluştururlar (1). Enterokoklar, lipolitik ve proteolitik aktiviteleri ile peynirin olgunlaşması sırasında tat ve aroma oluşumunda önemli etkiye sahiptirler. Fakat birçok antibiyotiğe karşı direnç

göstermeleri, gıdalara ilavelerini sınırlamaktadır. Bu nedenle peynir üretiminde kullanılacak olan enterokokların güvenilirliklerinin ispatı için, suşların ayrıntılı incelenmesi zorunludur (2).

Enterokoklar önemli enfeksiyonlara neden oldukları için pek çok araştırmacı tarafından ilgi odağı haline gelmiştir. Ancak, patojenite mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. *Enterococcus faecalis* için hemolisin/ bakteriyosin, agregasyon özelliği (AS), jelatinaz, enterokokal yüzey proteini (Esp), endokarditis ilişkili antijen (EfaA) ya da kapsüler polisakkaritlerin her biri olası virülens faktörler olarak değerlendirilmektedir (60,61). Çeşitli çevresel faktörlerin de biyofilm oluşumu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın da hedefi olan genetik ve çevresel faktörlerin biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin aydınlatılması, enterokokal biofilm yapılarının oluşumunun önüne geçilmesinde izlenmesi gereken yolların belirlenmesini sağlayacaktır.

Türkiye kaynaklı peynir örneklerinden izole edilen enterokok örnekleri ile gerçekleştirilen bu çalışmada, insan sağlığı üzerinde önemli ve tehlikeli etkileri olan biyofilm yapılarının incelenmesi planlanmıştır. Patojenlerin oluşturduğu biyofilm yapılarının büyük halk sağlığı riski oluşturacağı açıktır. Gıda hijyeni ve halk sağlığı açısından, gıda mikroflorasına ham madde ve personel yoluyla biyofilm oluşturma özelliğindeki mikroorganizmaların katılması büyük risk etkenidir. Türkiye kökenli peynir örneklerinden izole edilen *Enterococcus* cinsi üyeleri ile daha önce gerçekleştirilmemiş olan bu çalışma, özgünlüğü açısından da önem taşımaktadır.

esp genin ürünü olan Esp proteinin Enterokokal biyofilminde rolü tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda Esp proteinin ve biyofilm oluşumunu ilişkilendirilirken (45), bazı çalışmalarda ise *esp* genin varlığının biyofilm oluşumu için zorunlu olmadığı sonucuna varılmıştır (41,62). Doktora tezi kapsamında yaptığımız çalışmalarda, *esp* genin N-terminal bölgesini uygun vektör aracılığı ile klonlanmış ve biyofilm üretim sürecindeki rolü araştırılmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. BAKTERİLER

Çalışmada kullanılan, 33 adet *Enterococcus faecium* (Çizelge 4.1) ve 15 adet *Enterococcus faecalis* (Çizelge 4.2) suşları ve kontrol suşu olarak kullanılan *Enterococcus faecalis* ATCC29212 ve *Enterococcus faecalis* OG1RF Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı bünyesinde oluşturulan kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Stok kültürler -80 °C’de %15 gliserol ilave edilen Tryptone Soy Broth (TSB) sıvı besi ortamında saklanmıştır. Biyofilm çalışması süresince kullanılan kültürler, TSB besi ortamında 37 °C’de 1 gece geliştirildikten sonra denemeye alınmıştır.

Çizelge 4. 1. *Enterococcus faecium* izolatları

Suşun Cinsi	Suşun Kodu	Suşun Cinsi	Suşun Kodu	Suşun Cinsi	Suşun Kodu
<i>E. faecium</i>	1	<i>E. faecium</i>	13	<i>E. faecium</i>	36
<i>E. faecium</i>	2	<i>E. faecium</i>	14	<i>E. faecium</i>	60
<i>E. faecium</i>	3	<i>E. faecium</i>	15	<i>E. faecium</i>	61
<i>E. faecium</i>	4	<i>E. faecium</i>	16	<i>E. faecium</i>	71
<i>E. faecium</i>	5	<i>E. faecium</i>	17	<i>E. faecium</i>	77
<i>E. faecium</i>	6	<i>E. faecium</i>	20	<i>E. faecium</i>	101
<i>E. faecium</i>	7	<i>E. faecium</i>	21	<i>E. faecium</i>	106
<i>E. faecium</i>	8	<i>E. faecium</i>	22	<i>E. faecium</i>	110
<i>E. faecium</i>	9	<i>E. faecium</i>	23	<i>E. faecium</i>	134
<i>E. faecium</i>	10	<i>E. faecium</i>	24		
<i>E. faecium</i>	11	<i>E. faecium</i>	25		
<i>E. faecium</i>	12	<i>E. faecium</i>	29		

Çizelge 4. 2. *Enterococcus faecalis* izolatları

Suşun Cinsi	Suşun Kodu	Suşun Cinsi	Suşun Kodu
<i>E. faecalis</i>	64	<i>E. faecalis</i>	82
<i>E. faecalis</i>	72	<i>E. faecalis</i>	114
<i>E. faecalis</i>	73	<i>E. faecalis</i>	117
<i>E. faecalis</i>	74	<i>E. faecalis</i>	119
<i>E. faecalis</i>	78	<i>E. faecalis</i>	122
<i>E. faecalis</i>	79	<i>E. faecalis</i>	139
<i>E. faecalis</i>	80	<i>E. faecalis</i>	140
<i>E. faecalis</i>	81		

4.1.2. BESİYERLERİ

M17 Broth (Merck, Germany)	
Polipepton	5 g
Fitopepton	5 g
Maya ekstraktı	2.5 g
Et ekstraktı	5 g
B-disodyum gliserofosfat	19 g
Laktoz (%10)	50 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mL
Askorbik asit	0.5 g
Destile su	950 mL
pH 7.15 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)	

Ortam içerikleri son hacim 950 mL olacak şekilde destile su içerisinde çözülür ve 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilir. Ortam su banyosunda 45 °C’ye soğutulduktan sonra içerisine, ayrı sterilize edilen 50 mL laktoz çözeltisi ilave edilir.

Trypton Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)	
Pepton (Kazein’ den)	17 g
Pepton (Soya’ dan)	3 g
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	2.5 g
D(+)-Glukoz	2.5 mL
NaCl	5 g
Destile su	1000 mL
pH 7.3 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)	

Ortam içerikleri son hacim 1000 mL olacak şekilde destile su içerisinde çözülür ve 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilir.

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)	g/L
Tripton (Fluka,France)	10
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5
Sodyum klorid (Merck, Germany)	10
Agar (Merck,Germany)	15

Besiyeri içerikleri steril su ile 1000mL'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan broth besiyeri cam tüplere dağıtılır ve sterilizasyon işlemi otoklavda (121 °C 'de 15 dk) yapılır. Katı besiyeriler için, 15 gram agar ilave edildikten sonra sterilizasyon işlemi gerçekleştirilip besiyeri steril petrilere dökülür.

Luria Bertani (LB) Broth (NaCl'siz)	g/L
Tripton (Fluka,France)	10
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5
Agar (Merck,Germany)	15

Besiyeri içerikleri steril su ile 1000mL'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan broth besiyeri cam tüplere dağıtılır ve sterilizasyon işlemi otoklavda (121 °C 'de 15 dk) yapılır. Katı besiyeriler için, 15 gram agar ilave edildikten sonra sterilizasyon işlemi gerçekleştirilip besiyeri steril petrilere dökülür.

4.1.3. ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotik duyarlılık deneylerinde kullanılan 11 antibiyotik Sigma (Oxoid, UK) firmasından temin edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

Antimikrobiyal Madde	Sembol	Grubu
Ampisilin	AMP	β -laktam
Streptomisin	STR	Aminoglikozid
Nalidiksik Asit	NAL	Kinolon
Kanamisin	KAN	Aminoglikozid
Gentamisin	GEN	Aminoglikozid
Kloramfenikol	CHL	Fenikol
Tetrasiklin	TET	Tetrasiklin
Rifampisin	RIF	Ansamisin
Vankomisin	VAN	Glikopeptid
Eritromisin	ERT	Makrolid
Siprofloksasin	CIP	Florokinolon

4.1.4. ÇÖZELTİLER

Fosfatla Tamponlanmış Tuz (PBS)	
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

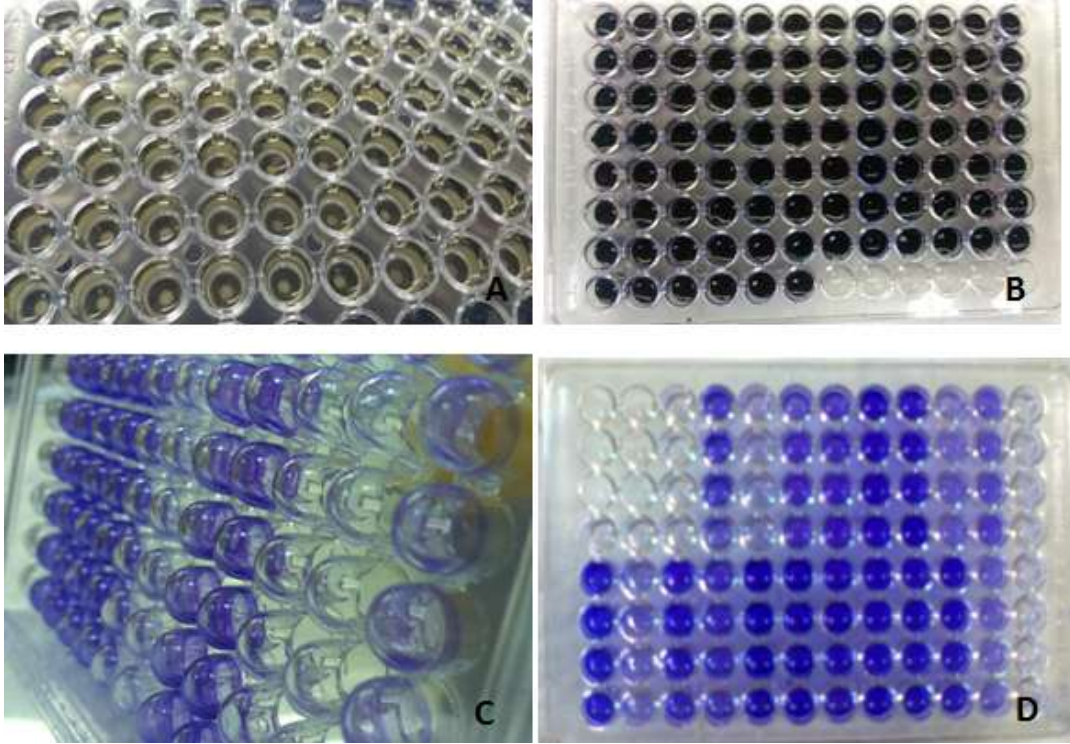
Alkol/Aseton Çözeltisi	
Saf etanol	80 mL
Aseton	20 mL

4.2. YÖNTEM

4.2.1. İZOLATLARIN FARKLI İNKÜBASYON SÜRELERİNDE ÜRETTİKLERİ BİYOFİLM YAPILARININ BELİRLENMESİ

Enterococcus cinsi üyelerinin biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılmasında Extremina ve arkadaşları (2011) tarafından önerilen mikrodilüsyon plak yöntemi kullanılmıştır (63). Trypton soy broth (TSB) ortamında 18 h geliştirilen aktif kültürlerden 200 μ L (10^8 CFU) alınarak 96 kuyulu mikrodilüsyon plaklarına inoküle edilmiş (Şekil 4.1.A) ve 37 °C' de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde biyofilm yapısına

katılmayan planktonik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile kuyular 3 kez PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanmış ve 60 °C’de 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Biyofilm yapısının fikse edilmesi amacı ile kuyulara 200 µL %95’lik etanol ilave edilerek 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde kuyulara 200 µL kristal viyole eklenerek (Şekil 4.1.B) 20 dk boyama basamağını takiben tutunmayan boyanın uzaklaştırılması için dH₂O ile yıkanmıştır (Şekil 4.1.C). Biyofilmin içinde tutulan boya kuyulara 200 µL etanol/aseton (%80/%20, v/v) ilave edilerek çözülmüştür (Şekil 4.1.D). Test edilen bakteri örnekleri tarafından üretilen biyofilm miktarını belirlemek amacıyla Elisa Reader (Molecular Devices SpectraMax M2 Microplate Reader, USA) cihazıyla 595 nm dalga boyunda okumalar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Mikrodilüsyon plak yönteminin aşamaları.

A: Bakterilerin mikrodilüsyon plaklarına aktarılması B: Oluşan biyofilm yapısının kristal viyole ile boyanması C: Mikrodilüsyon plak üzerinde oluşan biyofilm yapısının boyama sonrası görüntüsü D: Biyofilm içinde tutunan kristal viyole boyasının alkol-aseton karışımı ile çözülmesi.

4.2.2. ENTEROKOKLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN BİYOFİLM YAPILARININ MORFOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

İzolatların morfotiplerinin belirlenmesi için, biyofilm üreticisi olan suşlar TSB besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C’ de 18 h inkübasyona bırakılmıştır. Bu aktif kültürlerden, 20 µL alınarak Kongo kırmızı ilave edilen Trypton soy agar (TSA) besiyerine damlatma ekimler yapılmış ve 5 gün boyunca 37 °C’ de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Beş günün sonunda oluşan biyofilm yapıları stereo mikroskop (Leica EC3) altında incelenmiş ve fotoğrafları alınmıştır.

4.2.3. ENTEROCOCCUS CİNSİ ÜYELERİNİN JELATİNAZ ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Örneklerin jelatinaz üretim özelliklerinin araştırılmasında Creti ve arkadaşları (2004) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (64). Aktif kültürler TSA besi ortamında tek koloni oluşturacak şekilde ekim yapıldıktan sonra, steril kürdan yardımıyla alınan tek koloni %1.5 oranında yağsız süt tozu içeren TSA ortamına inoküle edilerek 18 h boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde koloniler, etraflarında berrak zonun olup olmaması bakımından incelenmiştir. Etrafında berrak zon belirlenen koloniler jelatinaz üretimi bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.2.4. FARKLI GLUKOZ KONSANTRASYONLARININ *E. faecalis* VE *E. faecium* ÖRNEKLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

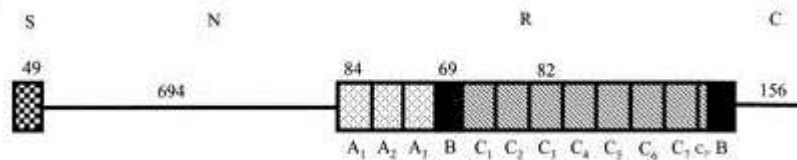
Glukozun biyofilm oluşumu üzerinde etkili faktörlerden biri olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (40,41). Ancak biyofilm üretimi üzerine etkili glukoz düzeyi suşlar arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle, çalışmamızda izolatlarımızın hangi glukoz konsantrasyonunda maksimum biyofilm üretim düzeyine ulaştıklarını belirlemek amacı ile denemeler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları TSB besiyerine %1 oranında ekim yapılarak 18 h süresince 37 °C inkübe edilmiştir. Aktif kültürlerin OD’ leri 570 nm dalga boyunda 0.07’ ye ayarlandıktan sonra (10⁸ CFU olacak şekilde) 200’er µL alınarak, farklı

oranlarda (%0.5, %1, %1.5 ve %2) glukoz içeren TSB ortamlarının bulunduğu 96 kuyulu mikrodilüsyon plaklarına inoküle edilmiştir. 37 °C’ de 48 h inkübasyon sonrasında biyofilm yapısına katılmayan planktonik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması amacı ile kuyular 3 kez PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanıp, 60 °C’de 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Biyofilm yapısının fikse edilmesi için kuyulara 200 µL %95’lik etanol ilave edilerek 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde kuyulara 200 µL kristal viyole aktarılmıştır ve 20 dk boyama basamağını takiben tutunmayan boyanın uzaklaştırılması için dH₂O ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Biyofilm yapısında tutulan boya, kuyulara 200 µL etanol/aseton (%80/%20, v/v) ilave edilerek çözülmüştür. Test edilen bakteri örnekleri tarafından üretilen biyofilm miktarını belirlemek amacıyla Elisa Reader (Molecular Devices SpectraMax M2 Microplate Reader, USA) cihazıyla 570 nm dalga boyunda okumalar gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucunda değerlendirmeler yapılırken $OD \leq 2$ olan örnekler güçlü biyofilm üreticisi, $1 \leq OD < 2$ olan örnekler orta düzeyde biyofilm üreticisi ve $0.5 \leq OD < 1$ olan örnekler zayıf düzeyde biyofilm üreticisi olarak değerlendirilirken, $OD \leq 0.5$ olan örnekler ise biyofilm üreticisi olmayan örnekler şeklinde değerlendirilmiştir.

4.2.5. ÖRNEKLERDE *esp* GENİNİN ARAŞTIRILMASI

esp geninin, Türkiye kaynaklı peynir örneklerinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* örneklerinde var olup olmadığının araştırılması amacı ile *esp* gen (Şekil 4.2) dizisine özgü primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 farklı primer çifti *esp*11-*esp*12, *esp*2-*esp*5 ve *esp*46-*esp*47 (Çizelge 4.4) kullanılarak enterokok izolatlarından saflaştırılan DNA örneğinde *esp* geninin varlığının araştırılması çalışmaları ile eş zamanlı olarak tekrar sayılarındaki farklılıklar incelenmiştir.



Şekil 4.2. Esp proteininin yapısı.

Salgi sinyali (S), N-terminal (N) ve C-terminal (C) bölgeleri gösterilmiş Bölgeler üzerinde bulunan numaralar her bir segmentteki amino asit sayısını göstermektedir (65).

Reaksiyonlarda kalıp olarak kullanılan DNA örneklerinin izolasyonunda DNA ekstraksiyon kiti (İnvitrogen, USA) kullanılmıştır. Saflaştırılan DNA örneğinin 2.5 µL'si (~100 ng/µL) reaksiyonda kalıp olarak kullanılmıştır. PZR denemeleri Solis Hot FirePol DNA Polimeraz (Solis, Estonya) enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde hazırlanmıştır. Her primer çifti için hazırlanan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları ise Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de belirtilmiştir. Çalışmada kullandığımız esp primerlerinin gen dizisi üzerinde bağlandığı bölgeler EK 1'de gösterilmiştir. esp 46 ve esp 47 primerleri sırası ile 2256-2279 ve 3169-3192'nci nükleotitlere (nt) homologtur ve A tekrar bölgesinin çoğaltılması için kullanılır. esp 2 ve esp 5 primerleri *esp* geninin 3254-3275 ve 5338-5358'inci nükleotitlerine homologtur ve C tekrar bölgelerinin çoğaltılmasında görev alır. Son olarak esp 11 ve esp 12 kodlu primerler *esp* geninin N-terminal bölgesinde bulunan sırasıyla 1217-1238 ve 2149-2171'inci nükleotitleri ile homoloji göstermiştir. PZR denemeleri sonrasında istenilen bölgelerin çoğaltılıp çoğaltılmadığı agaroz jel elektroforezi sonucunda belirlenmiştir. Bu amaçla 5 µL PZR ürününü 1 µL 6x yükleme boyası (Fermentas) ile karıştırılarak %1'lik agaroz jelde 120 voltaj akımda 90 dk süreyle yürütülmüştür. EtBr ile boyanan jeller 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışıkta incelenmiş ve KODAK jel görüntüleme (KODAK-Image station-4000mm/U.S.A) kullanılarak fotoğrafları alınmıştır. Bant büyüklüklerinin hesaplanmasında 1 kb DNA ladder (Solis Biodyne ve Fermentas)'dan yararlanılmıştır.

Çizelge 4. 4. *esp* geninin varlığının araştırılmasında kullanılan primer çiftleri

Primer Adı	Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü	Kaynak
esp 11	5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3'	936 bp	Shankar vd. 1999
esp 12	5'-CGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'		
esp 2	5'-CAGATGGATCATCTGATGAAGT-3'	2105 bp	Shankar vd. 1999
esp 5	5'-GTAACGTTACTGTTACATCTGC-3'		
esp 46	5'-TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC-3'	954 bp	Shankar vd. 1999
esp 47	5'-CCAAGTATACTTAGCATCTTTGG-3'		

Çizelge 4. 5. esp 11-12 primer çifti ile yapılan PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PZR koşulları		Reaksiyon karışımı (50 µL)	
94 °C	5 dk	Nükelaz içermeyen su	31.5 µL
94 °C	2 dk	Tampon (10 X)	5 µL
56 °C	2 dk	dNTP mix (10mM)	2 µL
72 °C	2 dk	F (20 pmol)	2 µL
		R (20 pmol)	2 µL
		MgCl ₂ (25mM)	4 µL
92 °C	15 sn	Taq polimeraz (5U/µL)	0.5 µL
56 °C	15 sn	Kalıp DNA	3 µL
72 °C	15 sn		
72 °C	10 dk		

Çizelge 4. 6. esp 2-5 primer çifti ile yapılan PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PZR koşulları		Reaksiyon karışımı (50 µL)	
94 °C	5 dk	Nükelaz içermeyen su	36.25 µL
94 °C	2 dk	Tampon (10 X)	5 µL
60 °C	2 dk	dNTP mix (10mM)	1 µL
72 °C	2 dk	F (20 pmol)	1 µL
		R (20 pmol)	1 µL
		MgCl ₂ (25mM)	3 µL
92 °C	15 sn	Taq polimeraz (5U/ µL)	0.25 µL
60 °C	15 sn	Kalıp DNA	2.5 µL
72 °C	15 sn		
72 °C	10 dk		

Çizelge 4.7. esp 46-47 primer çifti ile yapılan PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PZR koşulları		Reaksiyon karışımı (50 µL)	
95 °C	2 dk	Nükelaz içermeyen su	36.25 µL
94 °C	45 sn } 45 sn } 4 dk } 10 dk } 1 döngü	Tampon (10X)	5 µL
57 °C		dNTP mix (10mM)	2 µL
72 °C		F (20 pmol)	2 µL
72 °C		R (20 pmol)	2 µL
72 °C		MgCl ₂ (25mM)	3 µL
		Taq polimeraz (5U/ µL)	0.25 µL
		Kalıp DNA	2.5 µL

4.2.6. ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ENTEROKOKAL BİYOFİMLER ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Suşların antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi için minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) denemeleri yapılmıştır. Denemeye alınan bakteriler Muller Hinton Broth (MHB) besiyeri ortamında 37 °C' de 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerin hücre yoğunlukları MHB besiyeri ile McFarland 0.5 (10⁸ hücre/ml) düzeyine ayarlanmıştır ve yine aynı besi ortamı kullanılmak suretiyle 1:100 oranında seyreltilerek 10⁶ hücre/ml içeren bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. MIC değerlerinin tespit edilebilmesi için 96 kuyucuklu mikropklarda mikrodilüsyon denemesi, Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI) (2008) M27-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; 100 µl MHB besiyerini içeren kuyuların ilk sırasına her antibiyotik için son konsantrasyon 2048 µg/mL olacak şekilde 4096 µg/mL stok solüsyonundan eklenmiştir. İlk kuyudan 100 µl örnek alınarak bir sonraki kuyuya aktarılmıştır. Bu işlem ardışık her kuyu için tekrarlanarak seri dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Dilüsyon sonrasında tüm kuyucuklara 10 µl bakteri süspansiyonu (10⁶ hücre/ml) eklenerek 37 °C' de 18 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası üremenin inhibe olduğu kuyudan bir önceki antibiyotik miktarı MIC değeri olarak tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık deneylerinde kontrol olarak standart suş *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır.

Biyofilm üreticisi olan izolatların MBIC (Minimum Biofilm Inhibition Concentration) değerlerini belirlemek için, aktif kültürlerin OD'lerini 595 nm dalga boyunda 0.07'ye ayarlanmıştır. Ardından her bir örnek için 96 kuyulu mikrodilüsyon plağının 1-11 numaralı sütündeki kuyularına 200 µL bakteri örneği ilave edilirken, her plağın 12 numaralı sütündeki kuyularına bakteri örneği içermeyen 200 µL steril besiyeri aktarılmış ve bu kuyular ileri basamaklarda negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Mikrodilüsyon plakları Peg (Innovotech, Kanada) ile kapatıldıktan sonra 24 saat boyunca 37 °C' de ve 170 rpm çalkalama hızında ikübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde, pegler üzerindeki biyofilm yapısına katılmayan planktonik hücrelerin yıkama ile uzaklaştırılması için, peg sistemi; kuyularında 200 µL PBS bulunan mikrodilüsyon plakasının kuyularına biyofilm yapısı üzerine etkisinin araştırılacağı antibiyotikler MHB besi ortamı farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve peg bu plakaya aktarılmıştır. 18-24 saat (Kullanılan antibiyotiğe bağlı olarak inkübasyon süresi değerlendirilmektedir) süresince statik koşullarda 37 °C'de inkübasyonun sonunda pegler daha önce belirlenen şekilde yıkanmış ve ardından pegler kuyularında 200 µL TSB içeren mikrotiter plakaya aktarılmıştır. 18-20 saat inkübasyonun sonunda yapılan değerlendirmeler sonrasında üremenin inhibe olduğu kuyudan bir önceki kuyudaki antibiyotik konsantrasyonu MBIC değeri olarak belirlenmiştir (66).

4.2.7. HÜCRE YÜZEYİ HİDROFOBİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Hidrofobisite, bakterilerin yüzeylere tutunmasında önemli rol oynamaktadır. Hidrofobisitenin belirlenmesinde, su temas açılarının ölçümü veya bakterilerin organik çözücü içerisine geçişine dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda, bakteriyel hücre yüzeyi hidrofobisitesinin belirlenmesinde Rosenberg vd. (1981) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (28). 37 °C' de %0.75 glukoz içeren TBS besi ortamında bir gece geliştirilen bakteri örnekleri 5 mL taze hazırlanmış besi ortamı kullanılarak 1:50 oranında seyreltilmiştir ve 37 °C' de 4 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Logaritmik faza ulaşan örnekler santrifüj uygulaması sonrasında (6000 rpm' de 10 dk) iki defa PUM tamponu (22.2 g potasyum fosfat trihidrat, 7.26 g monobazik potasyum fosfat, 1.8 g üre ve 0.2 g magnezyum sülfat heptahidrat/litre [pH 7.1]) ile yıkanmıştır. Santrifüj basamağı sonucunda oluşan pellet, 5 mL PUM tamponu içerisinde çözülmüştür. Bu aşamada örneklerin optik yoğunlukları 400 nm dalga boyunda ölçülmüş ve elde edilen bu değerler "Başlangıç OD" olarak kaydedilmiştir. Bir sonraki basamakta örneklerin optik

yoğunlukları $OD_{400} = 0.9-1.1$ arasına ayarlanmıştır. Optik yoğunlukları ayarlanan örneklerden 3 mL alınarak örnek üzerine 600 μ L n-hekzadekan eklenmiş ve 2 dk yüksek devirde karıştırma basamağını takiben organik ve sıvı fazın ayrılması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Üstte kalan sıvı fazın optik yoğunluğu 400 nm dalga boyundaki ışık altında ölçülmüş ve bu değer “Son OD” olarak kaydedilmiştir. Test edilen örneklerin % hücre yüzeyi hidrofobisitesinin belirlenmesinde aşağıda belirtilen formülden yararlanılmıştır.

$$\% \text{ Hücre yüzeyi hidrofobisitesi} = [1 - (\text{Son } OD_{400} / \text{Başlangıç } OD_{400})] \times 100$$

4.2.8. KLONLANACAK ESP PROTEİNİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

esp' geninin N-terminal domainine ait bir fragment *esp-1* (5'- ATG GGA ACG CCT TGG TATG-3') ve *esp-2* (5'- TAC TGC TAA ATC GGT CGTG-3') primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır (65). PCR denemeleri Solis Hot FirePol DNA Polimeraz (Solis, Estonya) enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.8). Elde edilen PCR ürünü 6.5 μ L EtBr içeren %2'lik agaroz jelde 1h 100 V akımda yürütüldükten sonra istenilen büyüklükte bantın elde edilip edilmediğinin görülebilmesi için 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında incelenmiştir.

Çizelge 4.8. *esp 1-2* primer çifti ile yapılan PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

PZR koşulları		Reaksiyon karışımı (30 μ L)	
95 °C	13 dk	Nükelaz içermeyen su	19.06 μ L
95 °C	30 sn	Tampon (B1)	3.3 μ L
55 °C	30 sn	dNTP mix (10mM)	1 μ L
72 °C	1 dk	F (20 pmol)	1 μ L
72 °C	15 dk	R (20 pmol)	1 μ L
		MgCl ₂ (25mM)	3 μ L
		Taq pol (5U/ μ L)	0.66 μ L
		Kalıp DNA	3 μ L

4.2.9. ÇOĞALTILAN *esp* GENİN N-TERMINAL BÖLGESİNİN DNA DİZİ ANALİZİ

esp 1 ve *esp* 2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR denemesi sonucunda elde edilen DNA fragmentleri, çoğaltılan fragmentin istenilen gen bölgesine ait olup olmadığının araştırılması amacı ile DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. Dizi analizi yapılacak olan DNA bantı jelden kesilerek saflaştırılmıştır (Roche/USA). Beckman Quick Start Kit' te bulunan DNA örneği (250 ng) kontrol olarak kullanılmıştır. Denatürasyon amacıyla PCR karışımını içeren tüpler 94 °C' da 3 dk inkübe edildikten sonra buz üzerine alınmıştır. Sekans PCR için hazırlanan 20 µL karışım ile dizi analizine tabi tutulacak olan örneklerin PCR basamağı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Sekans PZR denemesinde kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları

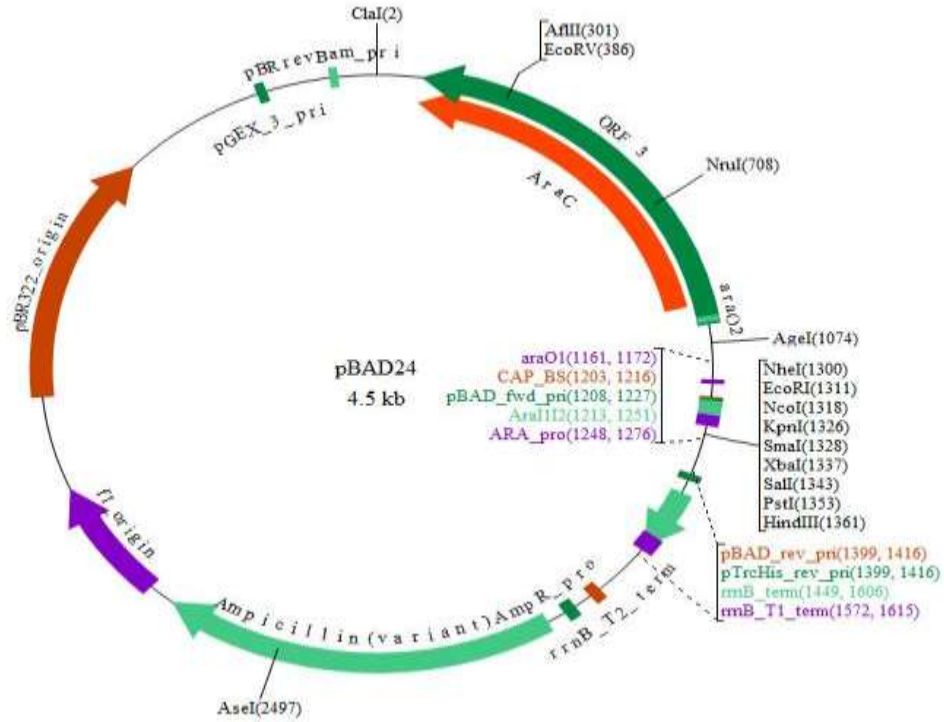
PZR koşulları		Reaksiyon karışımı (20 µL)	
96°C	20 sn	Nükelaz içermeyen su	10.5 µL
55 °C	20 sn	Premix	5.5 µL
60 °C	4 dk	Primer (1.6 pmol)	2 µL
		Kalıp DNA	2 µL

Saflaştırılan 20 µL PCR örneği ABgene plate alınıp üzerine aynı hacimde Agencourt aktarılmıştır. Taze hazırlanmış ve buzda soğutulmuş %85' lik etanolden 62 µL alınarak kuyular üzerine eklenmiş ve pipet yardımıyla karıştırılmıştır. ABgene plate SPRI (manyetik) plate üzerine yerleştirilmiş ve üst kısma bir ağırlık konularak 8 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca DNA'nın çepere yapışması sağlanmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kuyularda bulunan sıvı (yaklaşık 100 µL), tutunan DNA örneklerine dokunulmamasına dikkat edilerek uzaklaştırılmıştır ve ABgene plate SPRI plate'den kaldırılarak çepere tutunan DNA'nın geri kazanılması amacı ile 100 µL etanol kuyulara transfer edilmiştir. ABgene plate SPRI plate yerleştirilerek oda sıcaklığında 3 dk beklenmiştir. Süre sonunda kuyuların orta kısmında kalan etanol pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır ve kuyularda kalan etanolün tamamen uçmasını sağlamak amacıyla plate 10 dk boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Çepelerde bulunan DNA kuyulara 40 µL SLS ilavesi ile çözülüp Beckman plate aktarılmıştır ve Beckman coulter cihazı (GenomLab GeXP) ile dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

4.2.10. ESP PROTEİNİNİN N-TERMİNAL BÖLGESİNİN PBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI

Çoğaltılan *esp* geninin N-terminal bölgesi, ifadesinin arabinoz ile indüksiyonu yolu ile kontrolü amacı ile pBAD24 vektörüne klonlanmıştır (Şekil 4.3). Bu vektör 4.5 kb büyüklüğünde bir vektördür ve arabinoz tarafından indüklenebilen bir promotor içermektedir. *esp* ifadesinin teşviki ve takiben *esp* ifade düzeyindeki değişimlerin qRT-PZR ile izlenmesi ve biyofilm üretim düzeylerindeki değişim gözlenmesi denemelerinin ilk basamağını ilgili genin, pBAD24 vektörüne klonlanması oluşturmaktadır.

Bu amaçla ilk olarak restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içeren primerler kullanılarak çoğaltılan N-terminal gen bölgesi kesim ve klonlama işlemlerinden önce, PZR ürünü High Pure PCR product Purification Kit (Roche) ile saflaştırılmıştır. Ardından EcoRI (Fermantas) ve NheI (Fermentas) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile hem PZR ürünü hem de vektör kesilmiştir.



Şekil 4.3. pBAD24 vektör haritası (<http://www.biovisualtech.com/>)

pBAD24 vektörünün 1. kesim reaksiyonu

Tango Buffer (10X)	5 µL
NheI (Fermentas)	2.5 µL
pBAD24 (80ng)	30 µL
Nükleaz içermeyen su	12.5 µL
Toplam hacim	50 µL

16 h 37 °C’de inkübasyonun ardından 65 °C’ de 15 dk enzimin inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci enzim kesimi için ortama 2,5 µL EcoRI (Fermentas) enzimi ve 5 µL Tango Buffer eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübasyonun ardından 15 dk 65 °C’de inaktivasyon uygulanmıştır.

Kesim reaksiyonunun doğruluğu agaroz jel sisteminde kontrol edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan %0,7’lik jel kuyularına kesim ürünlerinden 5 µL yüklemiş ve 1h süre ile 100V akım uygulanmıştır. EtBr boyaması ardından 366 nm UV ışık altında jel incelenmiştir.

pBAD24 vektörünün 2. kesim reaksiyonu

NEB2 Buffer (10X)	5 µL
EcoRI (Fermentas)	2.5 µL
NheI-HF (BioLabs)	1 µL
pBAD24 (80ng)	30 µL
Nükleaz içermeyen su	11.5 µL
Toplam hacim	50 µL

Bir saat 30 dk, 37 °C’de inkübasyonun ardından 65 °C’ de 15 dk enzimin inhibisyonu gerçekleştirilmiştir.

Aynı işlemler *esp* N-terminal bölgesi PZR ürününün High Pure PCR Purification Kit (Roche) ile temizlendikten sonra yapılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünü EcoRI (Fermentas) ve NheI (Fermentas) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmiştir.

esp N-terminal bölgesi PCR ürününün 1. kesim reaksiyonu

Tango Buffer (10X)	5 µL
EcoRI (Fermentas)	2.5 µL
PCR ürünü (50ng)	21 µL
Nükleaz içermeyen su	21.5 µL
Toplam hacim	50 µL

16 h 37 °C’de inkübasyonun ardından 65 °C’ de 15 dk enzimin inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci enzim kesimi için ortama 2.5 µL NheI enzimi ve 5 µL Tango Buffer eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübasyonun ardından 15dk 65 °C’de inaktivasyon uygulanmıştır.

esp N-terminal bölgesi PCR ürününün 2. kesim reaksiyonu

NEB2 Buffer (10X)	5 µL
NheI-HF (BioLabs)	1 µL
EcoRI (Fermentas)	2.5 µL
PCR ürünü (50ng)	21 µL
Nükleaz içermeyen su	20.5 µL
Toplam hacim	50 µL

Bir saat 30 dk, 37 °C’de inkübasyonun ardından 65 °C’ de 15 dk enzimin inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonunun doğruluğu agaroz jel sisteminde kontrol edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan %0.7’lik jel kuyularına kesim ürünlerinden 5 µL yüklemiş ve 1h süre ile 100V akım uygulanmıştır. EtBr boyaması ardından 366 nm UV ışık altında jel incelenmiştir.

Hem pBAD24 vektörü hem de *esp* N-terminal bölgesi aynı restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir ve T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak vektör ve PCR ürününün “ligasyonu” sağlanmıştır.

Vektör ve İnsert Ligasyon Reaksiyonu

pBAD24 (30 ng)	10 µL
İnsert (N-terminal bölge) (90ng)	5 µL
Ligasyon Buffer (10X)	2 µL
T4 DNA Ligaz (Fermentas)	0.5 µL
Nükleaz içermeyen su	2.5 µL
Toplam Hacim	20 µL

Ligasyon reaksiyonunun kontrolü için bir başka mikrosantrifüj tüpünde yalnızca pBAD24 vektörünün ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonda insert yerine nükleaz içermeyen su ortama ilave edilerek reaksiyon son hacmi 20 µL'ye tamamlanmıştır. Ayrıca pBAD24 vektörün tek enzim kesimi de ligasyon reaksiyonunun kontrolü olarak denenmiştir. Örneklerin 4 saat 22 °C'de inkübasyon ardından 10 dk 65 °C'de inaktivasyon işlemi yapılmıştır.

İnkübasyon işlemi bitiminde ligasyon reaksiyonlarından 5 µL alınarak 1 µL boya ile karıştırılmış ve %0.7 lik agaroz jellere yüklenerek 100V akımda yaklaşık 2h yürütülmüştür. EtBr boyaması sonrasında jeller 366 nm UV ışık altında incelenerek, elde edilen bantların moleküler büyüklükleri hesaplanmıştır.

4.2.11. *esp* GENİ N-TERMINAL BÖLGESİNİ İÇEREN PBAD24 VEKTÖRÜNÜN *Escherichia coli* DH5ALPHA VE *Salmonella* Typhimurium LT2'YA AKTARIMI

Ligasyon reaksiyonunun doğru şekilde gerçekleştiği belirlendikten sonra, istenilen gen bölgesini içeren pBAD24 vektörü, ileri denemelerin gerçekleştirileceği *Escherichia coli* DH5α ve *Salmonella* Typhimurium LT2 suşlarına transforme edilmiştir. Transformasyondan önce vektöre aktarılacak hücrelerin hücre duvar yapıları zayıflatılmış, yani hücreler kompetent hale getirilmiştir. Bu amaçla sırası ile aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- 1- Bir gecelik aktif kültür LB broth besiyerinde 50 kat seyreltilmiş ve 595 nm dalga boyunda OD değerleri 0.06' ya gelene kadar 37 °C'da ve 200 rpm'de çalkalamalı koşullarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 11.000 rpm'de bir dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 2- Hücre çökeltisi 1000 µL ddH₂O 'da (sıcaklığı 2 °C olan) çözülmüştür. Bu işlem iki defa tekrarlanmış ve santrifüj sonunda elde edilen pellet 40 µL ddH₂O'da çözümlenerek transformasyon işlemine kadar 80 °C'de muhafaza edilmiştir.

esp N-terminal bölgesini içeren pBAD24 vektörü ile 2µL kompetent hücre karıştırılarak, önceden buz üzerinde soğutulan elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmıştır ve 2500 volt elektrik şoku uygulanmıştır. Kontrol denemesinde ise hücrelere insert içermeyen, boş pBAD24 vektörünün transformasyonu yapılmıştır.

Bu işlemden sonra hücreler üzerine 700 µL LB broth besiyeri eklenmiş ve 1 saat boyunca 37 °C’da 200 rpm çalkalama hızında inkübasyonun ardından ampisilin (Amp) (100 µg/mL) içeren LB agar ortamına yayma ekim yapılmıştır. Bu işlemdeki amacımız, pBAD24 plazmidi Amp (100 µg/mL) direncine sahip olduğundan, yalnızca vektörü içinde bulunduran hücrelerin gelişmesini sağlamaktır. Vektörü içermeyen *E. coli* DH5α ve *S. Typhimurium* LT2 suşları antibiyotikli ortamda gelişemeyecektir.

18h boyunca 37 °C’de inkübasyonun ardından antibiyotikli ortamda gelişen koloniler, steril kürdan yardımıyla Amp (100 µg/mL) içeren 5 mL LB broth ortamlarına transfer edilmiş ve 37 °C’de 1 gece 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. Bu transformantlardan hem -20 °C stok kültürler hazırlanmış, hem de istenilen plazmidi içerip içermediğinin kontrolü için plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonunda High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) kullanılmıştır. İzole edilen plazmidler %0.7’lik agaroz jelde 100 V akımda 1h boyunca yürütülmüş ve EtBr boyamasını takiben UV ışık altında incelenmiştir. Plazmidlerin büyüklüğü Supercoiled marker (Sigma) kullanarak hesaplanmıştır.

4.2.12. *Salmonella* Typhimurium LT2 SUŞUNDA ARABİNOZ VARLIĞINDA ESP PROTEİNİNİN ÜRETİMİNİN TEŞVİKİ

esp geni, pBAD24 vektörü kullanılmak suretiyle indüklenebilir arabinoz promotörüne sahip pBAD24 vektörüne klonlanmıştır (67). Bu sebeple Esp’nin üretiminin teşviki bakteri gelişme ortamına L-arabinoz (Sigma-Aldrich, USA) ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. 50 ng/µL ampisilin antibiyotiği içeren LB sıvı ortamında 37 °C’de 18 saat üretilen LT2 (*S. Typhimurium* pBAD24+*esp* geni) suşu, süre bitiminde yine uygun antibiyotikleri içeren 50 mL LB sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiştir. 200 rpm çalkalama hızında, 37 °C’de OD595=0.2 düzeyine kadar geliştirildikten sonra besi ortamlarına, *esp* geninin ifadesi için optimum düzey olarak belirlenen %0.01 oranında L-arabinoz ilave edilerek 30 dakika daha inkübasyona tabi tutulmuş, kültür yoğunluğunun OD595=0.4 düzeyine gelmesi sağlanmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kültürün 30 µL’si bir sonraki basamakta anlatılacak olan “Polistiren üzerinde biyofilm oluşumunun belirlenmesi “ denemesinde kullanılırken, geri kalan aktif kültüre 12000 rpm’de 5 dk santrifüj uygulanarak hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Bu hücreler daha sonra RNA izolasyonunda kullanılmıştır.

4.2.13. POLİSTİREN ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN BELİRLENMESİ

S. Typhimurium LT2, *S. Typhimurium* LT2+pBAD24 ve *S. Typhimurium* LT2 pBAD24+*esp* geni suşlarının polistiren üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (68). Bu amaçla, NaCl içermeyen 5 mL'lik LB sıvı (LBwo/NaCl) ortamlarında 37 °C'de çalkalamalı koşullarda 18 saat geliştirilen aktif kültürlerden, LB^{wo}/NaCl besiyerine ekim yapılarak bakteriyel üreme OD₅₉₅= 0.4 düzeyine gelene kadar inkübe edilmiştir (Shimadzu spektrofotometer, Japan). Bu süspansiyonlardan, 100 µl/kuyu LB^{wo}/NaCl içeren 96 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plaklarına 30 µl aktarılmıştır. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrodilüsyon plakları, 24 saat süresince 20 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde, kuyular 3 defa PBS ile yıkanmış ve her kuyuya 130 µl metanol ilave edilerek 10 dakika inkübasyon ile oluşan biyofilm yapısının fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde metanol uzaklaştırılmış ve kuyular kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra 130 µl %0.1'lik kristal viyole kuyulara aktarılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Plaklar steril distile su ile 2 kez yıkanmış ve kuyulara biyofilm tabakasına bağlanan boyayı çözmek amacıyla 130 µl %33'lük (v/v) glasiyal asetik asit aktararak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (69). İnkübasyon bitiminde çözünen kristal viyole boyasının optik yoğunluğu 595 nm dalga boyunda Elisa okuyucusunda (Biorad, USA) ölçülmüştür. Alınan OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca NaCl'siz LB sıvı içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamasının çıkarılması suretiyle üretilen biyofilm düzeyleri belirlenmiştir.

4.2.14. ÖRNEKLERDEN RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu sırasında (High Pure RNA Isolation Kit, Roche/Germany) üretici firma tarafından önerilen basamaklar izlenmiştir:

- Hücre çöktelleri 200 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) içerisinde çözülür.
- Bu çözelti üzerine 4 µl lizozim (50 mg/mL) ilave edilerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edilir.
- Süre bitiminde 400 µl lizis/bağlama tamponu ilave edilerek iyice karıştırılır.
- Solüsyon kitin içerisinde bulunan spin kolona aktararak 8000 g'de 15 sn santrifüj edilir.

- Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra spin kolondaki filtrenin üzerine 90  l DNaz inkübasyon tamponu ve 10  l DNaz I karıştırılarak eklenir.
- 5-25  C arasında bir sıcaklıkta 1 saat inkübasyona bırakılır.
- Süre bitiminden sonra filtrenin üzerine 500  l yıkama tamponu I'den eklenerek 8000 g'de 15 sn santrifüj edilir ve toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır.
- 500  l yıkama tamponu II eklenir ve 8000 g'de 15 sn santrifüj edilir.
- Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır. Bir kez daha 200  l yıkama tamponu II eklenip 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda spin kolon steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
- Spin kolonda bulunan filtrenin üzerine 50  l elüsyon tamponu eklenir ve 8000 g'de 1 dk santrifüj edilir.

Elde edilen RNA'lar bekletilmeden cDNA eldesine alınmıştır. Geri kalanı bir sonraki kullanıma kadar -80  C'de saklanmıştır. Saflaştırma sonrası elde edilen RNA'larda saflık ve miktar tayini (Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre) yapılmış ve saflıkları agaroz jel elektroforezinde de kontrol edilmiştir. Beklenen RNA görüntüsü elde edildikten sonra cDNA sentezine geçilmiştir.

4.2.15. cDNA SENTEZİ

RNA örneklerinden (2000 ng) cDNA sentezi için "cDNA synthesis kit"i (Roche, Germany) kullanılmıştır (izelge 4.11, izelge 4.12). cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımları ve uygulanan sıcaklık döngüsü izelge 4.7 ve izelge 4.8' de verilmiştir. Elde edilen her cDNA, qRT-PZR denemelerinde kullanılmak üzere ddH2O ile 1:10 oranında seyreltilmiş ve -20  C'de saklanmıştır.

Çizelge 4.10. cDNA sentez protokolü

İçerik	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	µl
Distile su			*
Random hekzamer primer	600 pmol/µl		2
RNA		200 ng	
Reverse Transcriptase Buffer	5x	1x (800 mM MgCl ₂)	4
RNase inhibitör	40 U/µl	20 U	0,5
dNTP mix	10 mM (her nükleotitten)	1 mM (her nükleotitten)	2
Reverse transcriptase	20 U/µl	10 U	0,5
Toplam Hacim			20

*65 °C’de 10 dk RNA’nın denatürasyonu için inkübe edilir ve hemen buza alınmıştır

*Toplam hacim distile su ile 13 µl’ye tamamlanmıştır

Çizelge 4.11. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü Sayısı
Uzama 1	25	10	1
Uzama 2	50	60	1
İnaktivasyon	85	5	1

4.2.16. ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMERLERİN TASARLANMASI

Gerçek zamanlı PZR deneylerinde kullanılan gen spesifik primerler “Primer 3” [<http://frodo.wi.mit.edu>] programı kullanılarak tasarlanmıştır. Çalışılan genlere ait diziler NCBI’den (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) temin edilmiştir. Primer çiftlerinin spesifitesini belirlemek amacıyla bu diziler veri tabanında bulunan diziler ile karşılaştırılmış ve yalnızca hedef genlere homolog oldukları belirlenmiştir. Genlerin ifadenme analizinde görel kantifikasyon yapabilmek için referans gen (housekeeping gen) olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz-A (*gapA*) geni seçilmiştir. İfade düzeyi analizinde kullanılacak gen spesifik primerlerin dizileri Çizelge 4.13’de listelenmiştir.

Çizelge 4. 12. qRT-PZR için kullanılan primerler

Çoğaltılan gen	Primer dizisi	Ürün büyüklüğü
<i>gapA</i>	F 5'-GGAACGCCATACCAGTCAG-3' R 5'-AACCCAGAAAACCGTTGAC-3'	152bp
<i>esp</i>	F 5'-TGGTGATGGAAACCCTGACGA-3' R 5'-TTGCGCTTTGTGACCTGTTCC-3'	151 bp

4.2.17. GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PZR (qRT-PZR) İLE BELİRLENMESİ

Bu çalışmada, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Light Cyler 480 (Roche) cihazı kullanılarak, LightCyler 480 SYBR Green Master kiti (Roche) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm genler için amplifikasyon karışımları kitin önerileri doğrultusunda Çizelge 4.13'te belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon koşulları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı

İçerik	Konsantrasyon	FinalKonsantrasyon	µl
SYBR Green Master Mix	2 (x)	1 (x)	5
İleri primer (F)		5 pmol	1.4
İleri primer (R)		5 pmol	1.4
cDNA kalıbı	1:5 sulandırılmış	40 ng	2
ddH ₂ O			0.2
Son Hacim			10

Çizelge 4.14. LightCyler cihazında kullanılan qRT-PZR programı

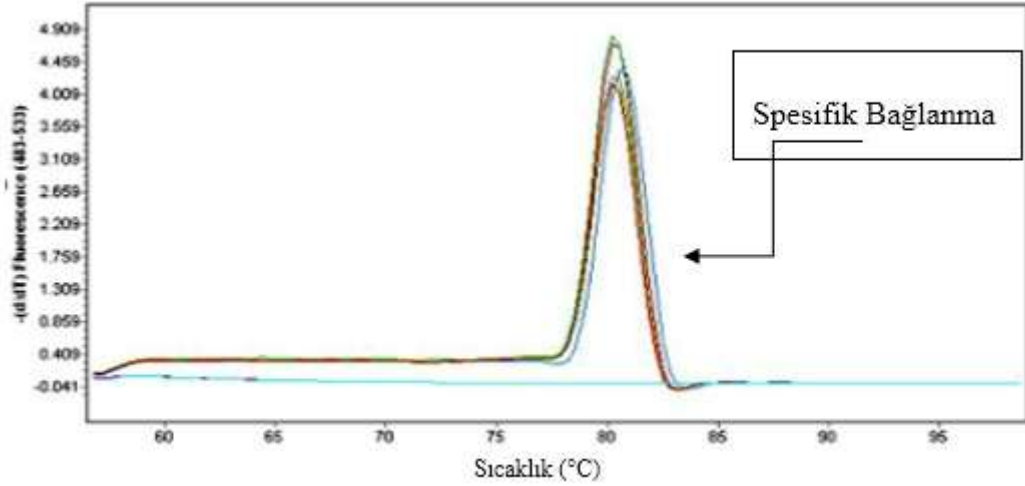
Basamak	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Artış (°C/sn)	Veri Alımı
1. İlk denatürasyon	İlk denatürasyon	95 °C	10'	4.8	-
2. Amplifikasyon (45 döngü)	Denatürasyon	95°C	10''	4.8	-
	Bağlanma	*57°C	10''	2.5	-
	Uzama	72°C	08''	4.8	Tek
	Denatürasyon	95°C	30''	4.8	-
3. Erime eğrisi	Reannealing	*57°C	30''	2.5	-
	Denatürasyon	99°C	0	0.11	Sürekli
4. Soğuma	Soğuma	40°C	30''	2.5	-

* *gapA* ve *esp* genleri için optimizasyon çalışmaları sonucunda amplifikasyonun primer bağlanma basamağındaki sıcaklık, erime eğrisi analizi sonucunda sırası ile 57 °C ve 60 °C olarak ayarlanmıştır.

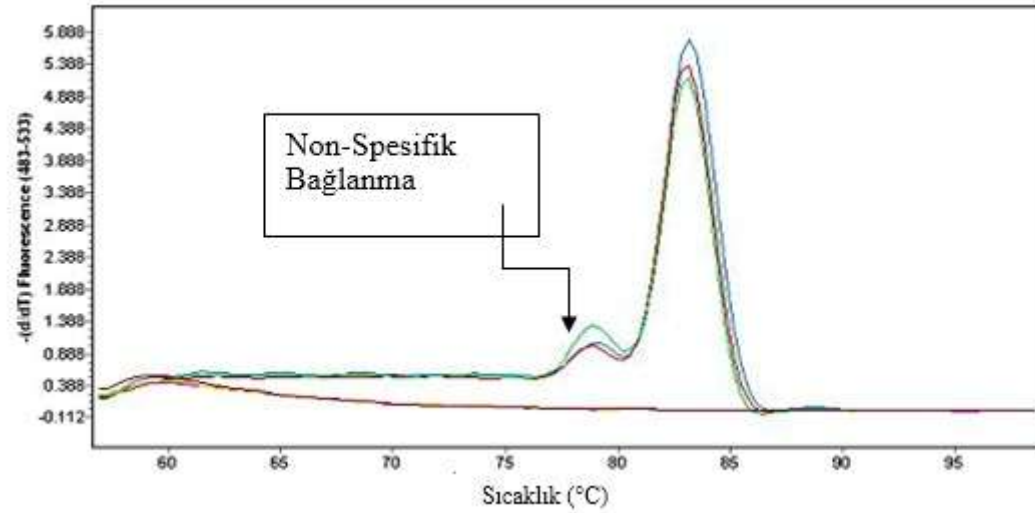
Amplifikasyon reaksiyonları 384 kuyulu PZR plaklarında gerçekleştirilmiştir. cDNA kalıbını içermeyen reaksiyon karışımı negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Amplifikasyonu takiben, tek bir reaksiyon ürünü aldığımızı doğrulamak amacı ile erime eğrisi analizi yapılmıştır.

4.2.18. ERİME EĞRİSİ ANALİZİ

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında etidyum bromit yerine daha az toksik, primerlerden bağımsız, daha spesifik ve daha duyarlı floresan bir dsDNA inter kalatör ajanı olan "SYBR Green I" boyası kullanılmıştır. Bu özgül olmayan yöntemde kullanılan floresan boya reaksiyonda çoğalan çift zincir DNA'ya özgül olmayan bir şekilde bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışıyla orantılı olarak floresan ışımaya gerçekleşir. Her farklı çift zincir DNA molekülünün kendine özgü bir erime sıcaklığı (T_m) vardır. Bu çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Tipik bir erime eğrisi analizi sonucunda, her örnek için tanımlanan ayrılma sıcaklığında tek bir pikin görülmesi beklenir. Fazladan oluşan herhangi başka bir pik, reaksiyonda spesifik olmayan ampliconların veya primer dimerlerinin oluştuğu anlamına gelmektedir. Çalışmamızda erime eğrisi analiz sonuçları, yukarıda özetlenen bilgiler doğrultusunda değerlendirilmiştir. Şekil 4.4 tek bir ürünle tanımlanan erime eğrisi sonucunu ve Şekil 4.5 ise nonspesifik amplicon ve primer dimeri içeren bir erime eğrisi sonucunu göstermektedir. Bu çalışmada, her gen spesifik primer çifti için PZR koşulları, gerçek zamanlı PZR'de istenilen erime eğrisini verecek şekilde optimize edilerek belirlenmiştir.



Şekil 4.4. *gapA* geni için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi



Şekil 4.5. *esp* geni için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi

4.2.19. AMPLİFİKASYON VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

qRT-PZR verilerinin doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için kantifikasyon yönteminin seçimi, gerçek zamanlı PZR'nin en önemli basamağını oluşturmaktadır. Bu çalışmada; bir örnekteki belli bir genin mRNA düzeyindeki değişimin, bir başka örnekteki o hedef genin mRNA düzeyindeki değişimine oranlanmasını esas alan görel kantifikasyon stratejisi seçilmiştir. Görel kantifikasyonda; bir hedef genin ifadesini referans gen ile ilişki kurarak hesaplayabilmek için birçok matematiksel model geliştirilmiştir. Hesaplamalar, eşik döngü

değer (Ct) farklılıklarının amplifikasyon verimi de göz önünde bulundurularak karşılaştırılması esasına dayanmaktadır.

Amplifikasyon verimliliği PZR reaksiyonunun mükemmel ne kadar yakın gerçekleştiğinin göstergesidir. Çalışmada, kullanılan her primer çifti için PZR amplifikasyon verimlilikleri (E) hesaplanmıştır. Bunun için, *esp* geni içermeyen suşun cDNA örneğinin (kalibratör örnek) 1/10 seri dilüsyonları yapılmış (1-1:100 000 dilüsyonları) ve dilüsyon serilerinden elde edilen log₁₀ kopya sayısının Ct değerlerine (eşik döngüsü değerleri) karşı çizilen grafiği oluşturulmuştur. Bu grafikten elde edilen amplifikasyon pikinin eğiminden üstel amplifikasyon (Denklem 4.1.) ve amplifikasyon verimliliği (Denklem 4.2.) hesaplanmıştır. Üstel amplifikasyon 2'ye, amplifikasyon verimliliği ise 1'e yaklaştıkça PZR reaksiyonunun mükemmelliği artar (70). Amplifikasyon verimi 1'e eşitse (=100%), reaksiyondaki kopya sayısı her döngüde ikiye katlanmış demektir.

Denklem 4.1.: Üstel amplifikasyon: $10^{(-1/\text{eğim})}$

Denklem 4.2.: Verimlilik (E): $(10^{(-1/\text{eğim})})-1$

Bu çalışmada kullanılan her primer seti için gerçekleştirilen üstel amplifikasyon hesaplamaları sonucunda, PZR reaksiyonlarının neredeyse mükemmel yakın bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Bu sebeple; PZR sonuçlarının değerlendirilmesi (kantitasyon), reaksiyon verimini hesaba katmayan yaklaşım metodu ile gerçekleştirilmiştir (Denklem 4.3) (71).

Denklem 4.3.: $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.2.20. NORMALİZASYON

Görelî kantitasyonun, yaklaşım metodu ile gerçekleştirilen analizinde normalizasyon basamağı mevcuttur ve bunun için farklı koşullarda dahi ifade düzeyi değişmediği bilinen (en az etkilenen) ve referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genlere ihtiyaç vardır (72). Reaksiyon sonunda her örnek için ayrı ayrı elde edilen hedef genlerin ifade değerleri (eşik döngüsü; Ct); ilk önce referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin (*gapA*) her örnekteki ifade seviyelerine göre oranlanarak normalize edilmiştir. Bu işlem ile amaçlanan,

izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarından kaynaklanan örnekler arası başlangıç farklılıklarını ve deneysel hataları normalize etmektir. Bu normalizasyon basamağı sonrasında elde edilen *esp* ifadesi teşvik edilmiş *S. Typhimurium* LT2 örneklerinin Ct değerleri, kontrol örneklerinin Ct değerleri ile normalize edilmiştir. Bu son normalizasyon, arabinozun *esp* ifadesi teşvik edilen *S. Typhimurium* LT2 örneklerinde araştırılan hedef genlerin ifadeleri üzerine olan etkisini çıkarmak için uygulanan bir yaklaşımdır (72).

qRT-PZR sonuçları, kantitasyon için seçilen yaklaşım metodu kullanılarak aşağıdaki formüle göre normalize edilmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{(C_{T,X} - C_{T,R})_{kontrol} - (C_{T,X} - C_{T,R})_{test}}$$

$C_{T,X}$: hedeflenen genin (örn; *esp*) Ct'si

$C_{T,R}$: referans genin (*gapA*) Ct'si

Kontrol: Dt suşun Ct değerleri

Test: *Esp* üretimi indüklenmiş suşun Ct değerleri

Ct (threshold cycle-eşik döngüsü) değerleri, analiz sonunda elde edilen pik profilleri aracılığı ile belirlenmiştir. Yukarıdaki formülde “referans” için *gapA* geninin Ct değeri kullanılmıştır. “Kontrol” için doğal tip edilen *S. Typhimurium* LT2 örnekleri kullanılırken, “test” için ise *esp* ‘nin aktarıldığı örneklerin Ct değerlerinden yararlanılmıştır.

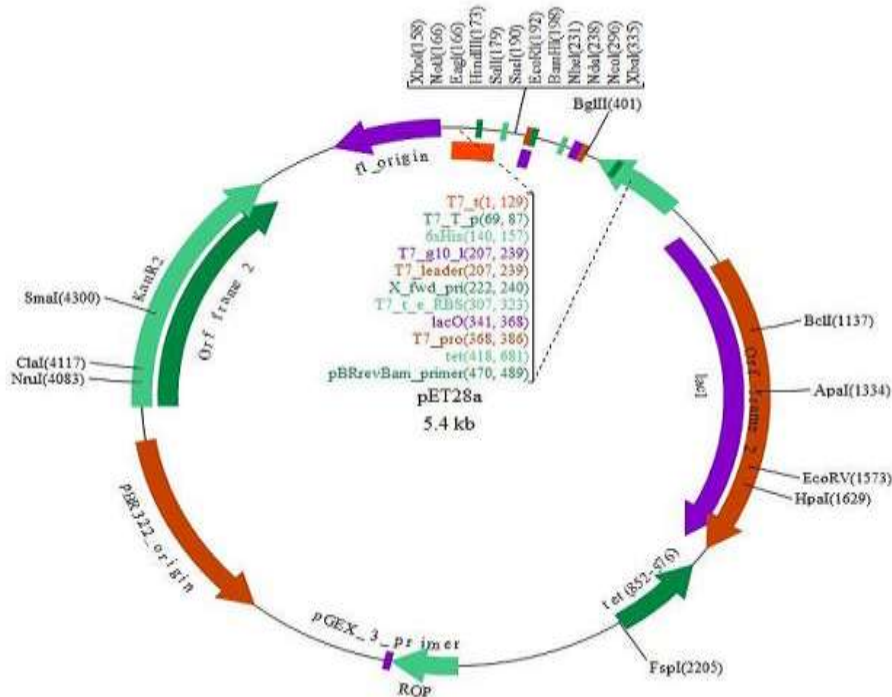
4.2.21. NORMALİZE EDİLEN VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Verilerinin istatistiksel olarak değerlendirmesi Livak ve Schmittgen (2001), tarafından belirlenen $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu doğrultusunda gerçekleştirilen normalizasyon sonrası, elde edilen veri setinde yer alan değerlerin birbirleriyle olan benzerlikleri ya da birbirlerine olan uzaklıkları kümeleme analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir (71). Oluşturulan kümelerde yer alan genler arasındaki korelasyon ise Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir.

4.2.22. *esp* N-TERMİNAL BÖLGESİNİN pET28a VEKTÖRÜ ARACILIĞI İLE *E. coli* DH5 ALPHA VE *E. coli* BL21 SUŞLARINA AKTARIMI

qRT-PZR çalışmalarının ardından Esp proteininin izolasyonu için çoğaltılan N-terminal bölge bu kez pET28a vektörüne klonlanmıştır. Bu vektör 5.4 kb büyüklüğe sahiptir ve klonlama bölgesine aktarılan gen ardında 6 adet histidin ile birlikte transkribe edilmektedir. Dolayısı ile ardında taşıdığı histidin işareti, ilgili gen protein diline çevrildiğinde, proteinin izolasyonu için bir işaret (marker) görevi görmektedir. Bu özelliğinden dolayı sonraki çalışmalara pET28a vektörü ile devam edilmiştir.

Klonlama reaksiyonları için seçilen kültürler *E. coli* DH5a ve *E. coli* BL21 suşlarıdır. Burada *E. coli* DH5a suşu, plazmidin suş içerisinde kalıcılığı (stabilizasyonu) için ara basamak teşkil etmektedir. Denemelere Gram negatif *E. coli* DH5a ve *E. coli* BL21 ile devam edilmesinin nedeni, protein izolasyonu basamağı için kullanacak olduğumuz pET28a vektörünün yalnızca Gram negatif bakterilerde ifade olma özelliğinde oluşudur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. pET28a vektör haritası (<http://www.biovisualtech.com/>)

esp N-terminal bölgesini kodlayan gen dizisinin pET28a vektörüne klonlanmasında aşağıda belirtilen basamaklar sırası ile izlenmiştir.

4.2.22.1. Enzim kesimi

pET28a vektörü ve *esp* N-terminal bölgesinin PZR ürünü pürifikasyonundan sonra (High Pure PCR Product Purification Kit /Roche) ikili enzim kesimi için NheI (Fermentas) enzimiyle 2h 37 °C'da inkübasyonun ardından 15 dk 65 °C'da inaktivasyon gerçekleştirilmiştir. İkinci enzim kesimi için örneklerin bulunduğu tüpe 2.5 Tango buffer ve 1 µL EcoRI (Fermentas) ilave edilip 2h 37 °C'da inkübasyonun ardından 15 dk 65 °C'da inaktivasyon işlemi uygulanmıştır.

***esp* N-terminal bölgesi PZR ürününün kesim reaksiyonu**

Tango buffer(10x)	2 µL
NheI-HF (BioLabs)	1 µL
PZR ürünü (180 ng)	4 µL
Nükleaz içermeyen su	13 µL
Toplam hacim	20 µL

Bu reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama 2.5 µL Tango buffer+1µL EcoRI ilave edilerek ikinci enzim kesimi gerçekleştirilmiştir.

pET28a vektörün kesim reaksiyonu

Tango buffer(10x)	2 µL
NheI-HF (BioLabs)	1 µL
pET28a vektör (35 ng)	13 µL
Nükleaz içermeyen su	4 µL
Toplam hacim	20 µL

Enzim kesiminden sonra ligasyona geçmeden önce pürifikasyon işlemi High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) ile yapılmıştır.

4.2.22.2. Ligasyon

Vektör ve İnsert Ligasyon Reaksiyonu	
pET28a (30 ng)	8 µL
İnsert (N-terminal bölge) (60ng)	3.6 µL
Ligasyon Buffer (10X)	2 µL
T4 DNA Ligaz (Fermentas)	0.5 µL
Nükleaz içermeyen su	5.9 µL
Toplam Hacim	20 µL

4 saat süresince 22 °C’de inkübasyon ve ardından 10 dk 65 °C’de inaktivasyon basamağı uygulanmıştır. Kesim reaksiyonunun kontrolü %0.7’lik agaroz jellere 5 µL örnek yüklenerek 100 voltta 1h boyunca yürütülmesi ve ardından EtBr ile boyanması ile gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon işleminin doğru şekilde gerçekleştiği belirlendikten sonra, istenilen gen bölgesini içeren pET28a vektörü, ileri denemelerin gerçekleştirileceği *Escherichia coli* BL21 suşuna transforme edilmiştir. Transformasyondan önce vektöre aktarılacak hücrelerin hücre duvar yapıları zayıflatılmış, yani hücreler kompetent hale getirilmiştir. Bu amaçla sırası ile aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- 1- Bir gecelik aktif kültür LB broth besiyerinde 50 kat seyreltilmiş ve 595 nm dalga boyunda OD değerleri 0.06’ ya gelene kadar 37 °C’da ve 200 rpm’de çalkalamalı koşullarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
İnkübasyon sonunda hücreler 11.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 2- Hücre çökeltisi 1000 µL ddH₂O ‘da (sıcaklığı 2 °C olan) çözülmüştür. Bu işlem iki defa tekrarlanmış ve santrifüj sonunda elde edilen pellet 40 µL ddH₂O’da çözülerek –transformasyon işlemine kadar 80 °C’de muhafaza edilmiştir.

esp N-terminal bölgesini içeren pET28a vektörü ile 2µL kompetent hücre karıştırılarak, önceden buz üzerinde soğutulan elektroporasyon kuvvetlerine aktarılmış ve 2500 volt elektrik şoku uygulanmıştır. Kontrol denemesinde ise hücrelere insert içermeyen, boş pET28a vektörünün transformasyonu yapılmıştır.

Bu işlemden sonra hücreler üzerine 700 µL LB broth besiyeri eklenmiş ve 1 saat boyunca 37 °C’da 200 rpm çalkalama hızında inkübasyonun ardından kanamisin (Kan) (50 µg/mL) içeren LB agar ortamına yayma ekim yapılmıştır. Bu işlemdeki amaç; pET28a plazmidi Amp (100 µg/mL) direncine sahip olduğundan, yalnızca vektörü içinde bulunduran hücrelerin gelişmesini sağlamaktır. Vektörü içermeyen *E. coli* DH5α ve *S. Typhimurium* LT2 suşları antibiyotikli ortamda gelişemeyecektir.

18h boyunca 37 °C’de inkübasyonun ardından antibiyotikli ortamda gelişen koloniler, steril kürdan yardımıyla Kan (50 µg/mL) içeren 5 mL LB broth ortamlarına transfer edilmiş ve 37 °C’de 1 gece 200 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Bu transformantlardan hem -20 °C stok kültürler hazırlanmış, hem de istenilen plazmidi içerip içermediğinin kontrolü için plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonunda High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) kullanılmıştır. İzole edilen plazmidler %0.7’lik agaroz jelde 100 V akımda 1h boyunca yürütülmüş ve EtBr boyamasını takiben UV ışık altında incelenmiştir.

4.2.23. pET28a+*esp* VEKTÖRÜNÜ İÇEREN *E. coli* BL21 ÖRNEĞİNDEN TOPLAM PROTEİN SAFLAŞTIRMASI

pET28a+*esp* vektörü içeren *E.coli* BL21 suşunun bir gecelik aktif kültüründen, 50 mg/mL kanamisin içeren 125 mL LB besiyerine %1’lik ekim yapılarak OD600’de 0.4-0.6 ‘ye gelene kadar 37 °C’da inkübe edilmiştir.

İnkübasyon Çözeltisi (250 mL):

%5’lik Tripton	100 mL
420 mM IPTG	600 µL
250 mg/ mL kanamycin	150 µL
LB	150 mL

Bu sürenin sonunda bakteri kültürüne 125 mL inkübasyon çözeltisi ilave edilip bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak pET28a+*esp* vektörünü içeren *E.coli* BL21 ve doğal tip *E.coli* BL21 suşu inkübasyon çözeltisi ilave edilmeden 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. 18 saat inkübasyonun sonunda bakteri kültürleri 6000 rpm hızla ve 24 °C’de 15 dk santrifüj edilerek elde edilen pelletler SDS PAGE analizleri için -80 °C’de saklanmıştır.

4.2.23.1. SDS PAGE

SDS page için ilk aşamasında SDS page jeli hazırlanmıştır.

%10' luk Alt jel (10 mL):	
dH2O	3.93 mL
%30 akrilamid/bis:	3.33 mL
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2.53 mL
%10 SDS	100 µL
%10 APS(amunium per sulfat)	100 µL
TEMED	10 µL
%5'lik üst jel (5 mL):	
dH2O	2.8 mL
%80 akrilamid/bis	0.7 mL
0.5 M Tris (pH: 8.8)	1.25 mL
%10 SDS	50 µL
%10 APS (amunium per sulfat)	50 µL
TEMED	5 µL

Daha sonra pET28a+*esp* vektörü içeren *E. coli* BL21 suşunun IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ile indüklenmiş ve kontrol olarak indüklenmemiş ve 1 gr BL21 suşun bakteri pelletlerine 150 µL laemmlı buffer (Sigma) ilave edilip ve iyice karıştırdıktan sonra 95°C ısı bloğunda 10 dk inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra Running buffer'ın içinde bulunan SDS jelin kuyularına 5, 10 ve 15 µL olarak yüklenmiştir. Marker olarak 7-175 kDa (New England BioLabs) kullanılmıştır (Şekil 4.7).

Running buffer (1 lt/ pH: 8.3):

Tris	15 gr
Glisin	72 gr
SDS	5 gr
dH2O	1000 mL

Fiksatif Solüsyonu:

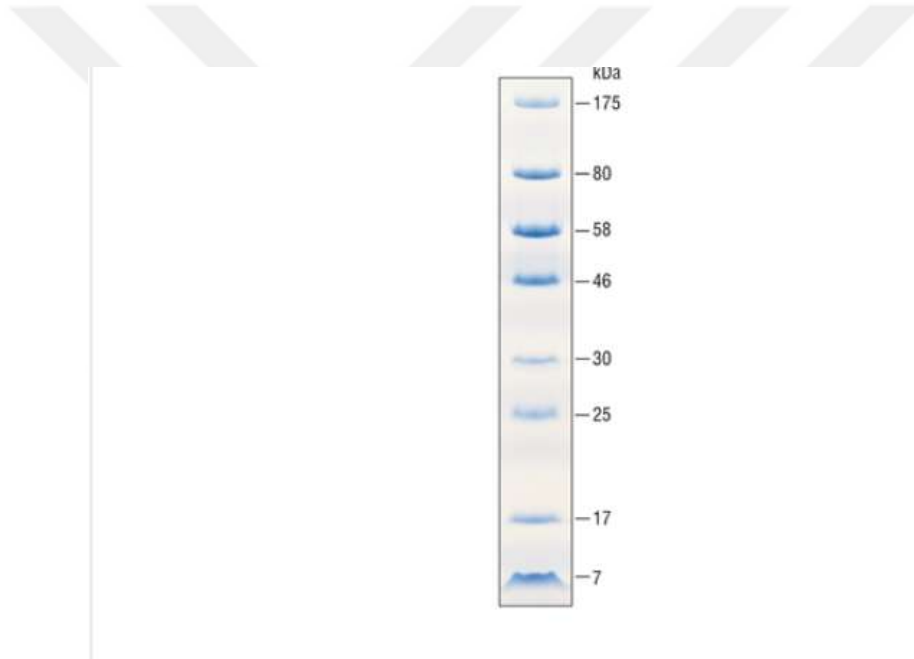
Isopropanol	%20
Glacial Asetik Asit	%10

Stain Solüsyonu:

Coomassie Slve-R250	3 gr/L
Metanol	%45
Glacial Asetik Asit	%10
dH2O	%45

Destain Solüsyonu:

Glacial Asetik Asit	50 mL
Metanol	100 mL
dH2O	350 mL



Şekil 4.7. Protein marker bant büyüklükleri (7-175 kDa)

4.2.24. pET28a+*esp* VEKTÖRÜNÜ İÇEREN *E. coli* BL21 ÖRNEĞİNDEN HİSPUR Nİ-NTA KİTİ KULLANILARAK ESP PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRMASI

pET28a+*esp* genini içeren *E. coli* BL21 bakteri pellet örneği, lizis tamponu içerisinde 5 dakika boyunca sonike edilmiştir (SONICS Vibra-Cell, Newtown, USA). Sonikasyon sonrası örnekler yatay ekseninde çalkalamalı koşullarda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığında 13.300 rpm hızda 4 °C'de 15 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir (Thermo IEC MICROCL 17R). Elde edilen süpernatant kısımla

kolondan saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Protein solüsyonundaki polihistidin–tag proteinlerin purifikasyonu için nikel yüklü nitrilotriasetik asit (NTA) şelatı içeren HisPur Ni-NTA (Thermo, Rockford, USA) spin kolonundan yararlanılmıştır. Histidin işaretli proteinin saflaştırılması için firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir. Protokol gereğince; denge (10mM imidazol içeren PBS; pH 7.4), yıkama (25mM imidazol içeren PBS; pH 7.4) ve elüsyon (250mM imidazol içeren PBS; pH 7.4) tamponları hazırlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce kolon oda sıcaklığında bir süre bekletilmiş ve altındaki tıkaç çıkartıldıktan sonra 50 mL’lik falkona yerleştirilmiştir. İçindeki stok tamponu uzaklaştırmak için, 700 g’de 2 dakika santrifüj basamağı uygulanmıştır. Kolonun 2 katı hacminde denge tamponu kolona eklenmiş ve bu tamponunu uzaklaştırmak için yine 700 g’de 2 dakika santrifüj (Hettich Rotina 35 R) gerçekleştirilmiştir. Protein ekstraktı eşit hacimde denge tamponu ile karıştırılmış ve kolonun tıkaçı alta takıldıktan sonra hazırlanan protein ekstraktı kolona yüklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında yatay ekseninde çalkalanmıştır. Kolon tıkaçı tekrar çıkartılıp, 700 g’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süzülen sıvı toplanmıştır. Kolonun iki katı hacmi olan 12 mL yıkama tamponu kolona eklendikten sonra 700 g’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve fraksiyonlar ayrı santrifüj tüplerinde toplanmıştır. Son aşamada ise His-tag proteinleri elüye etmek için kolona 6mL (kolon hacimi kadar) elüsyon buffer eklenmiş ve 700 g’de 2 dakika santrifüj gerçekleştirilmiş. Bu basamak iki kez daha tekrarlanmış ve her basamağın fraksiyonları ayrı steril bir tüpte toplanmıştır.

Lizis Tamponu (25 mL)

Tris-HCl (pH: 8.0)	10 mM
KCl	50 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	% 1
IGEPAL CA-630	%0.5
Lizozim	1/1000

Protein saflaştırılmasının son aşamasında örneklerin imidazolden arındırılmasında 0.2 M amonyum bikarbonat (pH: 8.0) tamponu ile dengelenen D-Salt Poliakrilamid Plastik Desalting Kolonundan (Pierce, Rockford, IL, USA) yararlanılmıştır. 100 g’de santrifüjlenen bu kolondan 3 kez elüsyon örneği toplanmış ve en son olarak da kolondan 1X PBS geçirilerek örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler daha sonra SDS Page ve Western Blot analizlerinde kullanılmıştır.

4.2.25. SAFLAŞTIRILAN ESP PROTEİNİNİN WESTERN BLOT ANALİZİ

Western Blot analizi için daha önceki basamakta elde edilen protein fraksiyonlarını içeren SDS-PAGE jeline uygun büyüklükte PVDF membran kesilmiş ve ıslatılması amacı ile bu membran 5 dk %100'lük metanolde çalkalanmıştır. Ardından membran soğuk transfer tamponuna alınarak 5 dk da bu ortamda oda sıcaklığında ıslatılması sağlanmıştır. Transfer esnasında kullanılan kurutma kağıdı ve süngerler de yine aynı transfer tamponunda ısıtılmıştır.

Transfer tampon (1 litre)

Glisin	14.4 gr
Tris base	6.04 gr
Metanol	100 mL

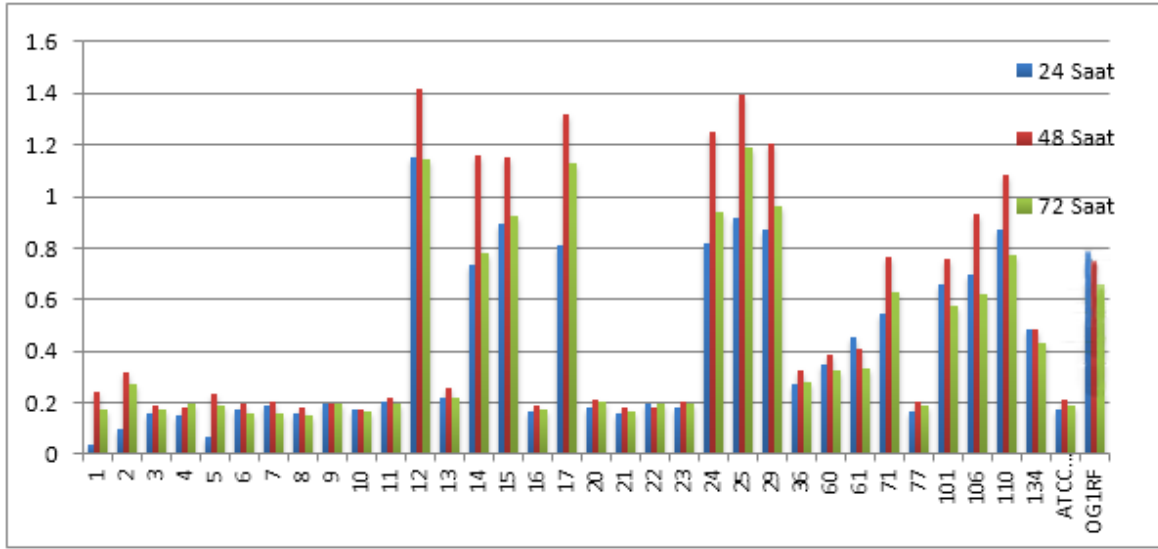
Sandwich metoduna uygun olarak jel ve membran Bio-Rad jel kasetine yerleştirilmiştir. Bu amaçla; siyah (-) kısmına jel ve kırmızı (+) kısmına membran olacak şekilde sistem kurulmuştur. RiJel sistemi kurulurken hava kabarcığının kalmamasına özen gösterilmiştir. Ardından, tank buz kalıbına yerleştirilmiştir. Transfer yürütme işlemi için 2 saat süresince 100 voltta akım uygulanmıştır. Membranda markerın görünmesi transferin başarılı ile gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Transfer basamağının ardından, membran ile antikor arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için, membran bloklanması yapılmıştır. Bunun için membran bir saat %5'lik yağsız süt tozu içeren PBS-Tween 80 içerisinde +4 °C'de inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda membran 3 defa 5'er dk PBS ile yıkanmıştır. Primer antikor olarak Anti-his antikor (1:5000 oranında 1X PBS ile seyreltilmiştir) kullanılmıştır. Membrana 10 mL primer antikor eklendikten sonra bir gece oda sıcaklığında, çalkalamalı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde membrana her biri 10 dk'lık 3 PBS yıkaması yapılmıştır. Sekonder antikor olarak Goat anti-rabbit IgG antikor (1:3000 oranında 1X PBS ile seyreltilmiştir) kullanılmış ve 10 mL sekonder antikor jele uygulandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiş ve sürenin sonunda KODAK jel görüntüleme (KODAK-Image station-4000mm/U.S.A) cihazı kullanarak membran görüntülemeye alınmıştır.

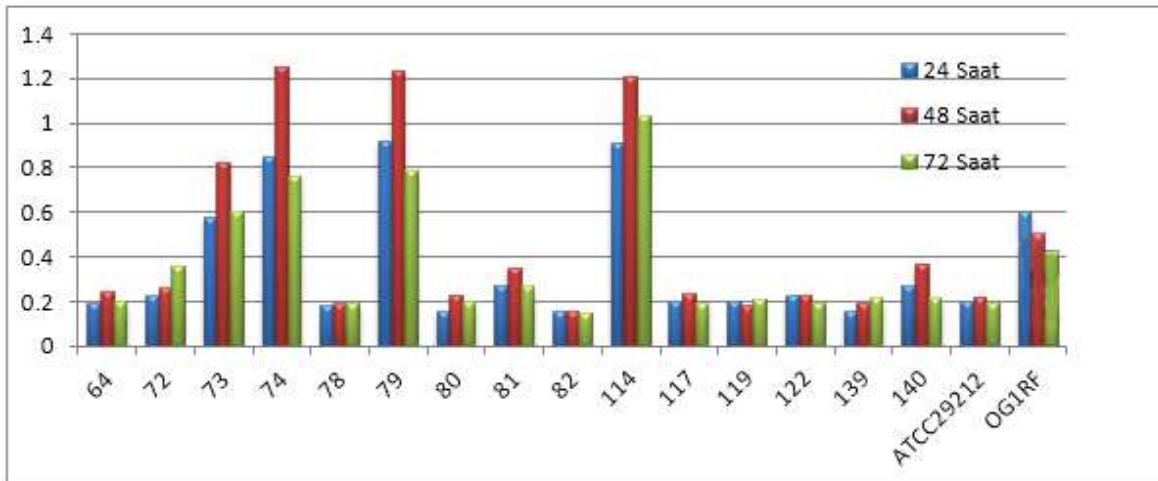
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. İZOLATLARIN FARKLI İNKÜBASYON SÜRELERİNDE ÜRETTİKLERİ BİYOFİLM YAPILARI

Örneğin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda oluşturdukları biyofilm yapılarının belirlenmesi OD 595nm'de yapılan ölçümler sonucunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.1 ve Şekil 5.2).



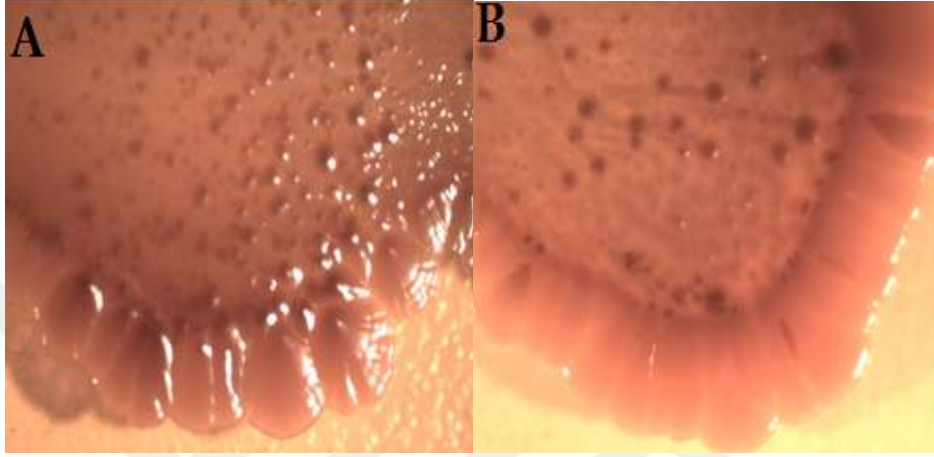
Şekil 5.1. *E. faecium* izolatlarının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda ürettikleri biyofilm miktarları



Şekil 5.2. *E. faecalis* izolatlarının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda ürettikleri biyofilm miktarları

5.2. İZOLATLARIN MORFOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

TSA besi ortamında beş gün boyunca 37 °C’de inkübasyon sonunda oluşan biyofilm yapıları stereo mikroskop (Leica EC3) ile görüntülenmiştir (Şekil 5.3). Mikroskobik inceleme sonucunda izolatların tamamının sahip olduğu biyofilm morfolojilerinin benzer olduğu görülmüştür.

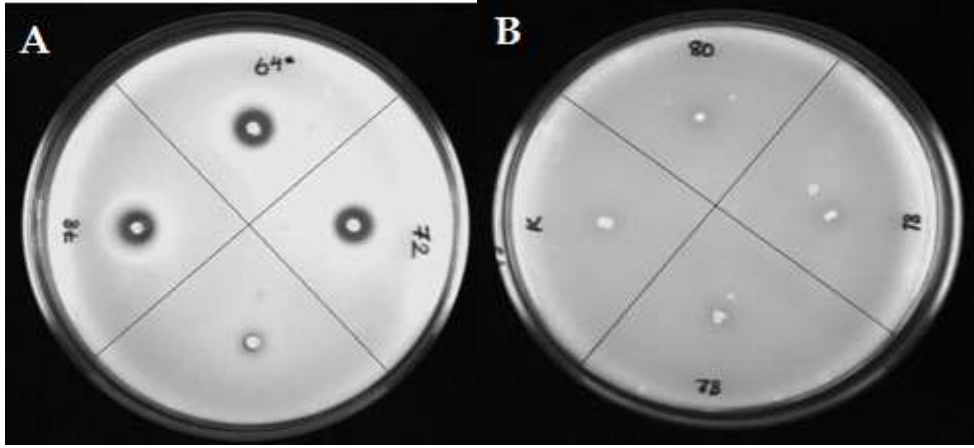


Şekil 5.3. İzolatların biyofilm morfortipleri

(A) *E. faecium* 24 izolatına ait biyofilm yapısı, (B) *E. faecalis* 114 izolatına ait biyofilm yapısı

5.3. ENTEROCOCCUS CİNSİ ÜYELERİNİN JELATİNAZ ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

18 saat inkübasyon sonrasında suşlar, kolonilerin etrafında oluşan berrak zonlara bakılarak negatif proteaz (-), zayıf proteaz (+), orta düzeyde proteaz (++) ve güçlü proteaz (+++) olarak değerlendirilmiştir (73) (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. İzolatların farklı proteaz düzeylerine örnekler

(A) Güçlü proteaz özelliğindeki izolatlar (B) Proteaz negatif izolatlar. K: proteaz negatif olduğu bilinen *E. faecalis* ATCC 29212 kontrol suşunu ifade etmektedir

Yapılan incelemeler sonucunda *E. faecium* izolatları içerisinde *E. faecium* 14 kodlu izolat jelatinaz üretim özelliği bakımından negatif bulunurken geri kalan tüm *E. faecium* izolatların zayıf düzeyde jelatinaz üreticisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.1). *E. faecalis* izolatlarının jelatinaz üretim özellikleri incelendiğinde, 4 adet izolat; *E. faecalis* 64, 72, 78, 140, güçlü jelatinaz üretim özelliğine sahip bulunurken, 2 izolatın (*E. faecalis* 79 ve 81) jelatinaz üretmediği gözlenmiştir. Geri kalan 9 izolat ise zayıf düzeyde jelatinaz üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.1. *E. faecium* izolatlarının jelatinaz üretim özellikleri

Suş Cinsi	Suş Kodu	Jelatinaz Üretimi*
<i>E. faecium</i>	1	+
<i>E. faecium</i>	2	+
<i>E. faecium</i>	3	+
<i>E. faecium</i>	4	+
<i>E. faecium</i>	5	+
<i>E. faecium</i>	6	+
<i>E. faecium</i>	7	+
<i>E. faecium</i>	8	+
<i>E. faecium</i>	9	+
<i>E. faecium</i>	10	+
<i>E. faecium</i>	11	+
<i>E. faecium</i>	12	+
<i>E. faecium</i>	13	+
<i>E. faecium</i>	14	-
<i>E. faecium</i>	15	+
<i>E. faecium</i>	16	+
<i>E. faecium</i>	17	+
<i>E. faecium</i>	20	+
<i>E. faecium</i>	21	+
<i>E. faecium</i>	22	+
<i>E. faecium</i>	23	+
<i>E. faecium</i>	24	+
<i>E. faecium</i>	25	+
<i>E. faecium</i>	29	+
<i>E. faecium</i>	36	+
<i>E. faecium</i>	60	+
<i>E. faecium</i>	61	+
<i>E. faecium</i>	71	+
<i>E. faecium</i>	77	+
<i>E. faecium</i>	101	+
<i>E. faecium</i>	106	+
<i>E. faecium</i>	110	+
<i>E. faecium</i>	134	+

*Negatif proteaz (-), zayıf proteaz (+), orta düzeyde proteaz (++), güçlü proteaz (+++)

Çizelge 5.2. *E. faecalis* izolatlarının jelatinaz üretim özellikleri

Suş Cinsi	Suş Kodu	Jelatinaz Üretimi*
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	-
<i>E. faecalis</i>	64	+++
<i>E. faecalis</i>	72	+++
<i>E. faecalis</i>	73	+
<i>E. faecalis</i>	74	+
<i>E. faecalis</i>	78	+++
<i>E. faecalis</i>	79	-
<i>E. faecalis</i>	80	+
<i>E. faecalis</i>	81	-
<i>E. faecalis</i>	82	+
<i>E. faecalis</i>	114	+
<i>E. faecalis</i>	117	+
<i>E. faecalis</i>	119	+
<i>E. faecalis</i>	122	+
<i>E. faecalis</i>	139	+
<i>E. faecalis</i>	140	+++

*Negatif proteaz (-), zayıf proteaz (+), orta düzeyde proteaz (++) , güçlü proteaz (+++)

5.4. FARKLI GLUKOZ KONSANTRASYONLARININ *E. faecalis* VE *E. faecium* ÖRNEKLERİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Farklı oranlarda (%0.5 , %1, %1.5 ve %2) glukoz içeren TSB ortamlarının bulunduğu 96 kuyulu mikrodilüsyon plaklarına 200'er µL inokülasyonları gerçekleştirilen *E. faecalis* ve *E. faecium* örneklerinin inkübasyon süresi bitiminde ürettikleri biyofilm miktarlarının ölçümü için uygulanan fiksasyon ve boyama basamakları daha önce belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından, 570 nm dalga boyunda absorbanlar ölçülerek farklı glukoz konsantrasyonlarının biyofilm üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Belirlenen biyofilm üretim düzeyleri Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4' te gösterilmektedir.

İncelenen *E. faecium* örneklerinden 14, 36 ve 71 kodlu suşlar %0.5 glukoz içeren TSB ortamında zayıf düzeyde biyofilm üretirken, ortamdaki glukozun %0.1 düzeyine çıkması halinde orta düzeyde biyofilm üretmişlerdir. 61 kodlu suş %0.5 glukoz içeren TSB ortamında hiç biyofilm yapısı üretmezken, ortamdaki glukoz %0.1 oranında iken zayıf biyofilm üretimi gerçekleştirmişlerdir. Benzer şekilde 60 kodlu suş %0.25 glukoz içeren TSB ortamında hiç biyofilm yapısı üretmezken, ortamdaki glukoz konsantrasyonu %0.75' e yükseldiğinde orta düzeyde biyofilm üretimi gerçekleştirmiştir.

Genel olarak tüm *E. faecium* izolatları glukoz içeren TSB ortamında (%0.5 , %1, %1.5 ve %2) incelendiğinde optimum biyofilm üretimi %1 glukoz içeren TSB ortamında gerçekleştiği gözlemlenmiştir. *E. faecium* 2 ve 134 kodlu suşların haricindeki tüm *E. faecium* suşlarının biyofilm üretim düzeyleri, ortamın glukoz konsantrasyonu %1.5 ve %2 düzeyine yükseltildiğinde azalmıştır.

E. faecium örnekleri incelendiğinde, 17 suş (%51.5) denenen glukoz konsantrasyonlarının hiçbirinde biyofilm yapısı üretmezken, geriye kalan 16 suşun 14'ü maksimum biyofilm üretim düzeyine %1 glukoz içeren TSB besi ortamında geliştirildiklerinde ulaşmıştır. Diğer 2 suş ise (61 ve 134 kodlu örnekler) maksimum biyofilm üretim düzeyine %1.5 oranında glukoz içeren ortamda geliştirildiklerinde ulaşmışlardır.



Çizelge 5.3. *E. faecium* izolatlarının biyofilm üretimleri üzerine glukozun etkisi

Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Üretilen Biyofilm Miktarları					
Suşun Cinsi	Suşun Kodu	%0.5 Glukoz	%1 Glukoz	%1.5 Glukoz	%2 Glukoz
<i>E. faecium</i>	1	0.197	0.299	0.229	0.295
<i>E. faecium</i>	2	0.545	0.639	0.340	0.522
<i>E. faecium</i>	3	0.176	0.280	0.262	0.264
<i>E. faecium</i>	4	0.183	0.255	0.228	0.267
<i>E. faecium</i>	5	0.190	0.253	0.227	0.235
<i>E. faecium</i>	6	0.202	0.258	0.233	0.229
<i>E. faecium</i>	7	0.212	0.263	0.251	0.242
<i>E. faecium</i>	8	0.243	0.285	0.247	0.240
<i>E. faecium</i>	9	0.231	0.328	0.266	0.305
<i>E. faecium</i>	10	0.195	0.267	0.257	0.270
<i>E. faecium</i>	11	0.331	0.458	0.438	0.381
<i>E. faecium</i>	12	2.228	2.723	2.665	1.931
<i>E. faecium</i>	13	0.212	0.352	0.321	0.340
<i>E. faecium</i>	14	0.893	1.394	1.091	1.069
<i>E. faecium</i>	15	2.204	2.967	2.753	1.995
<i>E. faecium</i>	16	0.331	0.438	0.422	0.341
<i>E. faecium</i>	17	2.119	3.209	2.794	2.440
<i>E. faecium</i>	20	0.355	0.469	0.435	0.429
<i>E. faecium</i>	21	0.302	0.404	0.278	0.273
<i>E. faecium</i>	22	0.243	0.304	0.257	0.282
<i>E. faecium</i>	23	0.222	0.301	0.255	0.256
<i>E. faecium</i>	24	1.916	2.142	2.048	2.007
<i>E. faecium</i>	25	1.429	2.248	1.913	1.919
<i>E. faecium</i>	29	1.111	1.499	1.419	1.342
<i>E. faecium</i>	36	0.847	1.343	1.338	0.989
<i>E. faecium</i>	60	2.639	3.146	2.338	2.895
<i>E. faecium</i>	61	0.441	0.653	0.749	0.692
<i>E. faecium</i>	71	0.986	1.329	1.270	1.260
<i>E. faecium</i>	77	0.278	0.465	0.365	0.440
<i>E. faecium</i>	101	0.758	0.955	0.628	0.590
<i>E. faecium</i>	106	1.171	1.236	1.201	1.228
<i>E. faecium</i>	110	0.684	0.755	0.568	0.560
<i>E. faecium</i>	134	0.653	0.791	0.845	0.712

Test edilen 15 adet *E. faecalis* izolatının 5 suş (%33) maksimum biyofilm üretimini %1 oranında glukoz içeren TSB besi ortamında geliştirilmesi sonucunda gerçekleştirmiştir. *E. faecalis* izolatlarının %46.6'sı (izolatların 7'si) %1.5 oranında glukoz içeren ortamda maksimum biyofilm üretim düzeyine ulaşmıştır. Test edilen *E. faecalis* izolatlarından yalnızca 1 tanesi (80 kodlu izolat) maksimum biyofilm üretimini gelişme ortamına %2 oranında glikoz ilavesi sonucunda gerçekleştirmiştir. 82 ve 117 kodlu suşlar ise hiçbir koşulda biyofilm üretmemiştir. *E. faecalis* ATCC29212 ve *E. faecalis* OG1RF kontrol suşlarının en yüksek biyofilm üretimleri %1 glukoz içeren TSB ortamlarında gerçekleşmiştir.

Çizelge 5.4. *E. faecalis* izolatlarının biyofilm üretimleri üzerine glukozun etkisi

Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Üretilen Biyofilm Miktarları					
Suşun Cinsi	Suşun Kodu	%0.5 Glukoz	%1 Glukoz	%1.5 Glukoz	%2 Glukoz
<i>E. faecalis</i>	64	0.571	0.680	1.001	0.882
<i>E. faecalis</i>	72	0.534	0.610	0.716	0.506
<i>E. faecalis</i>	73	0.513	0.587	0.747	0.560
<i>E. faecalis</i>	74	1.225	1.344	1.923	1.850
<i>E. faecalis</i>	78	0.611	0.769	0.730	0.641
<i>E. faecalis</i>	79	1.498	2.004	1.759	1.548
<i>E. faecalis</i>	80	0.513	0.563	0.520	0.666
<i>E. faecalis</i>	81	0.520	0.660	0.592	0.634
<i>E. faecalis</i>	82	0.284	0.397	0.360	0.312
<i>E. faecalis</i>	114	1.752	1.898	1.621	1.836
<i>E. faecalis</i>	117	0.353	0.468	0.427	0.275
<i>E. faecalis</i>	119	0.586	0.711	1.741	0.722
<i>E. faecalis</i>	122	0.659	0.829	0.826	0.507
<i>E. faecalis</i>	139	0.631	0.714	0.779	0.599
<i>E. faecalis</i>	140	0.619	0.682	1.020	0.592
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212	0.490	0.967	0.938	0.665
<i>E. faecalis</i>	OG1RF	1.161	1.371	1.195	1.302

Kontrollerin de dahil olduğu toplam 50 adet *E. faecalis* ve *E. faecium* örneğinin 22 tanesi (suşların %44'ü) %1 glukoz konsantrasyonda, 9 tanesi (suşların %18'i) %1.5 glukoz konsantrasyon ve 1 tanesi (suşların %2'si) %2 glukoz konsantrasyonda optimum biyofilm üretimi göstermiştir. Ayrıca test edilen izolatlar arasında 18 suş (suşların %42'si) denenen hiçbir glukoz konsantrasyonunda biyofilm üretmemiştir.

5.5. ÖRNEKLERDE *esp* GENİNİN ARAŞTIRILMASI

esp geninin Enterokok izolatlarından saflaştırılan DNA'da araştırılması amacı ile yapılan denemelerde; yalnızca 2 *E. faecium* (60 ve 134 kodlu izolatlar) ve 2 *E. faecalis* (81 ve 119 kodlu izolatlar) izolatında kullanılan primer çiftleri (*esp* 2-5, *esp* 11-12 ve *esp* 46-47) ile yürütülen PZR çalışması sonucunda istenilen bölgelerde bantlar tespit edilmiştir. *esp* 2-5 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR sonucunda 2222 bç, *esp* 11-12 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR sonucunda 954 bç ve son olarak *esp* 46-47 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR sonucunda 468bç büyüklüğünde amplikonlar elde edilmiştir (Şekil 5.5, Şekil 5.6., Şekil 5.7. ve Şekil 5.8). Tekrar sayılarının belirlenmesi amacı ile Toledo-Arana vd. (2001) tarafından önerilen formülden yararlanılmıştır.

Bu amaçla A tekrar bölgesi sayılarının hesaplanması:

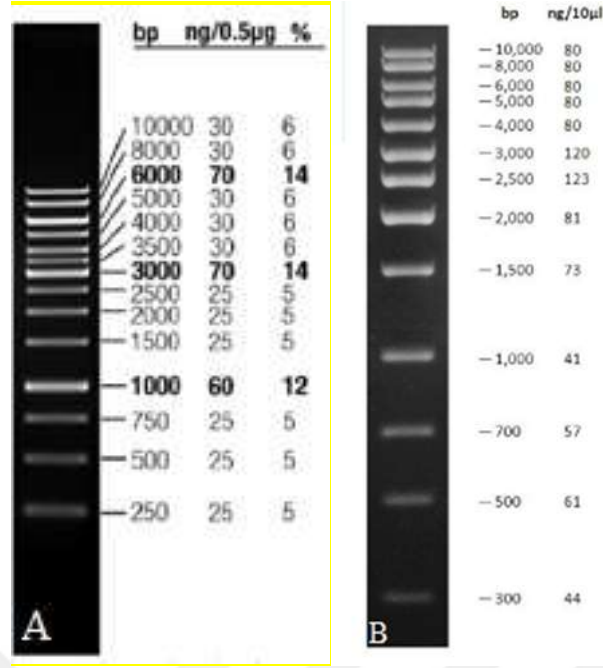
$$n_A = (f_{APZR} - 182) / 252$$

C tekrar bölgesi sayılarının hesaplanması:

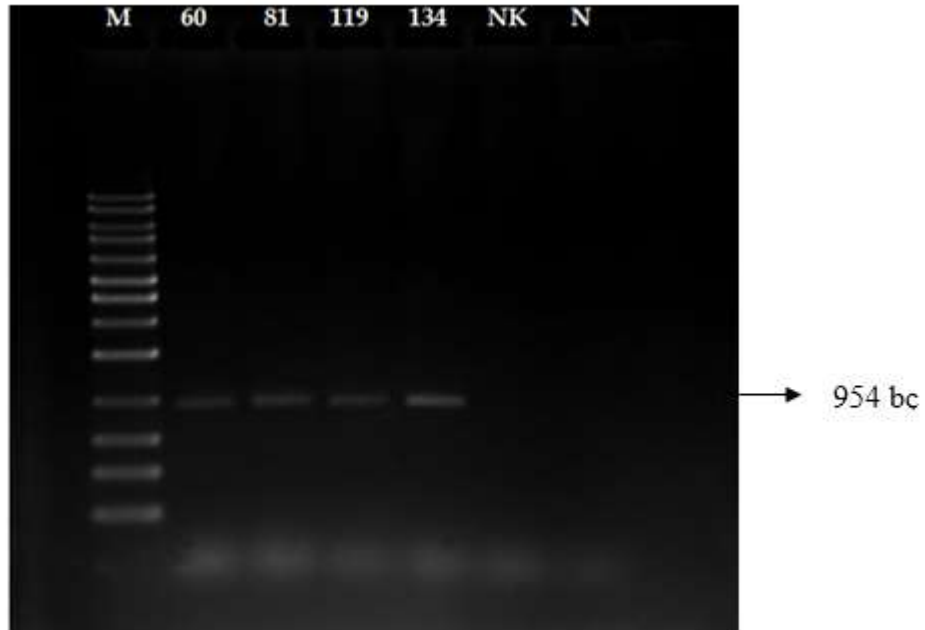
$$n_C = (f_{CPZR} - 384) / 246 \text{ formülleri kullanılarak hesaplanmıştır.}$$

Yapılan hesaplamalar sonucunda çalışılan örneklerde 1 adet A tekrar bölgesi

[$n_A = (468 - 182) / 252 = 1.11$] ve 7 adet C tekrar bölgesi [$n_C = (2222 - 384) / 246 = 7.47$] tespit edilmiştir.

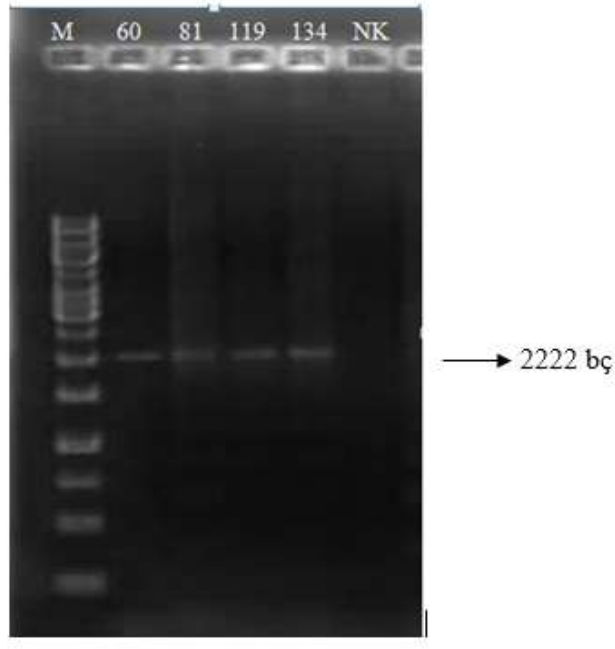


Şekil 5.5. Çalışmada kullanılan moleküler markerlar (1 kb DNA ladder, A; Fermentas, B; Solis Biodyne)



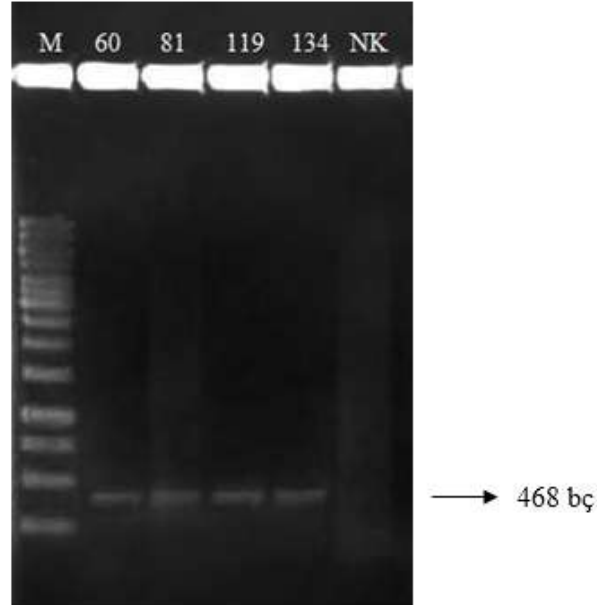
Şekil 5.6. esp 11-12 primer çifti kullanılarak izolatlarda çoğaltılan esp geninin agaroz jel görüntüsü.

M; Marker (Solis Biodyne), NK; Negatif Kontrol olarak kullanılan *E. faecalis* ATCC29212, N; Negatif (kalıp DNA yerine su içeren PZR karışımı ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünü)



Şekil 5.7. esp 2-5 primer çifti kullanılarak izolatlarda çoğaltılan *esp* geninin agaroz jel görüntüsü

M; Marker (Fermantas), NK; Negatif (kalıp DNA yerine su içeren PZR karışımı ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünü)



Şekil 5.8. esp 46-47 primer çifti kullanılarak izolatlarda çoğaltılan *esp* geninin agaroz jel görüntüsü

M; Marker (Fermantas), NK; Negatif (kalıp DNA yerine su içeren PZR karışımı ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünü)

5.6. ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN ENTEROKOKAL BİYOFİMLER ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Yapılan MIC denemeleri sonucunda saptanan değerler CLSI tarafından verilen kırılma noktaları ile karşılaştırılarak dirençli (R), orta derecede dirençli (I) ya da duyarlı (S) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6). Çalışma sonucunda biyofilm üreticisi olduğu belirlenen Enterokok cinsi üyeleri ile MBIC denemesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5.7 ve Çizelge 5.8’de sunulmuştur.



Çizelge 5.5. *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık düzeyleri

ANTİBİYOTİKLER											
Suş No	AMP	STR	NAL	KAN	EN	CHL	TET	RIF	VAN	ERT	CIP
1	S	R	R	I	S	S	S	R	I	R	I
2	R	R	R	I	S	S	S	S	I	R	S
3	S	R	R	I	S	S	S	R	I	R	S
4	S	I	R	I	S	S	S	R	R	R	I
5	S	I	R	I	S	S	S	R	I	R	S
6	S	R	R	I	S	S	S	R	I	R	I
7	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I
8	S	R	R	I	S	S	S	R	I	R	S
9	S	R	R	R	S	S	S	R	I	R	I
10	S	I	R	R	I	S	S	R	S	I	I
11	S	R	R	I	S	S	S	R	I	R	I
12	S	I	R	I	S	S	S	S	I	I	I
13	S	R	R	I	S	S	S	S	R	R	S
14	S	I	R	I	S	S	S	S	I	I	I
15	S	S	R	R	S	S	S	S	S	I	S
16	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I
17	S	I	R	I	S	S	S	S	I	I	I
20	S	R	R	I	S	S	S	I	S	R	S
21	S	R	R	I	S	S	S	R	S	R	I
22	R	R	R	R	S	S	S	R	I	R	I
23	S	R	R	R	I	S	S	S	S	I	I
24	S	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S
25	S	I	R	I	S	S	S	S	I	R	I
29	S	R	R	I	S	S	S	R	I	R	S
36	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	I
60	S	R	R	R	I	S	S	R	S	I	S
61	S	R	R	I	S	I	S	R	R	I	I
64	S	R	R	I	I	S	S	R	S	I	S
71	R	I	R	I	S	I	S	R	I	R	S
72	S	R	R	R	R	S	S	R	S	I	S
73	S	I	R	I	S	S	I	R	I	R	S
74	S	R	R	I	S	I	I	R	I	R	I
77	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I
78	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I

*AMP; Ampisilin, STR; Streptomisin, NAL; Nalidiksik Asit, KAN; Kanamisin, GEN; Gentamisin, CHL; Kloramfenikol, TET; Tetrasiklin, RIF; Rifampisin, VAN; Vankomisin, ERT; Eritromisin, CIP; Siprofiloksasin, R; Dirençli, S; Duyarlı, I; Orta Seviyede Dirençli, K; Kontrol Suş *E. faecalis* ATCC 29212

Çizelge 5.5. *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılık düzeyleri (devam)

ANTİBİYOTİKLER											
Suş No	AMP	STR	NAL	KAN	GEN	CHL	TET	RIF	VAN	ERT	CIP
79	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I
80	S	R	R	R	R	S	S	R	S	I	I
81	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
82	S	R	R	R	S	S	I	R	R	R	S
101	S	R	R	R	S	I	R	R	R	R	S
106	S	R	R	I	S	S	R	R	I	I	I
110	S	I	R	I	S	R	S	R	R	R	I
114	S	R	R	I	S	S	S	S	I	I	I
117	S	I	R	I	S	R	R	I	R	R	I
119	S	R	R	R	S	I	R	R	R	R	I
122	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	I
134	R	I	R	I	S	S	R	R	R	R	I
139	S	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S
140	S	R	R	I	S	R	R	R	R	R	S
K	S	S	R	R	S	S	I	I	S	I	I

*AMP; Ampisilin, STR; Streptomisin, NAL; Nalidiksik Asit, KAN; Kanamisin, GEN; Gentamisin, CHL; Kloramfenikol, TET; Tetrasiklin, RIF; Rifampisin, VAN; Vankomisin, ERT; Eritromisin, CIP; Siprofiloksasin, R; Dirençli, S; Duyarlı, I; Orta Seviyede Dirençli, K; Kontrol Suş *E. faecalis* ATCC 29212

Çizelge 5.6. *Enterococcus* suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri (µg/ml) (MIC denemesi)

ANTİBİYOTİKLER											
Suş No	AMP	STR	NAL	KAN	GEN	CHL	TET	RIF	VAN	ERT	CIP
1	S	>1024	256	I	S	S	S	<8	I	8	R
2	16	>1024	256	I	S	S	S	S	I	>512	S
3	S	>1024	256	I	S	S	S	>512	I	128	I
4	S	I	256	I	S	S	S	<8	<8	<8	R
5	S	I	256	I	S	S	S	<8	I	16	I
6	S	>1024	256	I	S	S	S	64	I	64	R
7	S	64	512	I	S	S	S	32	<8	8	R
8	S	256	256	I	S	S	S	64	I	32	I
9	S	>1024	256	>2048	S	S	S	>512	I	>512	R
10	S	32	256	64	8	S	S	8	>512	I	R
11	S	512	256	I	S	S	S	256	I	256	R
12	S	I	256	I	S	S	S	S	I	I	I
13	S	<16	>2048	I	S	S	S	S	128	256	S
14	S	I	256	I	S	S	S	S	I	I	R
15	S	S	512	64	S	S	S	S	256	I	S
16	S	<16	>2048	I	S	S	S	>512	128	128	I
17	S	I	256	I	S	S	S	S	I	I	R
20	S	64	>2048	I	S	S	S	I	S	256	S
21	S	>1024	256	I	S	S	S	256	S	>512	R
22	128	>1024	512	1024	S	S	S	256	I	>512	I
23	S	32	256	128	8	S	S	8	S	I	R
24	S	I	256	I	S	S	S	S	S	<8	S
25	S	I	256	I	S	S	S	S	I	>512	R
29	S	>1024	256	I	S	S	S	>512	I	512	S
36	8	64	512	32	S	S	I	16	256	128	I
60	S	64	2048	32	8	S	S	8	S	I	S
61	S	64	256	I	S	I	S	<8	64	I	R
64	S	128	2048	32	8	S	S	8	S	I	S
71	>1024	I	256	I	S	I	S	128	I	64	S
72	S	64	256	128	16	S	S	4	S	I	S
73	S	I	256	I	S	S	I	>512	I	>512	S
74	S	>1024	256	I	S	I	I	>512	I	>512	R
77	S	>1024	256	I	S	S	S	>512	>512	>512	R
78	S	256	1024	512	S	S	S	256	256	256	R

*AMP; Ampisilin, STR; Streptomisin, NAL; Nalidiksik Asit, KAN; Kanamisin, GEN; Gentamisin, CHL; Kloramfenikol, TET; Tetrasiklin, RIF; Rifampisin, VAN; Vankomisin, ERT; Eritromisin, CIP; Siprofiloksasin, R; Dirençli, S; Duyarlı, I; Orta Seviyede Dirençli

Çizelge 5.6. *Enterococcus* suşlarında antibiyotik dirençlilik düzeyleri (µg/ml) (MIC denemesi) (devamı)

Antibiyotikler											
Suş No	AMP	STR	NAL	KAN	GEN	CHL	TET	RIF	VAN	ERT	CIP
79	>1024	>1024	256	>2048	S	S	S	>512	512	512	R
80	S	16	512	64	4	S	S	16	S	I	R
81	>1024	>1024	512	1024	512	1024	1024	>512	>512	I	I
82	S	>1024	128	1024	S	S	I	>512	>512	>512	S
101	S	>1024	256	1024	S	I	1024	>512	>512	>512	S
106	S	32	256	I	S	S	256	16	I	I	R
110	S	I	128	I	S	512	S	>512	256	32	R
114	S	R	256	I	S	S	S	S	I	I	R
117	S	I	256	I	S	256	512	I	>512	128	I
119	S	>1024	512	64	S	I	>2048	>512	>512	>512	I
122	>1024	>1024	256	1024	S	I	256	256	>512	>512	R
134	>1024	I	256	I	S	S	>2048	>512	>512	>512	I
139	S	>1024	256	I	S	1024	>2048	>512	>512	>512	S
140	S	>1024	256	I	S	I	256	>512	>512	>512	S
K	S	S	R	32	S	S	16	S	S	S	S

*AMP; Ampisilin, STR; Streptomisin, NAL; Nalidiksik Asit, KAN; Kanamisin, GEN; Gentamisin, CHL; Kloramfenikol, TET; Tetrasiklin, RIF; Rifampisin, VAN; Vankomisin, ERT; Eritromisin, CIP; Siprofiloksasin, R; Dirençli, S; Duyarlı, I; Orta Seviyede Dirençli, K; Kontrol Suş *E. faecalis* ATCC 29212

Çizelge 5.7. Gentamisin antibiyotiği için MBIC sonuçları

Suş kodu	MIC değeri	MBIC değeri	MBIC/MIC
12	S	32768<	-
14	S	32768<	-
15	S	32768<	-
17	S	32768<	-
71	S	32768	-
101	S	32768	-
24	S	32768<	-
25	S	32768<	-
29	S	32768	-
106	S	32768<	-
110	S	32768<	-
73	S	32768	-
74	S	32768<	-
79	S	32768<	-
114	S	32768<	-
ATCC29212	S	2048	-

* I; Orta Seviyede Dirençli, S; Duyarlı

Çizelge 5.8. Vankomisin antibiyotiği için MBIC sonuçları

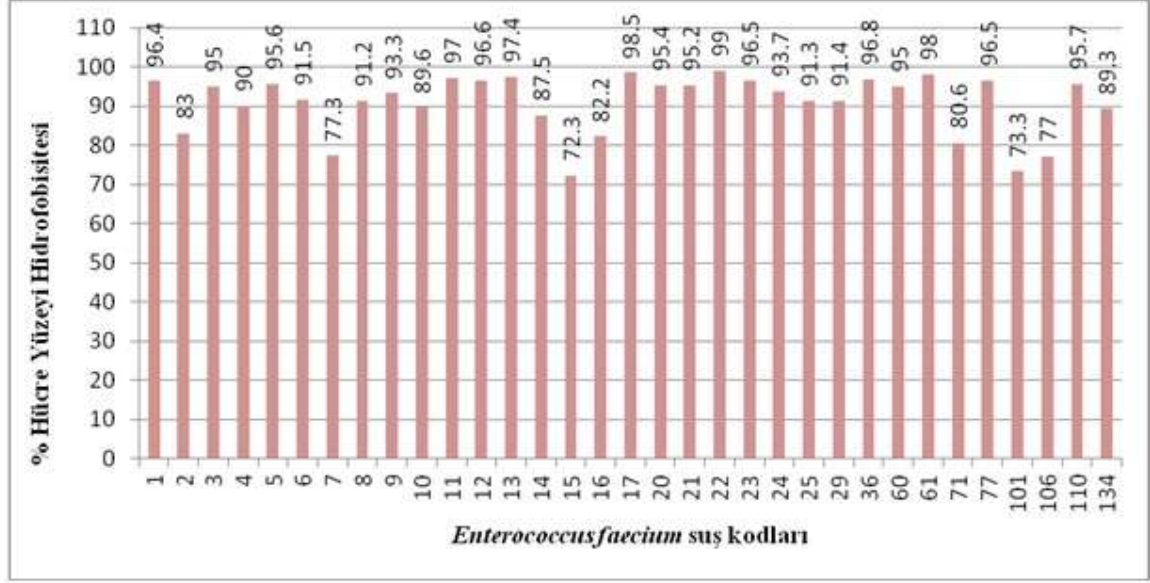
Suş kodu	MIC değeri	MBIC değeri	MBIC/MIC
12	I	512	-
14	I	2048	-
15	256	32768	128
17	I	1024	-
71	I	8192	-
101	>512	8192	>16
24	S	16384	-
25	I	8192	-
29	I	1024	-
106	I	2048	-
110	256	4096	16
73	I	2048	-
74	I	2048	-
79	256	8192	32
114	I	2048	-
ATCC29212	I	1024	-

* I; Orta Seviyede Dirençli, S; Duyarlı

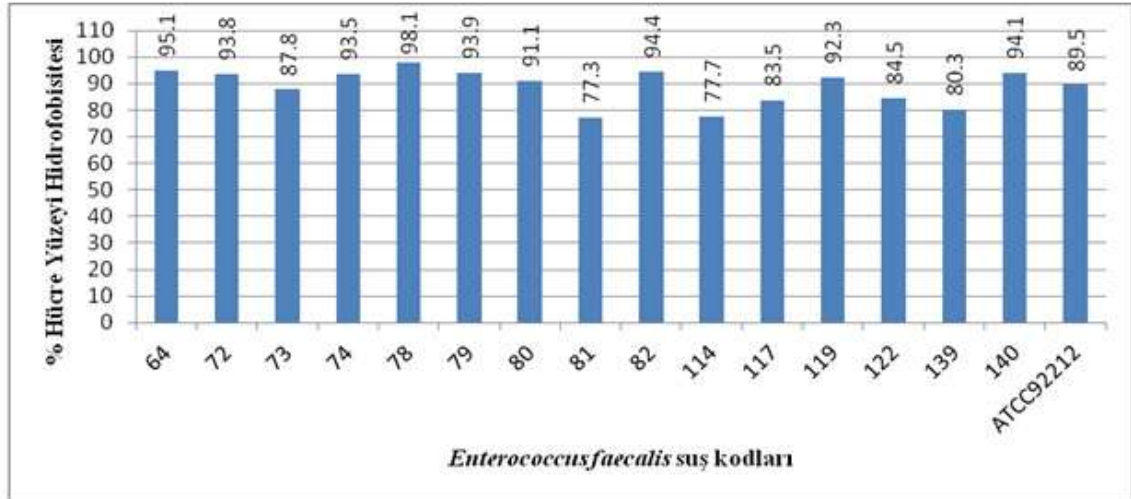
5.7. HÜCRE YÜZEYİ HİDROFOBİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

E. faecium ve *E. faecalis* örneklerinin hücre yüzeyi hidrofobisitesinin yüzdesi, aşağıda belirtilen formül kullanılarak organik fazdaki bakteri sayısının oranlanması ile hesaplanmıştır (Şekil 5.9 ve Şekil 5.10).

$$\% \text{ Hücre yüzeyi hidrofobisitesi} = [1 - (\text{Son OD}_{400} / \text{Başlangıç OD}_{400})] \times 100$$



Şekil 5.9. *Enterococcus faecium* suşlarının hücre yüzey hidrofobisitesi yüzdeleri



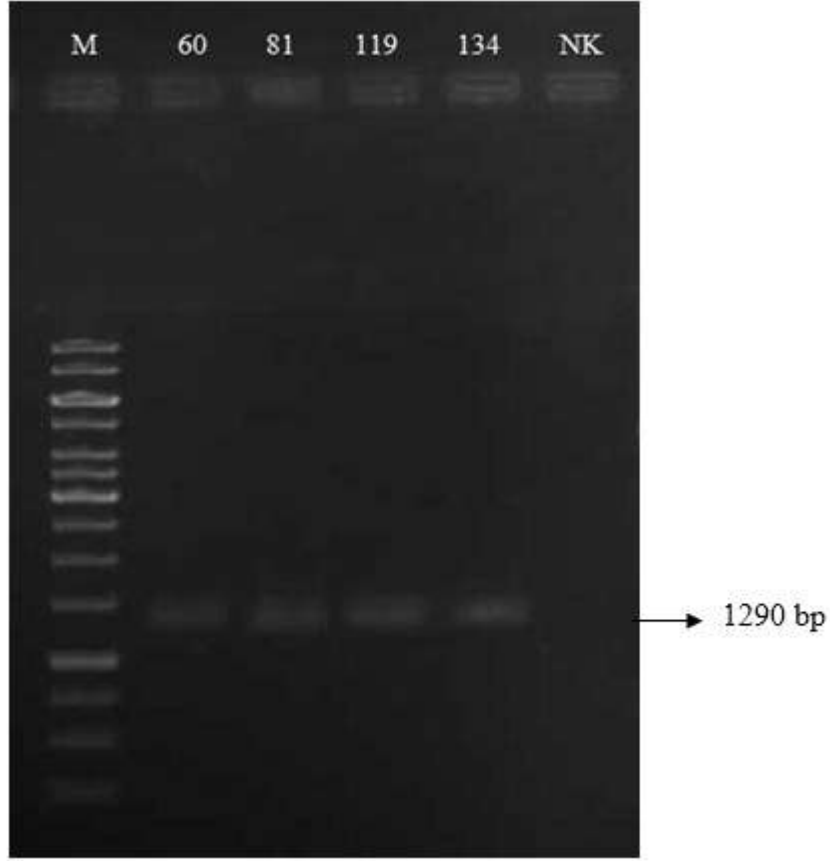
Şekil 5.10. *Enterococcus faecalis* suşlarının hücre yüzey hidrofobisitesi yüzdeleri

E. faecium suşları arasında en yüksek hidrofobisite düzeyi 22 kodlu *E. faecium* (%99) izolatında belirlenirken, en düşük hidrofobisite düzeyi 15 kodlu *E. faecium* (%72.3) izolatında belirlenmiştir.

E. faecalis suşları açısından durum değerlendirildiğinde ise, 78 kodlu *E. faecalis* izolatı en yüksek düzeyde hidrofobisiteye sahipken (%98.1), en düşük hidrofobisite düzeyi 81 kodlu *E. faecalis* (%77.7) izolatında belirlenmiştir.

5.8. ESP PROTEİNİNİN N-TERMINAL BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

esp genini içerdiği tespit edilen 2 *E. faecium* (60 ve 134 kodlu izolatlar) ve 2 *E. faecalis* (81 ve 119 kodlu izolatlar) örneğinin *esp* genlerinin N-terminal bölgelerinin çoğaltılmasında restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içeren Esp1 (5'-ACGAATTCACCATG GGA ACG CCT TGG TAT-3') ve esp-2 (5'-ATGCTAGCTTATAC TGC TAA ATC GGT CGT-3') primerleri kullanılmıştır. Yürütülen PZR denemesi sonunda elde edilen amplikonlar %2'lik agaroz jelde 1h 100 V akımda yürütüldükten sonra 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında incelenmiş ve Şekil 5.11.'deki görüntü elde edilmiştir. Çoğaltılan gen bölgesi istenilen bölgede yer almaktadır.



Şekil 5.11. İzolatlarda çoğaltılan *esp* geninin N terminal bölgesinin agaroz jel görüntüsü
M; Marker (Fermantas), NK; Negatif (DNA içermeyen PZR mixi ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünü)

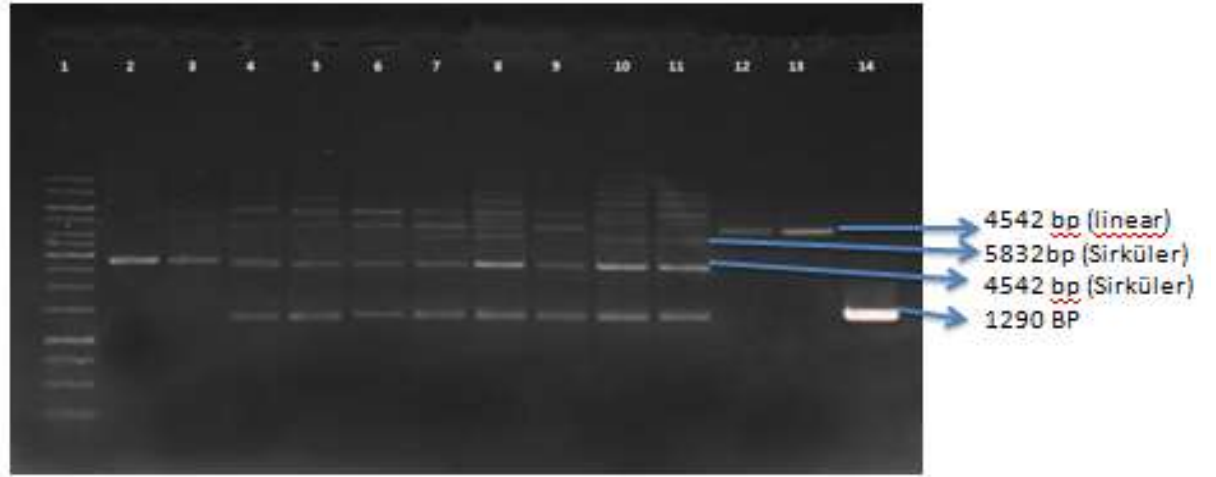
5.9. *esp* GENİNİN N-TERMINAL BÖLGESİNİN DNA DİZİ ANALİZ

Çoğaltılan *esp* N-terminal gen bölgesinin klonlanması basamağı öncesinde bir önceki aşamada çoğaltılan 1290 bp'lik bölgenin istenilen N-terminal gen bölgesi olduğunun doğrulanması için DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.9'da anlatılan basamaklar izlenerek elde edilen nükleik asit dizisi, veri tabanında (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) bulunan DNA dizileri ile kıyaslanmış ve sonuçta *E. faecalis esp* geni ile %98 benzerliğe sahip olduğu saptanmıştır (Ek 2). DNA dizi analizi ile istenilen bölgenin çoğaltıldığının belirlenmesinin ardından klonlama çalışmalarına geçilmiştir.

5.10. ESP PROTEİNİNİN N-TERMINAL BÖLGESİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLAMASI

DNA dizi analizi sonucunda PZR reaksiyonu ile istenilen gen bölgesinin çoğaltıldığı belirlenmiş ve klonlama basamağına geçilmiştir. Hem pBAD24 vektörü hem de Esp proteininin N-terminal bölgesini kodlayan gen aynı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş, ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve pBAD24 vektörüne klonlanmıştır. Bu işlemlerin kontrolü yine restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ve agaroz jel elektroforezi basamakları sırası ile gerçekleştirilerek sağlanmıştır.

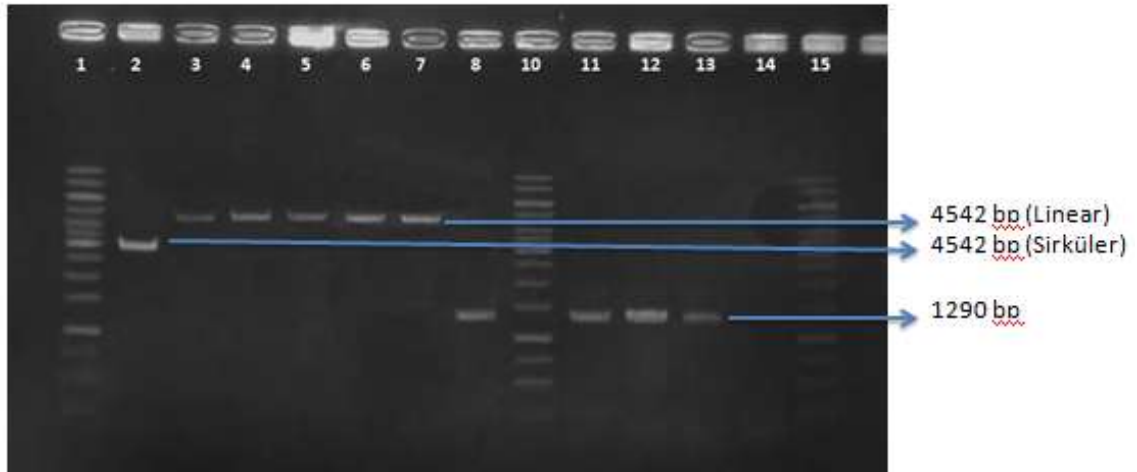
4.5 kb büyüklüğündeki pBAD24 vektörüne 1290 bp'lik *esp* N-terminal gen bölgesinin ilavesi ile pBAD24+N-terminal bölge büyüklüğü yaklaşık 5750 bp'e ulaşmıştır. Yalnızca pBAD24 ligasyon reaksiyonu ürününün yüklendiği kuyudaki bant büyüklüğünün yaklaşık 4.5 kb oluşu, ligasyon reaksiyonunun başarı ile gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Jel görüntüsünde kuyularda birden fazla bantın gözlenmesi, halkasal plazmid DNA'nın farklı formlarından (örneğin; süperhalkasal DNA hali) ileri gelmektedir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. Ligasyon sonrası elde edilen vektörlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Kuyu No	Kuyu İeriği
1	Marker 1kb (Fermentas)
2	pBAD Vektörü
3	pBAD Vektörün ligasyon kontrolu
4	pBAD24 Vektörü + insert
5	pBAD24 Vektörü + insert
6	pBAD24 Vektörü + insert
7	pBAD24 Vektörü + insert
8	pBAD24 Vektörü + insert
9	pBAD24 Vektörü + insert
10	pBAD24 Vektörü + insert
11	pBAD24 Vektörü + insert
12	Negatif kontrol
13	pBAD24 Vektörü tek enzim kesimi
14	<i>esp</i> N-terminal PZR ürünü NheI

Kesim sonrasında sirküler formdaki vektörün lineer hale gelmesi sonucu enzim kesiminin gerçekleştiği anlaşılmıştır. Kesim reaksiyonundan 5 µL alınarak 1 µL 6x yükleme boyası ile karıştırılmış ve %0.8'lik agaroz jellerde koşturulmuştur. EtBr boyaması sonucunda UV ışık altında jeller incelenmiştir. Tek restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilen örnekler 3-7 numaralı kuyulara yüklenmiş ve beklenildiği üzere pBAD24 vektörünün büyüklüğü olan 4500 bp'lik bölgede tek bant gözlenmiştir. 11-13 numaralı kuyularda ise *esp* N-terminal bölgesinin büyüklüğü olan 1200 bp'lik bölgede bant görülmesi, bu genin vektöre klonlanabildiğinin göstergesi olmuştur (Şekil 5.13.).

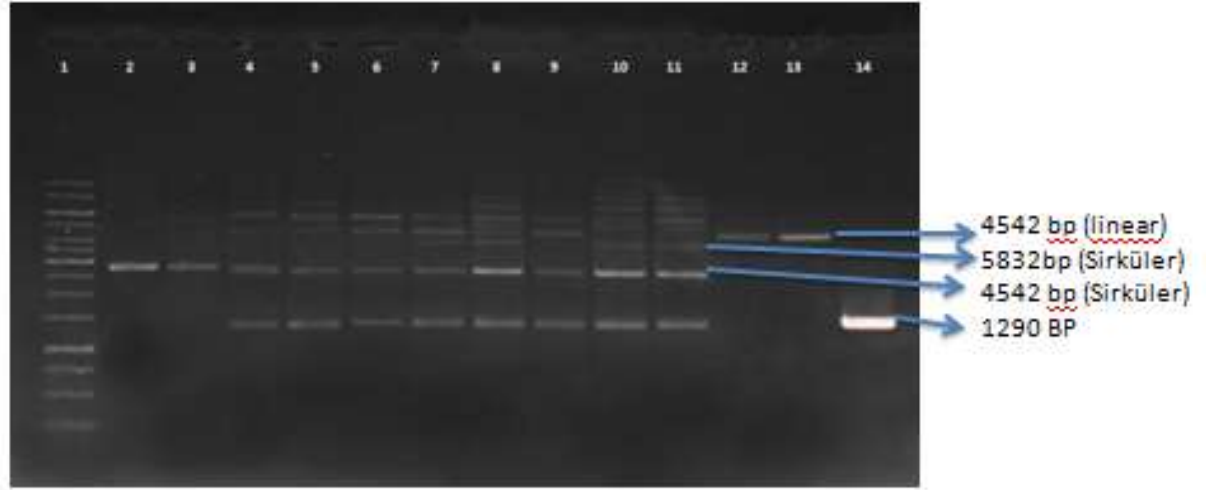


Şekil 5.13. *esp* geni aktarılmış vektörün enzim kesimi ile kontrolü

Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	Marker 1kb (Fermentas)
2	pBAD24 Vektörü
3	pBAD24 EcoRI enzim kesimi (Fermentas)
4	pBAD24 NheI(BioLabs) enzim kesimi
5	pBAD24 NheI(Fermentas) – EcoRI (Fermentas) ikili enzim kesimi
6	pBAD24 NheI-HF(BioLabs) – EcoRI (Fermentas) ikili enzim kesimi
7	pBAD24 NheI-HF (BioLabs) – EcoRI (Fermentas) ikili enzim kesimi
8	<i>esp</i> N-terminal PZR ürünü NheI enzim kesimi
9	Marker 1kb (Fermentas)
10	<i>esp</i> N-terminal PZR ürünü NheI (Fermentas) – EcoRI (Fermentas) ikili enzim kesimi
11	<i>esp</i> N-terminal PZR ürünü NheI-HF(BioLabs) – EcoRI (Fermentas) ikili enzim kesimi
12	<i>esp</i> N-terminal PZR ürünü NheI-HF(BioLabs) – EcoRI (Fermentas) ikili enzim kesimi
13	Negatif Kontrol
14	Marker 1kb (Fermentas)

5.11. *esp* GENİ N-TERMİNAL BÖLGESİNİ İÇEREN pBAD24 VEKTÖRÜNÜN *Escherichia coli* DH5 ALPHA VE *Salmonella* Typhimurium LT2'YA AKTARIMI

RT-PZR denemeleri için *esp* geninin doğru şekilde klonlandığı önceki basamaklarda gösterilen pBAD24 vektörü *Escherichia coli* DH5 α ve *Salmonella* Typhimurium LT2'ya Bölüm 4.2.11'de anlatılan basamaklar takip edilerek transforme edilmiş ve transformantlar Amp (100 μ g/mL) içeren ortamlarda seçilerek plazmid izolasyonu basamağına geçilmiştir. Plazmid izolasyonu sonuçları Şekil 5.14'de gösterilmiştir. Boş pBAD24 vektörünün 4.5 kb (12 ve 13 numaralı kuyular) olduğu ve *esp* geninin N-terminal bölgesinin 1290 bp olduğu göz önüne alındığında *esp* N-terminal bölgesini kodlayan gen pBAD24 vektörüne lige oldu ise vektör büyüklüğünün yaklaşık 5.8 kb olması beklenmektedir. Şekil 5.14' de 4-13 numaralı kuyulardaki plazmidlerin istenilen geni içine aldığı görülmektedir.



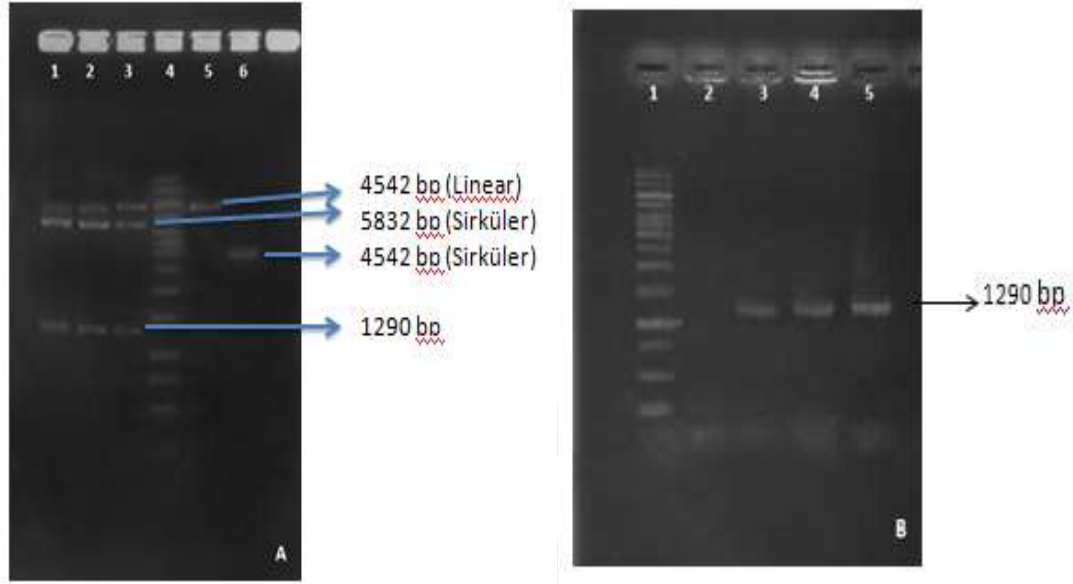
Şekil 5.14. Transformantlardan izole edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü

Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	Marker- 1kb (Fermentas)
2	Marker- supercoiled (Sigma)
3	pBAD24 Vektörü
4	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
5	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
6	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
7	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
8	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
9	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
10	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
11	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid
12	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (kesim sonrası lineer plazmid)
13	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (kesim sonrası lineer plazmid)
14	Esp geni

5.12. TRANSFORMASYON REAKSİYONUNUN KONTROLÜ

Transformasyon işleminin başarı ile gerçekleştiği, agaroz jel görüntüsüne bakılarak belirlendikten sonra transformantlardan izole edilen plazmidlerde ileri analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak *esp* N-terminal gen bölgesini içerdiği düşünülen bu vektör DNA'lar kalıp olarak kullanılarak *esp* N-terminal gen bölgesine spesifik *esp*-1 (5'- ATG GGA ACG CCT TGG TATG-3') ve *esp*-2 (5'- TAC TGC TAA ATC GGT CGTG-3') primerleri ile daha önce belirtilen karışım ve reaksiyon koşulları kullanılarak PZR

denemesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.15). Deneme sonunda agaroz jel görüntüsünde NheI ve EcoRI kesim sonucunda istenilen bölgede (1290 bp) bant elde edilmiştir. Bu veri, incelenen transformantların içerdiği pBAD24 vektörünün istenilen gen bölgesini içerdiğinin kanıtıdır.



Şekil 5.15. A: Enzim kesimi ile transformasyonun kontrolü, B: PZR denemesi ile transformasyonun kontrolü.

A		B	
1	pBAD24 vektörü + <i>esp</i> bölgesi (EcoRI + NheI kesimi)	1	Marker 1kb (Fermentas)
2	pBAD24 vektörü + <i>esp</i> bölgesi (EcoRI + NheI kesimi)	2	Negatif Kontrol
3	pBAD24 vektörü + <i>esp</i> bölgesi (EcoRI + NheI kesimi)	3	pBAD24 vektörü + <i>esp</i> bölgesi (PZR ürünü)
4	Marker 1kb (Fermentas)	4	pBAD24 vektörü + <i>esp</i> bölgesi (PZR ürünü)
5	pBAD24 Vektorü tekli enzim kesimi (EcoRI)	5	pBAD24 vektörü + <i>esp</i> bölgesi (PZR ürünü)
6	pBAD24 vektörü		

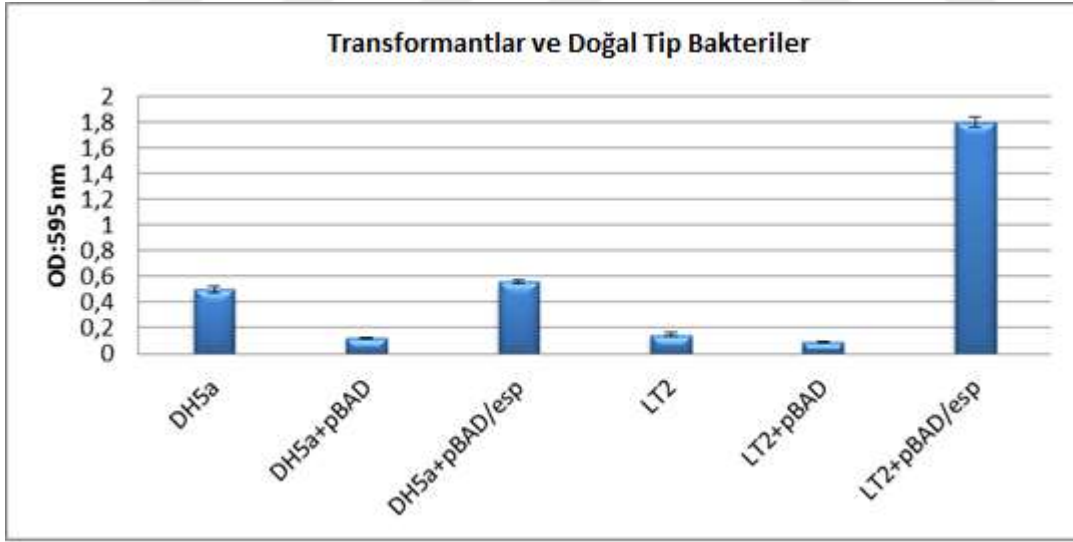
Bu durumda, bir sonraki adım, restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile *esp* N-terminal gen bölgesinin vektördeki pozisyonunun istenilen şekilde olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu amaçla ikili ve tekli enzim kesimleri gerçekleştirilmiştir. Bu kesimler sonrasında reaksiyon karışımlarından 5 µL alınarak %0.7 lik agaroz jellere yüklenmiş ve 100V akımda 2h yürütüldükten sonra EtBr ile boyanmış ve UV ışık altında incelenmiştir. Tekli enzim kesimi sonrasında A 1, 2 ve 3 numaralı kuyularda 4542 bp ve 1290 bp

büyükliğünde elde edilen bantlar ile, *esp* N-terminal gen bölgesinin pBAD24 plazmidinde doğru pozisyonda yerleştiği kanıtlanmıştır.

Bu bulguların elde edilmesi sonrasında *esp* geni N-terminal bölgesinin biyofilm üretimindeki rolünün incelenmesi için q-RT-PZR denemelerine geçilmiştir.

5.13. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ *Salmonella* Typhimurium LT2 VE *Escherichia coli* DH5 ALPHA ÖRNEKLERİNİN BİYOFİLM ÜRETİM DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER

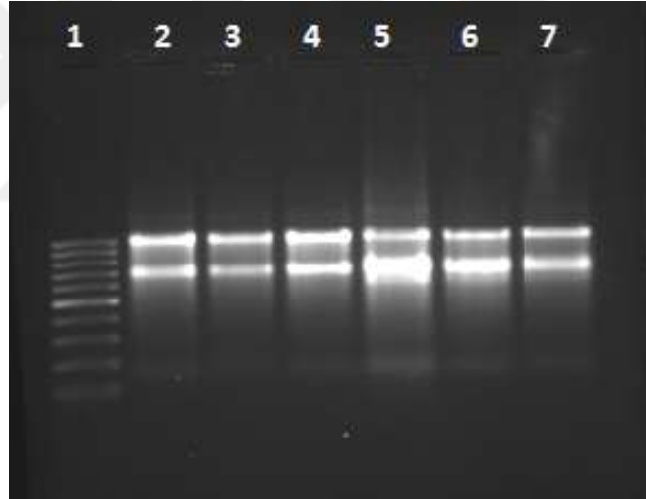
Esp proteininin N-terminal bölgesini kodlayan dizi pBAD24 vektörüne klonlanıp *Salmonella* Typhimurium LT2 ve *Escherichia coli* DH5 α suşlarına transforme edilmiş ve ortama arabinoz ilavesi ile gen önünde bulunan promotor indüklenerek Esp üretiminin teşviki gerçekleştirilmiştir. Esp üretiminin artışına bağlı olarak biyofilm üretim düzeylerindeki değişimleri izlemek amacı ile 96 kuyulu polisitrien plaklarda gerçekleştirilen qRT-PZR denemeleri sonucunda elde edilen veriler Şekil 5.16'da özetlenmiştir.



Şekil 5.16. Doğal tip ve *esp* geni içeren *Salmonella* Typhimurium LT2 ve *E.coli* DH5 α suşlarının arabinoz ile indüksiyonunu takiben 24 saat inkübasyon sonunda ürettikleri biyofilm düzeylerinin karşılaştırılması

5.14. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ *Salmonella* Typhimurium LT2 VE *Escherichia coli* DH5 ALFA ÖRNEKLERİNDEN RNA İZOLASYONU

Esp üretimi teşvik edilen *Salmonella* Typhimurium ve *Escherichia coli* DH5 α suşlarına ait hücre pelletleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den alınarak gen ifade düzeylerindeki değişimlerin incelenmesi amacı ile kullanılmıştır. Bu incelemenin ilk basamağını protein izolasyonu oluşturmaktadır. Daha önce bahsedilen şekilde High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak elde edilen RNA örnekleri %1'lik agaroz jellere $3\mu\text{L}$ örnek $1\mu\text{L}$ boya (6X loading Dye, Fermentas) ile karıştırılarak yüklenmiş ve 80 V akımda 90 dk koşturulmuş ve EtBr boyamasını takiben UV ışık altında incelenmiştir. RNA örneklerinin protein ve DNA kontaminasyonu içermediği görüldükten sonra bir sonraki basamağa yani cDNA sentezine geçilmiştir (Şekil 5.17). Ayrıca izole edilen RNA'lar nanodropta spektrofotometrik olarak ölçülerek saflıkları kontrol edilmiş ve miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

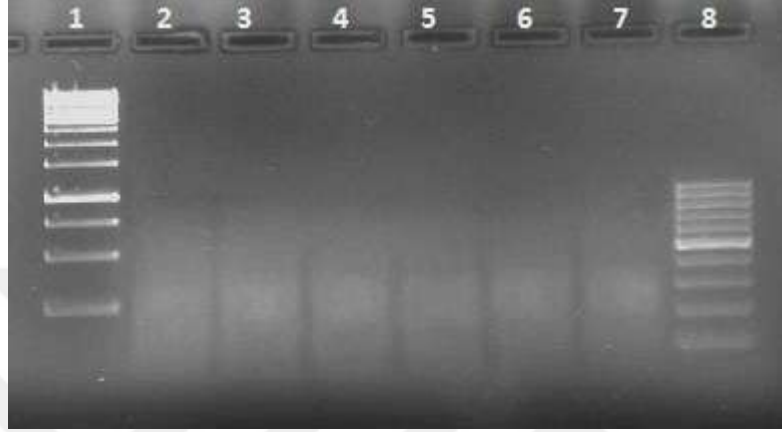


Şekil 5.17. RNA bantlarının agaroz jel görüntüsü

Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	Marker 1 kb (Fermentas)
2	LT2
3	LT2+pBAD24
4	LT2+pBAD24- <i>esp</i>
5	DH5alpha
6	DH5alpha +pBAD24
7	DH5alpha +pBAD24- <i>esp</i>

5.15. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ *Salmonella* Typhimurium LT2 VE *Escherichia coli* DH5 ALPHA ÖRNEKLERİNDEN cDNA SENTEZİ

cDNA sentezinde "cDNA Synthesis kit" (Roche, Germany) kullanılmıştır. Kit protokolü takip edilerek yapılan deneme sonucunda sentezlenen cDNA agaroz jel sistemlerinde kontrol edilmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.18. pBAD24 vektörü ile *esp* geni içeren *Salmonella* Typhimurium LT2 ve *E.coli* DH5 α suşlarının ve *esp* geni içermeyen doğal suşların cDNA'ları

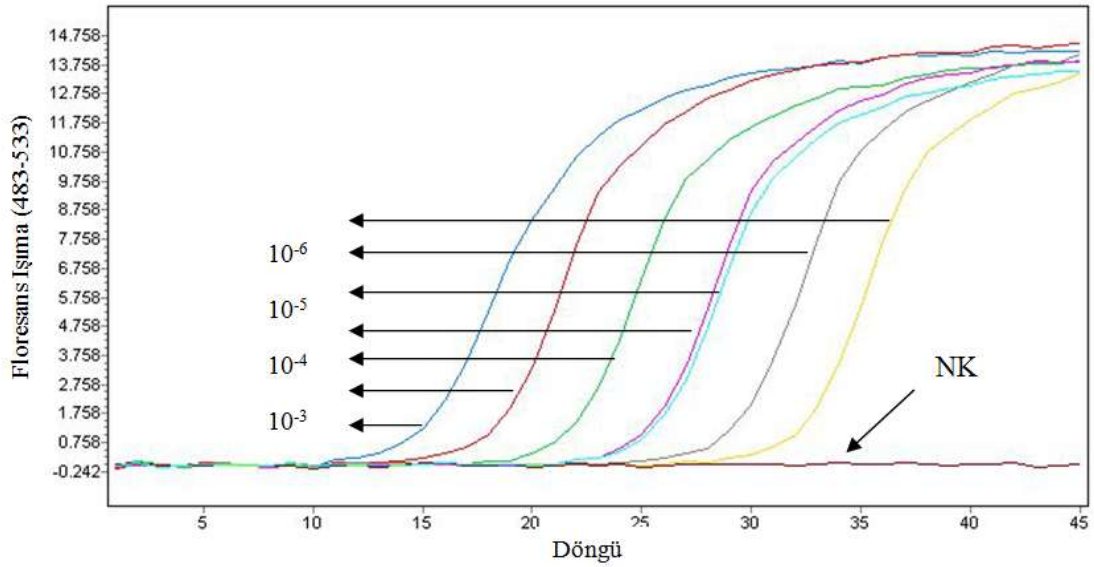
Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	Marker 1 kb (Fermentas)
2	LT2
3	LT2+pBAD24
4	LT2+pBAD24- <i>esp</i>
5	DH5alpha
6	DH5alpha +pBAD24
7	DH5alpha +pBAD24- <i>esp</i>
8	Marker 100 bp (Fermentas)

5.16. ESP ÜRETİMİ TEŞVİK EDİLMİŞ *Salmonella* Typhimurium LT2 VE *Escherichia coli* DH5 ALPHA ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN cDNA ÖRNEKLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN qRT-PZR DENEMESİ SONUÇLARI

Optimize edilen koşullarda gerçekleştirilen qRT-PZR denemelerinin sonuçlarının analizinde kullanılacak kantifikasyon stratejisine karar verebilmek için, PZR reaksiyonlarının amplifikasyon verimlilikleri belirlenmiştir. Bunun için arabinoz ile indüklenmemiş doğal tip LT2 suşun cDNA'sı kalibratör örnek olarak kullanılmış ve bu

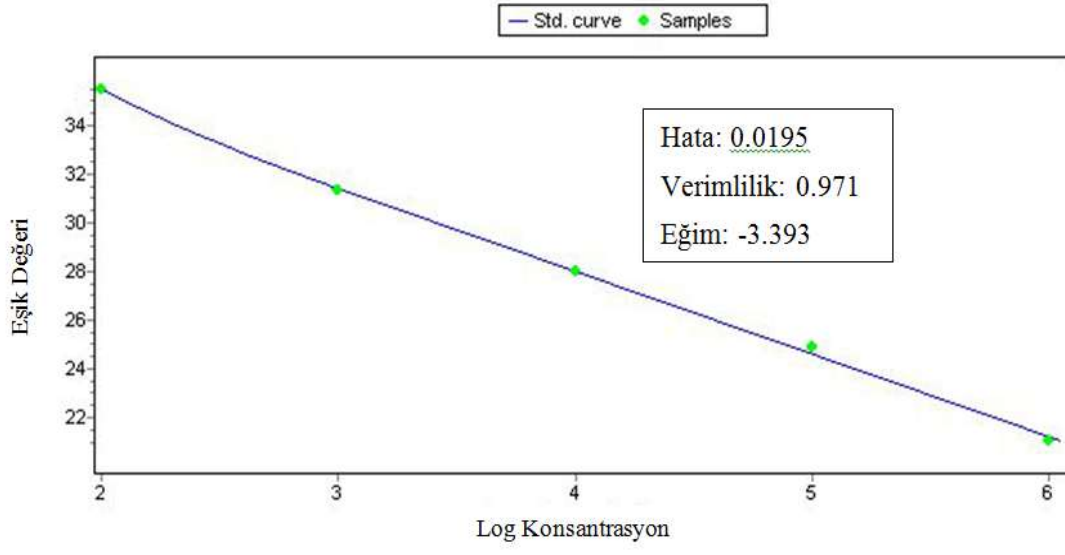
örneğin dilüsyon serileri alınarak her primer seti için ayrı ayrı elde edilen Ct (threshold cycle) veya Cp (Crossing point) değerlerinin rölatif log₁₀'daki kopya sayısına karşı grafiği çizilmiştir. Bu grafiğin eğimi kullanılarak her primer çifti için üstel amplifikasyon verimliliği tespit edilmiştir [E=10(-1/eğim)]. Teorik olarak, %100 verimliliği olan amplifikasyon reaksiyonu için eğim -3.3 olmalıdır. Bu çalışmada kullanılan referans gen (*gapA*) için dizayn edilmiş primer çifti kullanılarak yürütülen reaksiyonun amplifikasyon verimliliğinin hesaplanması için oluşturulan amplifikasyon, standart ve erime eğrilerinin sonucunu göstermektedir (Şekil 5.19).

Amplifikasyon Eğrileri



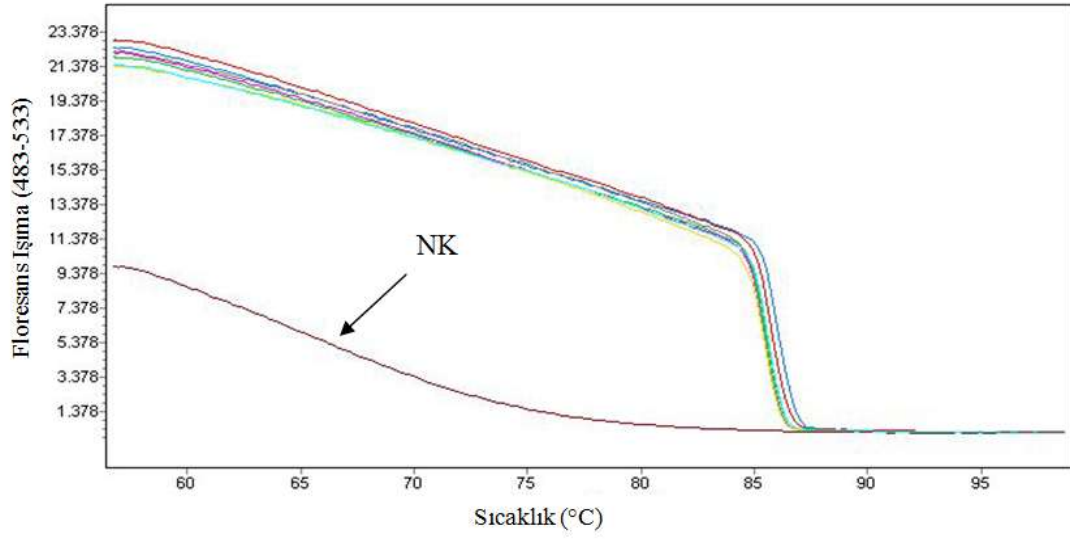
(a)

Standart Eğri



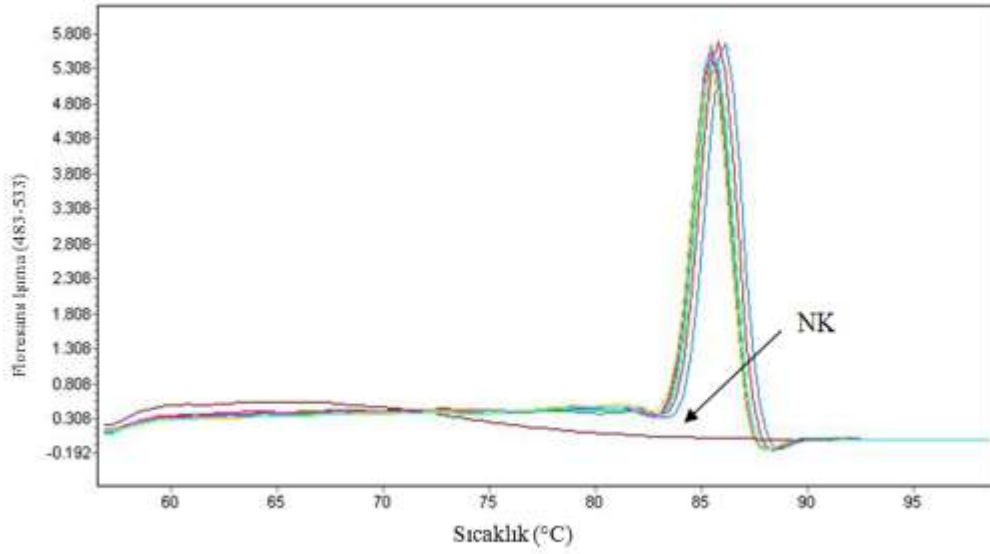
(b)

Erime Eğrisi



(c)

Erime Pikleri



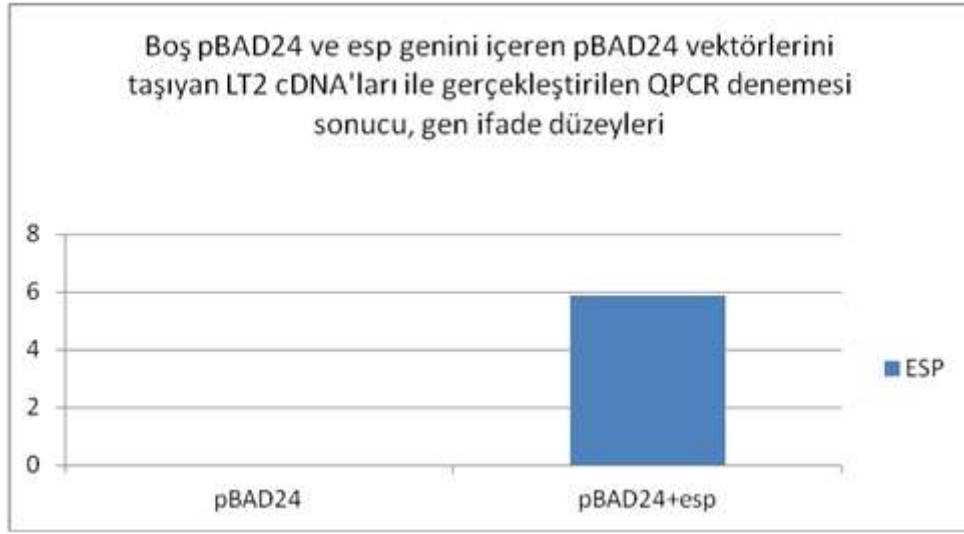
(d)

Şekil 5.19. *gapA* geni için $10 - 10^{-6}$ dilüsyonlarla oluşturulan (a) Amplifikasyon eğrileri, (b) standart eğrisi, (c) erime eğrileri, (d) erime eğrisi analizine göre oluşan erime pikleri görülmektedir. NK: Negatif Kontrol

Farklılaşan gen ifadeleri boş pBAD24 vektörü aktarılmış *S. Typhimurium* LT2 suşu hem de *esp* geni ifadesi arabinoz induksiyonu ile aktive edilen LT2 suşu için Ct değerleri olarak belirlenmiştir. Hesaplanan amplifikasyon verimliliğinin her primer çifti için 2'ye yakın olmasından dolayı, E (verimlilik) değerini tüm hesaplamalar için 2 kabul eden ve açık hali aşağıda verilen yaklaşım metodu ($2^{-\Delta CT}$) kullanılarak, ifade değerleri normalize edilmiştir (71).

Boş vektörü içeren *S. Typhimurium* LT2 suşu *esp* spesifik primerler ile gerçekleştirilen qRT-PZR denemeleri sonucunda hiç Cp değeri vermemiş, *esp* genini içermemesi nedeni ile amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Bununla birlikte, *esp* genini içeren pBAD24 vektörü *S. Typhimurium* LT2 suşuna transforme edildiği örneğin cDNA'sı ile gerçekleştirilen denemede gen ifadesi oldukça yüksek düzeyde sağlanmıştır. Elde edilen verilerin $2^{-\Delta CT}$ formülü kullanılarak değerlendirilmesi sonucunda, tranforme ettiğimiz *esp* geninin LT2 suşunda başarı ile yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 5.20). Boş vektörü içeren LT2 suşunda beklendiği üzere hiç *esp* ifadesi gözlenmezken (0), *esp* genini içeren

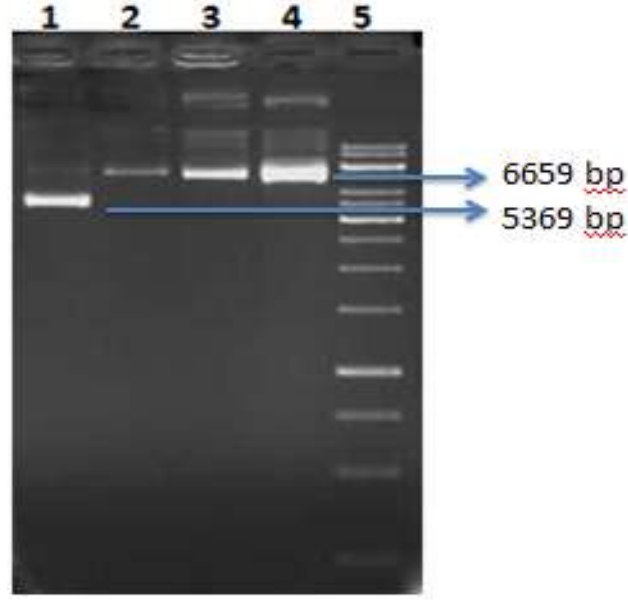
pBAD24 vektörünü transforme ettiğimiz LT2 suşunda gen ifade düzeyi 5,8 kat fazla bulunmuştur.



Şekil 5.20. Boş pBAD24 vektörü ve *esp* genini içeren pBAD24 vektörlerini taşıyan LT2 suşlarının cDNA'ları ile gerçekleştirilen qRT-PZR denemesi sonucunda elde edilen *esp* ifade düzeyleri

5.17. *esp* N-TERMINAL BÖLGESİNİN pET28A VEKTÖRÜ ARACILIĞI İLE *Escherichia coli* DH5 ALPHA VE *Escherichia coli* BL21 SUŞLARINA AKTARIMI

Protein izolasyonu basamakları için N-terminal proteini kodlayan gen bölgesi pET28a vektörüne klonlanmış ve ligasyon basamağını takiben reaksiyonların başarısı %0.8'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Boş pET28a vektörü 5.4 kb iken, 1.29 kb'lık geni içine alan vektörün büyüklüğünün yaklaşık 6.8 kb'a yaklaşması beklenmektedir. Agaroz jelin görüntülenmesi sonucunda 2-5 numaralı kuyularda da görüldüğü üzere vektöre istenilen genin aktarımı sağlanmıştır (Şekil 5.21).



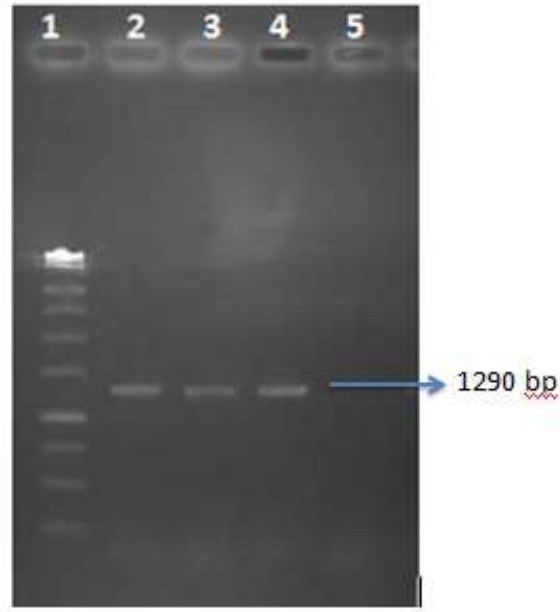
Şekil 5.21 1. pET28a ve pET28a+*esp* vektörleri içeren *E. coli* DH5 α suşundan plazmid izolasyonu

Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	pET28a Vektörü
2	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
3	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
4	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
5	Marker- 1kb (Fermentas)

Vektörün büyüklüğündeki artışın kesin olarak *esp* gen bölgesinin aktarılması sonucunda gerçekleştiğinin kanıtlanması amacı ile ilave geni taşıdığı düşünülen bu vektörler kalıp olarak kullanılmak suretiyle *esp* N-terminal gen bölgesine spesifik *esp*-1 (5'- ATG GGA ACG CCT TGG TATG-3') ve *esp*-2 (5'- TAC TGC TAA ATC GGT CGTG-3') primerleri ile daha önce belirtilen karışım ve reaksiyon koşulları kullanılarak PZR denemesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.22).

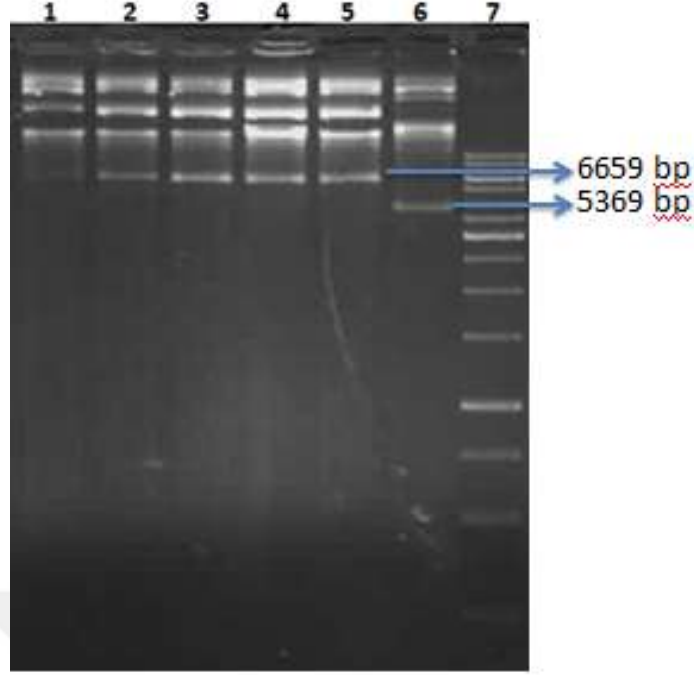
Reaksiyon sonucunda spesifik primerler ile beklediğimiz büyüklükte bölgenin çoğaltılması, pET28a vektörüne *esp* N-terminal gen bölgesinin klonlandığını kesin olarak göstermiştir. Bu basamak ile istenilen geni içeren pET28a vektörünün *E. coli* DH5 α suşundan stabilizasyonu sağlanmıştır. Ardından protein izolasyonu için kullanacağımız bakteri örneği olan kimyasal kompetent *E.coli* BL21 suşlarına ilgili vektörün transformasyonu ve aktarımın kontrolü için plazmid izolasyonu basamakları takip

edilmiştir (Şekil 5.23).



Şekil 5.22. *E. coli* DH5alpha suşundan izole edilen pET28a +*esp* vektöründen *esp* geninin PCR ile çoğaltılması

Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	Marker- 1kb (Fermentas)
2	pET28a+ <i>esp</i> vektörün PZR kontrolü
3	pET28a+ <i>esp</i> vektörün PZR kontrolü
4	pET28a+ <i>esp</i> vektörün PZR kontrolü
5	Negatif Kontrol

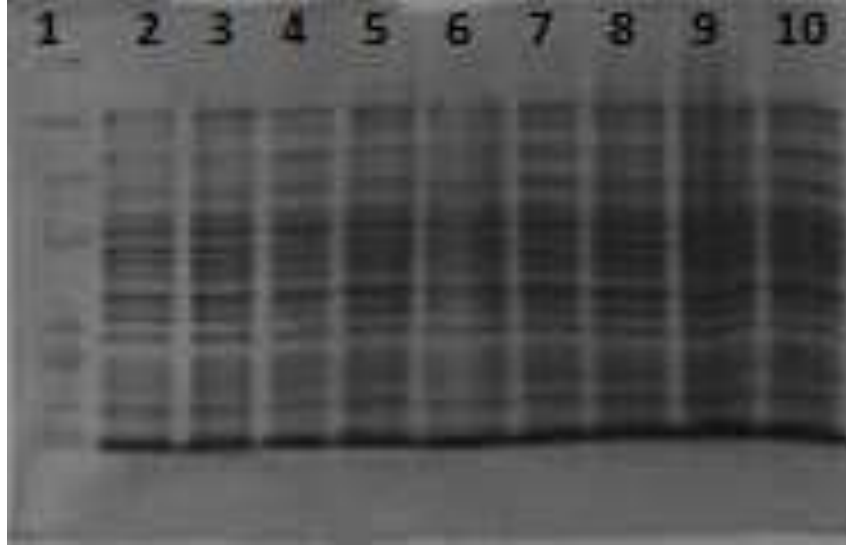


Şekil 5.23. pET28a ve pET28a +*esp* vektörlerini içeren *E. coli* BL21 suşundan plazmid izolasyonu.

Kuyu No	Kuyu İçeriği
1	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
2	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
3	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
4	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
5	Transforme bakterilerinden izole edilen plazmid (pET28a+ <i>esp</i>)
6	pET28a Vektörü
7	Marker- 1kb (Fermentas)

5.18. pET28A+*esp* VEKTÖRÜNÜ İÇEREN *Escherichia coli* BL21 ÖRNEĞİNDEN TOPLAM PROTEİN İZOLASYONU

Bölüm 4.2.23'te anlatıldığı şekilde hazırlanan toplam protein ekstraktları SDS-PAGE'e yüklenmiş ve 2 saat 80 voltta yürütülen örnekler üst jel uzaklaştırdıktan sonra fiksatif solüsyonda 2 saat fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Sürenin sonunda bir gece oda sıcaklığında ve çalkalamalı ortamda boyama (stain) solüsyonunda inkübe edilen jel daha sonra destain (boya giderme) solüsyonu ile muamele edilerek tutunmayan boya jelden uzaklaştırılana kadar yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. İzole edilen toplam proteinlerin görüntülenmesinde Versa Coc-BIORAD (USA) cihazı kullanılmıştır (Şekil 5.24).



Şekil 5.24. *E. coli* BL21 bakteri örneklerinin ve pET28a +*esp* genini içeren *E. coli* BL21 bakteri örneklerinin SDS page görüntüsü

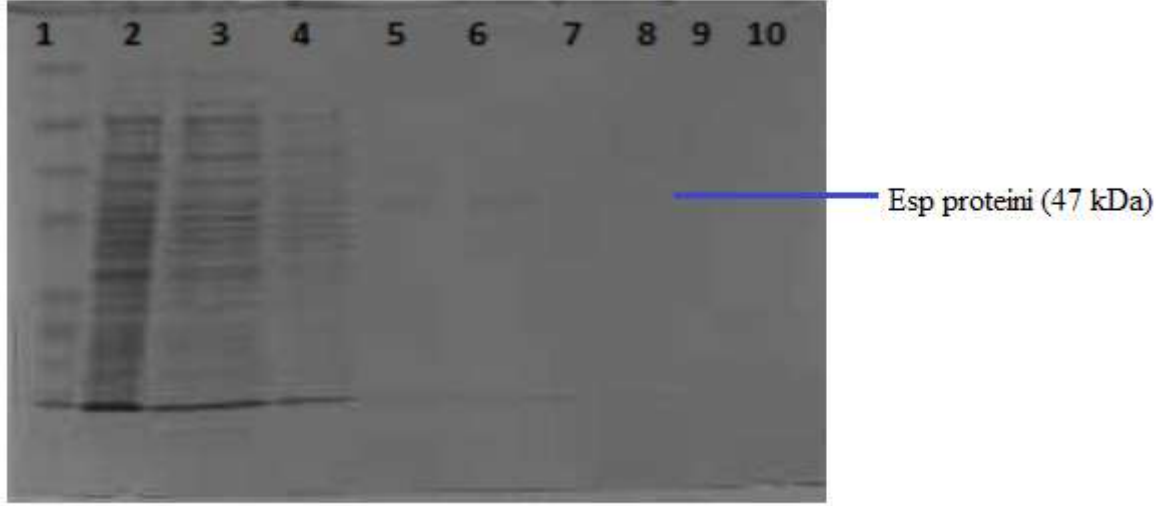
Kuyu No	Örnek
1	Protein marker (New England BioLabs)
2	<i>E. coli</i> BL21 doğal suşu (5µL)
3	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği (5µL)
4	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği-IPTG ile indüklenmiş (5µL)
5	<i>E. coli</i> BL21 doğal suşu (10µL)
6	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği (10µL)
7	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği-IPTG ile indüklenmiş (10µL)
8	<i>E. coli</i> BL21 doğal suşu (15µL)
9	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği (15µL)
10	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği-IPTG ile indüklenmiş (15µL)

Jel incelendiğinde çok sayıda proteinin izole edildiği görülmüştür. Bu proteinler içerisinde ilgilendiğimiz Esp proteinini ayırmak amacıyla, bir sonraki aşamada Ni-NTA kiti kullanılarak histidin ile işaretli proteinin saflaştırılması yapılmıştır.

5.19. HİSPUR Nİ-NTA KİTİ KULLANILARAK ESP PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Bu aşamada Bölüm 4.2.24’te anlatılan işlemler yapıldıktan sonra 6 adet histidin kalıntısı ile işaretli Esp proteininin farklı yıkamalar sonucunda elde edilen fraksiyonları yine SDS-

PAGE'e yüklenmiştir. 2 saat süresince 80 Volt akımda koşturmanın ardından Versa Coc-BIORAD (USA) cihazı kullanılarak görüntülenen jelde, beklediğimiz bölgede yani 47 kDa'luk bölgede Esp proteinini elde ettiğimiz görülmüştür (Şekil 5.25).



Şekil 5.25. pET28a+*esp* genini içeren *E. coli* BL21 bakterisi örneğinin HisPur Ni-NTA

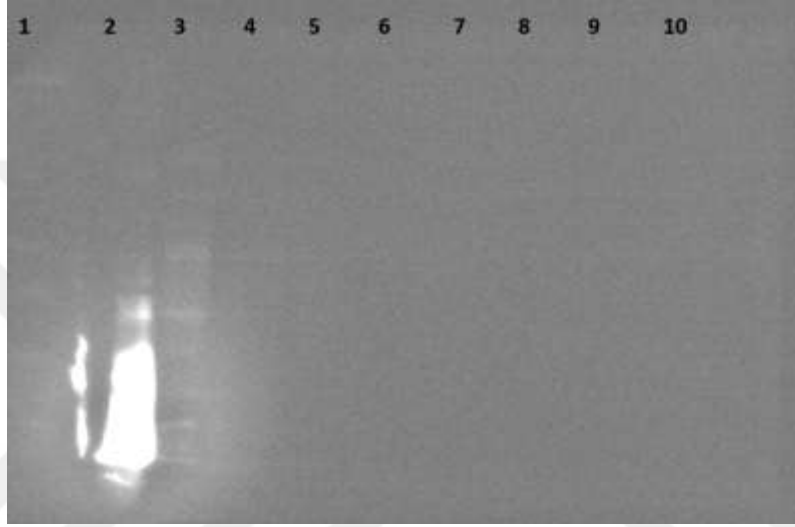
Kuyu No	Örnek
1	Protein marker (New England BioLabs)
2	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakterisi örneği
3	Yıkama öncesi toplanan örnek
4	Yıkamadan toplanan örnek
5	Birinci elüsyondan toplanan örnek
6	İkinci elüsyondan toplanan örnek
7	Üçüncü elüsyondan toplanan örnek
8	Desalt sonrası birinci elüsyondan toplanan örnek
9	Desalt sonrası ikinci Elüsyondan toplanan örnek
10	Desalt sonrası üçüncü Elüsyondan toplanan örnek

(Thermo, Rockford, USA) spin kolonu kullanarak SDS page görüntüsü

Tez önerisi kapsamında belirtildiği üzere, *esp* N-terminal gen bölgesinin Esp proteinini kodlamayan suşa (*Salmonella* Typhimurium LT2) aktarımı sonrasında, biyofilm üretim düzeyindeki farklanmalar belirlenmiş ve q-RT PZR ile doğrulama çalışmaları ve ifade düzeyi belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

5.20. ESP PROTEİNİNİN WESTERN BLOT ANALİZİ

Western Blot analizinde Bölüm 4.2.25’te anlatılan basamaklar izlenmiş ve jel primer antibody olarak Anti-his antikor, sekonder antibody olarak ise Goat anti-rabbit IgG antikor ile işaretlendikten sonra görüntülenmiştir. SDS-PAGE basamaklarından sonra yukarıda Şekil 5.25’de görüldüğü üzere beklediğimiz 47 kDa’luk bölgede bant gözlenmiştir. Fakat Western Blot basamağından sonra antibody ile işaretleme başarılı bir şekilde gerçekleştirilemediği için görüntü elde edilememiştir (Şekil 5.26).



Şekil 5.26. pET28a+*esp* genini içeren *E. coli* BL21 bakteri örneğinin Western Blot görüntüsü

Kuyu No	Örnek
1	Protein marker (New England BioLabs)
2	pET28a + <i>esp</i> genini içeren <i>E. coli</i> BL21 bakteri örneği
3	Yıkama öncesi toplanan örnek
4	Yıkamadan toplanan örnek
5	Birinci elüsyondan toplanan örnek
6	İkinci elüsyondan toplanan örnek
7	Üçüncü elüsyondan toplanan örnek
8	Desalt sonrası birinci elüsyondan toplanan örnek
9	Desalt sonrası ikinci elüsyondan toplanan örnek
10	Desalt sonrası üçüncü elüsyondan toplanan örnek

Bu durumun antibodynin bağlanacağı 6 adet Histidin kalıntısının küçük olması nedeni ile kolay degrade olması ve jelde görünmemesinden ileri geldiği düşünülmektedir. Western Blot analizleri, malzeme listesinde istediğimiz antibodynin artık üretilmemesi nedeni ile

gerçekleştirilemeyeceğinden, B planına geğilmiş ve aktarılan gen tarafından ifade edilen proteinin üretildiği qRT-PZR denemeleri sonucunda doğrulanmıştır. Ancak, mevcut imkanlarımız doğrultusunda, elimizden histidine özgü antibody bulunduğu için, Western Blot analizi de tarafımızdan gerçekleştirilmiş ancak istediğimiz görüntü yukarıda belirttiğimiz nedenlerle elde edilememiştir. ESP ifadesi *S. Typhimurium* LT2 sunucunda qRT-PZR yöntemi ile başarılı bir şekilde gösterildiğinden, jelde bantlı görmemiş olmak sonuçlarımızı olumsuz yönde etkilememiştir.



6. TARTIŞMA

Biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi denemelerinde incelenen toplamda 48 (15 *E. faecalis* ve 33 *E. faecium*) izolat ve iki kontrol suş (ATCC29212 ve OG1RF) arasından dört *E. faecalis* (73, 74, 79 ve 114 kodlu izolatlar) ve onbir *E. faecium* (12, 14, 15, 17, 24, 25, 29, 71, 101, 110, 106)'un biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Suşların hepsi 48 saatte optimum biyofilm üretimi gösterirken, 72 saat inkübasyon ardından biyofilm düzeylerinde düşüş meydana gelmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları arasında güçlü biyofilm üreticisi ($OD \leq 2$) izolat belirlenmemiştir. *E. faecalis* izolatları arasında 73 kodu suş zayıf biyofilm ($0.5 \leq OD < 1$) üretirken kalan üç suşun (74, 79 ve 114) hepsinin biyofilm üretim düzeyleri orta düzeyde ($1 \leq OD < 2$) belirlenmiştir. *E. faecium* izolatları arasında üç izolat (71, 101, 106) zayıf biyofilm üretirken, kalan sekiz izolatın (12, 14, 15, 17, 24, 25, 29, 110) orta düzeyde ($1 \leq OD < 2$) biyofilm üretmiştir.

Morfotiplendirme denemesinde stereo mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda Enterokok izolatları tarafından üretilen biyofilmlerin tamamının aynı morfortipte olduğu bulunmuştur. Enterokoklarda biyofilm morfortipi tanımı ilk kez bu çalışmada yapılmıştır. Dolayısı ile bu açıdan çalışmamız özgünlük taşımaktadır. Lakin literatür ile karşılaştırma yapma şansımız bulunmamaktadır.

Biyofilm oluşumu kompleks bir süreç olduğundan, genetik faktörlerin yanında çevresel faktörler de bu süreçte etkilidir (74). Enterokokların biyofilm oluşturmada glukozun önemli bir faktör olduğu daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında enterokokal yüzey proteininin (Esp) biyofilm oluşumuna katıldığı bilinmektedir (74). Enterokokal yüzey proteini, *esp*, glukoz-bağlı bir şekilde *E. faecalis*'in biyofilm oluşumunu artırır (45). *esp*-pozitif olan iki farklı bakteri örneği; FA2-2 (pESPF) ve OG1RF (pESPF), bu gen bakımından negatif olan kontrolleri ile kıyaslandıklarında belirgin olarak daha yüksek oranda ve daha kalın biyofilm yapıları oluşturmuştur. Yine aynı çalışmada gelişme ortamına $\geq 0.5\%$ oranında glukoz ilavesi *E. faecalis* E99'un biyofilm oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır (75). Çalışmamızda *esp* geni içeren *E. faecium* 61 ve 134, *E. faecalis* 119 ve 140 kodlu suşlar da 1.5% glukozlu içeren TSB besi ortamında optimum biyofilm üretimi göstermişlerdir. Normal koşullarda biyofilm üreticisi olmayan 61 kodlu suşun

belirli bir düzeyde glukoz konsantrasyonu artışına bağlı güçlü biyofilm üreticisi haline gelmesi, *esp* genin ifadesinin değişen çevresel koşullara bağlı olarak değişim gösterdiği ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülebilir. Bu öngörümüzün doğrulanması için, ileri çalışmalarımızda, *esp* üreticisi suşların farklı glukoz konsantrasyonlarındaki gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişimleri araştırılarak hipotezimizin doğrulanması gerekmektedir.

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan bir başka çalışmada, %1 oranında glukoz içeren Tryptic soy broth (TSB) besi ortamında gelişen *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma oranının, glukoz içermeyen aynı besi ortamında gelişmesine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (40). Diğer bir çalışmada ise, besi ortamındaki glukoz konsantrasyonunun %0' dan %0.2' ye yükseltilmesinin *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma özelliğinde düşmeye neden olduğu, glukoz konsantrasyonunun %0.2' den, %0.5'e yükseltilmesi ile daha yüksek oranda biyofilm oluştuğu saptanmıştır (41). Başka bir çalışmada *E. faecalis* OG1RF' nin biyofilm oluşturmadaki artış, gelişme ortamı olan TSB'nin glukoz konsantrasyonunun %1'e yükseltilmesi ile de gerçekleşmiştir (38). *E. faecium* klinik örnekler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada da glukoz konsantrasyonu %0.25'ten %1'e yükseltildiğinde, suşların biyofilm üretim miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Ancak, glukoz konsantrasyonu %1.25'e yükseltildiğinde, suşların biyofilm üretim miktarlarında azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, suşların optimum biyofilm üretimlerinin %1 glukoz içeren ortamda 48h inkübasyon sonucunda gerçekleştiği rapor edilmiştir (76). Bizim çalışmamızda a kontrol suş olarak kullandığımız *E. faecalis* ATCC29212 ve *E. faecalis* OG1RF suşlarının optimum biyofilm üretimleri %1 glukozlu TSB ortamında gerçekleşmiştir. Ayrıca Toplam 48 *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatının, 19'u tanesi (suşların %39.5'i) %1 glukoz konsantrasyonda, 9 tanesi (suşların %18.7'si) %1.5 glukoz konsantrasyon ve 1 tanesi (suşların %2'si) %2 glukoz konsantrasyonda optimum biyofilm üretimi göstermiştir.

Diğer literatür sonuçları gibi peynir izolatları olan izolatlarımız da glukoz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak biyofilm üretiminde de artış görüldüğü tespit edilmiştir. Kontrol suşlara kıyasla izolatlarımız sadece %1 glukoz konsantrasyonunda değil %1.5 ve %2 glukoz konsantrasyonunda da biyofilm üretimi göstermişlerdir. İzolatların optimum biyofilm üretimleri değişik glukoz konsantrasyonlarında değişiklik gösterdiği için,

her suşun biyofilm üretimi için ayrı bir optimum glukoz konsantrasyonu çalışmalarımız sırasında belirlenmiştir.

fsr lokusu *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* olmak üzere üç gen içermektedir ve *E. faecalis* cinsinde jelatinaz ve serin proteaz sistem ifadesi için pozitif regülatör olarak görev yapmanın yanında quorum-sensing sinyal transdüksiyonu olarak da görev yapmaktadır (38,52,56,58). Jelatinaz aktivitesinin (GelE) enterokokal biyofilm üretimi ile doğrudan ilişki olduğu düşünülmektedir (41,52,56,77). GelE geninin ürünü olan jelatinaz enziminin, bakterinin alt popülasyonlarının parçalanmasında ve biyofilm matriksinin kritik bileşeni olan ekstraselüler DNA' nın katalizasyonunda, dolayısıyla salgılanmasının aktivasyonunda görev aldığı rapor edilmiştir (46). Shockman ve Cheney (1969) tarafından yapılan gözlemler sonucunda GelE'nin hedef hücrelerinde bir otolizin olduğu öne sürülmüştür (78,79). Pek çok araştırmacı tarafından jelatinazın *gelE* ve *fsr* lokusunun in vitro çalışmalarda biyofilm üretimi üzerinde belirgin bir etkisi olduğu belirlenmekle birlikte (41,52,56), Mohamed ve Murray (2005) *gelE* pozitif olan klinik veya fekal kaynaklı izolatlar ile yaptıkları çalışmalar sonucunda GelE⁺ ve GelE⁻ izolatların in vitro biyofilm üretimleri arasında bir fark olmadığını belirlemiştir. *esp* geninde olduğu gibi, ne *gelE* geninin ne de *fsr* lokusunun biyofilm üretimi için zorunlu olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, *esp*⁺/GelE⁺ izolatlar, *esp* içermeyen/GelE⁻ örneklerle kıyasla belirgin düzeyde fazla biyofilm üretimi gerçekleştirmiştir. GelE⁺ örneklerin GelE⁻ örneklerle karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde biyofilm üretimi ise, araştırmacılar tarafından OG1RF gibi doğal suşlarda jelatinazın biyofilm üretimine katıldığı şeklinde yorumlanmıştır (80). Yapılan iki farklı çalışmada da enterokok izolatlarının biyofilm ve jelatinaz üretimleri arasındaki ilişki araştırılmış, ancak bir bağlantı kurulamamıştır (53,62).

Bizim çalışmamızda jelatinaz üretim denemesi sonucuna göre *E. faecalis* izolatları içerisinde dört (64, 72, 78, 140 kodlu izolatlar) izolatın güçlü proteaz (+++), ve üç izolatın (ATCC 29212, 79, 81 kodlu suşlar) negatif proteaz (-) ve kalan dokuz izolatın ise zayıf proteaz (+) özelliğinde olduğu saptanmıştır. *E. faecium* izolatlarında ise bir suş (14 kodlu izolat) proteaz negatif bulunurken, diğer 32 izolatın tamamının zayıf proteaz (+) olduğu belirlenmiştir. İncelenen *E. faecium* izolatları arasında, *E. faecalis* izolatlarının aksine, güçlü proteaz özelliğine rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre jelatinaz üretimi ve

biyofilm oluşumu arasında orantılı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Yine benzer şekilde, bu bulgularımız da literatür ile benzerlik göstermektedir.

esp 11-12 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR denemesinde 4 suşun (60, 81, 119 ve 134 kodlu suşlarda) *esp* genini içerdiği belirlenmiştir. A tekrar bölge sayısı 1-3 arasında ve C tekrar bölge sayısı 4-10 arasında değişkenlik göstermektedir (81). esp 2-5 primerleri kullanarak gerçekleştirilen PZR denemesinde 4 suşun (60, 81, 119 ve 134 kodlu suşlarda) 7 adet C tekrar bölgesi (C1, C2, C3, C4, C5, C6 ve C7) içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca esp 46-46 ile yapılan PZR denemesinde bir A tekrar bölgesi içerdiği belirlenmiştir (65,81). Bu bulguları *esp* geni varlığı ve biyofilm oluşturma yeteneği arasında ilişki bakımından değerlendirdiğimizde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ancak glukoz konsantrasyonu arttıkça *esp* pozitif olan suşların biyofilm oluşumunda önemli miktarda artış görülmüştür. Örneğin *E. faecalis* 140 kodlu izolat %0.5'lik glukozlu TSB besiyerinde biyofilm üretim düzeyi OD₅₉₅ nm'de 0.62 iken, glukoz konsantrasyonunun % 1.5'e yükseltilmesi sonucunda biyofilm üretim düzeyi 1.02'e yükseldiği belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada gelişme ortamına \geq %0.5 oranında glukoz ilavesi *E. faecalis* E99'un biyofilm oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır (74). Bizim çalışmamız sonucunda da *esp* geni varlığı belirlenmiş örneklerin %1 ve %1.5'lik glukoz içeren TSB besi ortamında biyofilm üretimlerinde önemli bir artış görülmüştür. Bu sonuçlara göre biyofilm oluşturmak için genetik faktörlerin yanında en az bir başka faktörün daha olması gerekliliği biyofilm üretiminin birden fazla mekanizma tarafından kontrol edildiği görüşü önem kazanmıştır. *E. faecalis*' in Esp-bağımsız biyofilm oluşumu muhtemelen, *gelE* (41,52), *BopD* (12), *fsr* lokusu (52), *bee* lokus (75) ve yüzey hetrojenliği (82) gibi çok sayıda ek faktöre bağlıdır (83).

Di Rosa vd. (2006) bazı *esp* negatif suşlar tarafından oluşturulan biyofilm yapısının, *esp* pozitif suşlara kıyasla daha kalın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca incelenen örnekler arasında biyofilm üreticisi *esp* pozitif suşlar yalnızca klinik kaynaklı izolatlar arasında belirlenmiştir (62). Genetiği tanımlanan yüksek biyofilm üreticisi *E. faecalis* OG1RF, sadece *esp*'nin yokluğunda değil, *esp*' yi kodlayan bölgelere zarar veren tüm patojenite adaların yokluğunda da biofilm üretmiş olması oldukça çarpıcı bir bulgudur (41). Enterokok klinik izolatları üzerinde yapılan çalışmada, 74 *esp* pozitif izolatların tamamı

biyofilm üretirken, test edilen 89 *esp* negatif suştan 77' sinin biyofilm oluşturduğu rapor edilmiştir (56).

Mohamed vd. (2004)'nin incelediği enterokok suşlarının %69' u güçlü, %46' sı orta ve %30' u zayıf düzeyde biyofilm üretirken, *esp* pozitif 12 suşun hiçbiri biyofilm üretmemiştir. Araştırmacılar *esp*'nin biyofilm üretimi için gerekli olmadığını ama *esp* pozitif *E. faecalis* suşlarda yüksek seviyede biyofilm üretimlerinde *esp* genin önem taşıdığını ifade etmişlerdir (56). Farklı araştırmacılar ise biyofilm üretiminde *esp* geninin zorunlu olmadığını, ayrıca *E. faecalis* ve *E. faecium*' un biyofilm üretimi için yalnızca *esp* geninin bulunmasının yeterli olmadığını vurgulamıştır (84).

Mikroorganizmaların hidrofobik ve polar olmayan yüzeylere, hidrofilik yüzeylere göre daha kolay tutunma özelliğine sahip oldukları daha önce yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda belirlenmiştir (11,85). Toledo Arana vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada Enterokok izolatlarının hücre yüzey hidrofobisitesi ve biyofilm üretim özelliği arasında anlamlı bir bağlantı belirlenmemiştir (81). Lakin, hidrofobisite düzeyi ile biyofilm oluşturma karakteristikleri arasında tutarsız bir ilişkinin olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından raporlanmıştır. Benzer şekilde çalışmamız sonucunda izolatların biyofilm oluşturma düzeyleri ve hidrofobisite yeteneği arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Enterokok suşlarında plazmid ve transpozonlar yoluyla kazanılmış antimikrobiyal direnç son yıllarda dikkat çekici düzeye ulaşmıştır. Antimikrobiyal direnç profili içerisinde en önemli olanları yüksek düzey aminoglikozid direnci ve yüksek düzey penisilin direncidir. Günümüzde enterokokların önemli bir kısmı yatay gen transferi ile eritromisin, klindamisin ve tetrasiklinlere direnç kazanmış durumdadır. Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç ilk kez 1989 yılında Uttley vd. (86) tarafından bildirilmiş ve daha sonra tüm dünyada hızla yayılmıştır.

Vankomisin direnci çoklu ilaç direnci gösteren Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarında önemli bir sorundur. İlk Enterokok suşunun 1986'da izole edilmesi ile hastane enfeksiyonu etkenleri arasında Enterokokların önemi anlaşılmaya başlanmıştır (87). Vankomisin dirençli Enterokok (VRE) suşları özellikle son yirmi yılda, dünyanın pek çok farklı yerindeki hastanelerden izole edilmekte, sayıları hızla artış göstermektedir (88). Türkiyede ilk kez yılında izole edilen VRE'lerin sayısı her geçen gün artmaktadır (89).

Tez kapsamında, peynir kaynaklı *Enterococcus faecalis* (15 adet) ve *Enterococcus faecium* (33 adet) suşların antibiyotik direnç profillerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen MIC (Minimum Inhibitory Concentration) denemeleri sonucunda Enterokok enfeksiyon tedavilerinde kullanılan kanamisin antibiyotiğine karşı 48 izolatın tamamı dirençli bulunurken, izolatların %83.3' ü vankomisin antibiyotiğine dirençli bulunmuştur. Ayrıca 48 izolatın %6.25' inin de enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli rol oynayan Gentamisin antibiyotiğine direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Bilindiği üzere, biyofilm yapısı içerisinde bulunan bakteriler, çevresel faktörlere ve antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik formlarına kıyasla çok daha dirençli hale girmektedir. Planktonik formların antibiyotik direnç profillerini belirledikten sonra, biyofilm formundaki bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç düzeylerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz MBIC (Minimum Biofilm Inhibition Concentration) sonuçlarına göre izolatlar biyofilm oluşturduklarında Vankomisin antibiyotiğine dirençleri 16000 mg/L kadar yükselmiştir. Orta düzeyde biyofilm üreticisi olan 24 kodlu *Enterococcus faecium* suşu planktonik formdayken Vankomisine duyarlı olduğu halde biyofilm üretiminden sonra bu antibiyotiğe dirençli hale gelmiştir ve MBIC değeri 16384 mg/L olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde biyofilm üreticisi olan izolatların tamamı planktonik formdayken Gentamisine karşı duyarlı olmalarına karşın biyofilm oluşturduktan sonra Gentamisine yüksek düzeyde (32000 mg/L) dirençli hale geçmişlerdir. Enterokokal enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bu iki antibiyotiğe karşı peynir kaynaklı izolatlarımızın direnç sahibi oluşu, bu direncin de biyofilm üretimi sonrasında beklendiği gibi oldukça yüksek düzeylere çıkışı gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından risk taşımaktadır. Bilindiği üzere antibiyotik direnci gibi faktörler çoğunlukla plazmidler üzerinde kodlanmakta ve yatay gen transferi yolu ile farklı bakteriler arasında taşınmaktadır. Biyofilm yapısında bulunan bakteriler, EPS yapısı içerisinde sıkıca paketlenmişlerinden, fiziksel olarak planktonik formlarına kıyasla yatay gen transferi ve konjugasyon ile plazmid aktarımı açısından daha avantajlı halde bulunmaktadır. Özellikle çalıştığımız izolatların Türkiye kaynaklı oluşu, bizim açımızdan durumu daha kritik hale getirmektedir. Peynirlerin üretim aşamaları ve olgunlaştırma süreleri düşünülür ise, üretim şartlarında bakterilerin biyofilm üretimi için olumlu koşulların ortaya çıkması olasıdır. Yüksek düzeyde ve birden fazla antibiyotiğe karşı direnç taşıyan Enterokok

örneklerini barındıran peynirlerin tüketilmesine bağlı olarak oluşabilecek enfeksiyonların tedavisi zorlu olacaktır.

Esp proteininin idrar yolu enfeksiyonu sırasında *E. faecalis*'in kolonizasyonu ve sürekliliğinde rol aldığı belirlenmiştir (65,90). *E. faecium*'da ise *esp* geni homoloğu bir gen tanımlanmıştır (91). Biyofilm yapısının oluşumunda *esp* geninin rolü konusunda çeşitli araştırmacılar tarafından birbiri ile çelişen sonuçlar elde edilmiştir. Toledo-Arana ve arkadaşları (81) *esp*-pozitif *E. faecalis* izolatlarının %93.5'inin abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturduğunu ve *esp*-negatif *E. faecalis* izolatlarının ise biyofilm oluşturmadığını belirlemiştir (81). Bu çalışmada araştırmacılar ayrıca iki *E. faecalis* suşunda insersiyonel inaktivasyon yolu ile *esp* mutasyonu sonucu biyofilm üretiminin düştüğünü ancak üçüncü mutant için bir değişimin gerçekleşmediğini belirlemiştir. Araştırma sonunda Esp proteininin biyofilm oluşumunu teşvik ettiği fakat *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmasında başka etkenlerin de katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (81). Bu araştırmaya paralel olarak yürütülen bir başka çalışmada aynı araştırmacılar çerçeve kayması mutasyonu ile Esp spesifik bölgelerinden yoksun mutant ile Esp bakımından doğal tip suşu karşılaştırmıştır. Araştırmacılar Esp'nin N-terminal bölgesinden yoksun mutantların doğal tipe kıyasla daha düşük miktarda biyofilm oluşturduğunu belirlemiş ve *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmasında Esp N-terminal bölgesinin etkili olduğu sonucuna varmıştır (45). *Esp* pozitif *E. faecium* örneklerinde yapılan bir çalışmada, Esp proteinin hücre yüzeyinde değişik düzeylerde ifade olduğu ve buna bağlı olarak ilk tutunma ve biyofilm oluşumunda önemli düzeyde değişimler olduğunu belirlemiştir (83).

Yürütülen farklı çalışmalarla, *E. faecalis*'te biyofilm oluşumu için Esp-bağımsız bir mekanizmanın varlığı kanıtlanmıştır (41,62). Dolayısı ile, bazı çalışmalar Esp'nin biyofilm üretimi üzerindeki olumlu etkisini desteklerken, bazı çalışmalar sonucunda ise, Esp üretiminin biyofilm üretimi üzerinde hiçbir olumlu rolü tanımlanmamıştır (81,92) . Oldukça tartışmalı olan bu durumun tarafımızdan araştırılması amacı ile, izolatlar *esp* geni bakımından incelenmiş ve genin ifade edilmesi ile biyofilm üretim düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca ileri araştırmalarla, *esp* geninin N-terminal bölgesinin Gram negatif suşlara klonması sureti ile biyofilm oluşturma düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Çalışmamız sonucunda, *E. faecalis* izolatların %20' si orta düzeyde biyofilm üreticisi iken geri kalan izolatların biyofilm üretim özelliğine sahip olmadığı

belirlenmiştir. Biyofilm üreticisi *E. faecalis* izolatlarının hiçbirinin *esp* genini içermediği tespit edilmiştir. *Esp* geni bakımından pozitif bulunan iki *E. faecalis* izolatı (81 ve 119 kodlu izolatlar) ise biyofilm üretim özelliğinde değildir. Elde ettiğimiz bu bulgu, literatürde de tartışmalı olan *esp* geni ile biyofilm üretimi arasında doğru orantılı bir ilişkinin bulunmadığı tartışmalarını destekler niteliktedir. *E. faecium* izolatlarının %36'sı (%12'si zayıf ve %24' ü orta düzeyde) biyofilm üreticisi iken yine bu izolatlar arasında da *esp* geni bakımından pozitif olan örneğe rastlanmamıştır. *E. faecium* izolatlar arasında, *esp* geni bakımından pozitif olan iki suş (60 ve 134 kodlu izolatlar) da biyofilm üreticisi değildir. Birbiri ile tutarlılık sergileyen bu bulgularımız, literatürdeki tartışmalara önemli katkı sağlayacak niteliktedir.

Streptococcus aureus da var olan *bap* geni, fonksiyon olarak Enterokokların yüzey proteini olarak bilinen *esp* ile benzerlik göstermektedir (65). Ayrıca bu *bap* geni Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enterica* serovar Typhi) ve Gram pozitif (*Enterococcus faecalis*) bakterilerin biyofilm üretiminin ilk tutunmasında görev yapan yüzey proteinleri ile benzerlik göstermektedir (65). Cucarella vd. (2001) araştırmalarında; *bap* geni mutasyona uğratılmış suşların biyofilm üretim düzeyleri ile doğal tip suşların biyofilm üretim düzeylerini karşılaştırarak, doğal tip suşların ilk tutunma yeteneklerinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *Bap* proteinin doğal suşlarda hücre-hücre etkileşimleri de etkilediği rapor edilmiştir (93).

esp-pozitif ve polistiren yüzeye yüksek düzeyde tutunma özelliği olan *E. faecium* suşları üzerinde yapılan araştırmada, Western blot, flow sitometrik analizler ve elektron mikroskopisi analizleri analizler sonucunda, *Esp* proteinin hücre yüzeylerinde ifade olduğu ve hücre yüzeyinde yer aldığı ve *Esp* ifadesinin farklı türlerde yüksek oranda farklılık gösterdiği belirlenmiştir. İncelenen örneklerin *Esp* ifade düzeyleri farklı çevresel koşullarda qRT-PZR ile ölçülmüş ve gelişim sıcaklığı ve oksijenin varlığı/yokluğuna bağlı olarak *Esp*'nin ifade düzeyinin değiştiği gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *E. faecium* hücre yüzeyinde *Esp*'nin ifadesinin üç faktörden etkilendiği sonucuna varılmıştır: i) suşlara bağlı olarak ifade düzeyi değişmektedir, ii) gelişme ortamındaki çevresel faktörlere bağlı olarak ifade değişmektedir ve iii) başlangıç tutunmasına ve biyofilm oluşturmaya bağlı olarak ifade düzeyi değişmektedir. Özetle söz konusu çalışmada, *E. faecium*' un değişen çevresel koşulları algıladığı ve buna yanıt verdiği sonucuna varılmıştır. Bu durum

enfeksiyonun ilk aşamaları olan, bakterinin oksijen bakımından zengin ve oda sıcaklığındaki bir çevreden anaerobik bir ortama ve vücut sıcaklığına geçişi sırasında önem taşıyan bir özellik olarak nitelendirilmiştir (83). Farklı araştırmacılar tarafından Esp'nin biyofilm oluşumundaki rolünün sürekli olarak farklı bulunması, değişkenlik gösteren bu faktörlerin çokluğundan Esp'nin ifade düzeyinin kolayca etkilenmesi ile açıklanabilir.

Tendolkar ve arkadaşları (2005) tarafından *E. faecium* üzerinde yapılan çalışmada N-terminal bölgede çerçeve kayma mutasyonu ile oluşturdukları mutasyon sonucunda, biyofilm oluşumunda azalma meydana geldiği ve bu bölgenin ilk tutunmada önemli rol oynadığını ve dolayısı ile biyofilm oluşumunda N-terminal bölgenin çok önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (45).

Çalışmamız; *esp* genin ilk defa Gram negatif bir bakteriye aktarılması ve ifadesinin sonucunda biyofilm üzerinde etkisinin araştırılması açısından özgündür. Biyofilm üreticisi olmayan *S. Typhimurium* LT2 *esp* genin ifadesi sonucunda orta düzeyde biyofilm üretimi gerçekleşmiştir. Enterokokların yüzey proteini (*esp*) bir Gram pozitif bakteri proteini olmasına rağmen qRT-PZR sonuçlarında da görüldüğü gibi, Gram negatif bir bakteride ifade olması ve biyofilm üretiminde etkili olması bu proteinin yatay gen transferi yolu ile doğal süreçlerde Gram negatif bakterilere geçmesi halinde biyofilm üretiminde önemli katkılara neden olacağı ve dolayısı ile enfeksiyonların yayılması ve kalıcılığına destek olabileceğini akla getirmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi Esp proteini; *Salmonella* yüzey proteini ile benzerlik gösterilmesi ayrıca aktarıldığı *S. Typhimurium* LT2'sünde biyofilm üretim düzeyinde meydana gelen artış bu proteinin tek başına dahi yalnız Gram (+) bakterilerinde değil, aynı zamanda Gram (-) bakterilerde de biyofilm üretiminde etkin bir role sahip olduğu çalışmamız sonucunda literatürde ilk defa belirlenmiştir.

6.1. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında Türkiye kökenli peynir izolatlarından izole edilen Enterokok suşları incelenmiştir. Enterokokların çeşitli enfeksiyonlara sebebiyet verdiği bilinmekle birlikte, biyofilm yapısı oluşturmalarına bağlı olarak antibiyotik direnç düzeyleri artmakta ve tedavileri ve eradikasyonları oldukça zorlaşmaktadır. Peynir izolatları ile yürüttüğümüz çalışmamız sonucunda da, peynir kaynaklı izolatların hem biyofilm üretime yeteneğinde oldukları, hem de planktonik formda dahi çoklu antibiyotik direnç özelliği gösteren örneklerimizin biyofilm üretimleri sonucunda antibiyotiklere karşı çok yüksek düzeyde dirence ulaştıkları belirlenmiştir. Halk sağlığı açısından bu durum önemli bir sorundur.

Enterokokal biyofilm yapılarındaki rolü tartışma konusu olan ve değişik çalışmaların sonuçlarında biyofilm üretimindeki rolü tam olarak kanıtlanamayan Esp proteini, bu çalışma kapsamında incelenen peynir izolatlarının 4 tanesinde tanımlanmış ve kopyalanarak uygun vektörler aracılığı ile biyofilm üreticisi olmayan Gram negatif *Salmonella* bakterisine transforme edilmiştir. Oldukça patojen olduğu bilinen ve özellikle gıda kaynaklı enfeksiyonlarda her yıl çok sayıda ölüme neden olan *Salmonella* bakterisinin, Esp proteinini kodlayan geni alması ve proteini ifade etmesi sonucunda önemli düzeyde biyofilm ürettiği görülmüştür. Bu durum, doğal ortamlarda karşılaşma ve biyofilm yapısında birlikte bulunma olasılığı bulunan iki cinsin doğal süreçlerde gen aktarımı yolu ile *esp* genini birbirine transfer etmesi halinde, oluşabilecek risklerin ne kadar ciddi olduğunu göstermektedir. Yine antibiyotik direnç genlerinin de aynı koşullar altında, biyofilm yapısı içerisinde, farklı cinsler arasında aktarılması mümkündür. Çalışmamız kapsamında Esp proteininin biyofilm oluşumundaki rolünün türe ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişim gösterdiği kanıtlanmış ve gıda güvenliğine ülkemizde daha dikkat edilmesi gerektiği bir kez daha önem kazanmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L.** The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 2006;106(1):1–24.
2. **Martinez-Murcia AJ, Collins MD.** Enterococcus sulfureus , a new yellow-pigmented Enterococcus species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991;80(1):69–74.
3. **Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP.** Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2000;21(8):510–5.
4. **Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A Di, Parrilli M.** The biofilm matrix of Pseudomonas sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 2006;341(14):2456–2461.
5. **Poulsen LV.** Microbial Biofilm in Food Processing. *LWT - Food Sci. Technol.* 1999;32(6):321–326.
6. **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(2):167–93.
7. **Guntupalli R, Sorokulova I, Long R, Olsen E, Neely W, Vodyanoy V.** Phage Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011;82(1):182–189.
8. **The potential for biofilm growth in water distribution systems. - PubMed - NCBI.** Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=HALLAM+2001+BIOFILM>. Erişim Ocak 6, 2016.
9. **Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR.** Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res. = Rev. Can. Rech. vétérinaire* 2002;66(2):86–92.
10. **Costerton JW.** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80-.).* 1999;284(5418):1318–1322.
11. **Donlan RM.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*

- 2002;8(9):881–90.
12. **Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J.** A Putative Sugar-Binding Transcriptional Regulator in a Novel Gene Locus in *Enterococcus faecalis* Contributes to Production of Biofilm and Prolonged Bacteremia in Mice. *J. Infect. Dis.* 2004;189(3):420–430.
 13. **Spencer RC.** Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease 5th Edn (two volumes). *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;46(2):343–343.
 14. **Unat EK.** *Tip bakteriyolojisi ve virolojisi : İnsanda hastalık yapan bakteriler ve virüsler ve bunlarla oluşan infeksiyon hastalıkları /*. Dergah Tıp Yayınları,; 1986.
 15. **Ira P, Sujatha S, Chandra PS.** Virulence factors in clinical and commensal isolates of *Enterococcus* species. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2013;56(1):24–30.
 16. **Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahn DF, Wenzel RP.** Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit--a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2004;3:14.
 17. **Spencer RC.** Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease 5th Edn (two volumes). *J. Antimicrob. Chemother.* 2000;46(2):343–343.
 18. **Sutherland IW.** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001;147(1):3–9.
 19. **Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DL, Wenzel RP.** Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* 1996;23(6):1234–9.
 20. **Zobell CE, Allen EC.** The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *J. Bacteriol.* 1935;29(3):239–51.
 21. **Characklis WG.** Attached microbial growths—I. Attachment and growth. *Water Res.* 1973;7(8):1113–1127.
 22. **Donlan RM.** Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 2001;33(8):1387–92.
 23. **Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD.** The role of biofilms in

- otolaryngologic infections: update 2007. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007;15(5):347–51.
24. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318–22.
 25. **Davey ME, O'toole GA.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64(4):847–67.
 26. **Bothwell MR, Smith AL, Phillips T.** Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 2003;129(5):599–601.
 27. **Palmer RJ, White DC.** Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol.* 1997;5(11):435–40.
 28. **Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E, Ofek I.** Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect. Immun.* 1981;33(1):29–33.
 29. **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;49:711–45.
 30. **Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G.** Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 1994;176(8):2137–42.
 31. **Kreft JU, Wimpenny JW.** Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci. Technol.* 2001;43(6):135–41.
 32. **Høiby N.** New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002;49(2):235–8.
 33. **Fisher K, Phillips C.** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155(Pt 6):1749–57.
 34. **Noble WC, Virani Z, Cree RG.** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992;72(2):195–8.
 35. **Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK.** Infection with

- vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(14):1342–7.
36. **Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):34–40.
 37. **Carniol K, Gilmore MS.** Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2004;186(24):8161–3.
 38. **Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Murray BE, Inouye RT.** Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* 2004;190(5):967–70.
 39. **Marinho AR, Martins PD, Ditmer EM, d’Azevedo PA, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG.** Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Braz. J. Microbiol.* 2013;44(2):423–6.
 40. **Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Arciola CR, Montanaro L.** Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;20(5):343–5.
 41. **Kristich CJ, Li Y-H, Cvitkovitch DG, Dunny GM.** *Esp*-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2004;186(1):154–63.
 42. **Maryam D, Ozlem GE, M. NA, Fatma NY, Evrim GA, Nefise A.** The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and *pfge* analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. *African J. Microbiol. Res.* 2014;8(2):129–137.
 43. **Arias CA, Panesso D, Singh K V, Rice LB, Murray BE.** Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(10):4240–6.
 44. **Willems RJ, van Schaik W.** Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol.* 2009;4(9):1125–35.
 45. **Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N.** The N-terminal domain of enterococcal surface protein, *Esp*, is sufficient for *Esp*-mediated biofilm

- enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2005;187(17):6213–22.
46. **Mohamed JA, Huang DB.** Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 2007;56(12):1581–1588.
 47. **Budzik JM, Schneewind O.** Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. *J. Clin. Invest.* 2006;116(10):2582–4.
 48. **Nallapareddy SR, Singh K V, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE.** Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* 2006;116(10):2799–807.
 49. **Qin X, Singh K V, Weinstock GM, Murray BE.** Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.* 2001;183(11):3372–82.
 50. **Singh K V, Qin X, Weinstock GM, Murray BE.** Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 1998;178(5):1416–20.
 51. **Engelbert M, Mylonakis E, Ausubel FM, Calderwood SB, Gilmore MS.** Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 2004;72(6):3628–33.
 52. **Hancock LE, Perego M.** The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 2004;186(17):5629–39.
 53. **Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G, Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR.** Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int. J. Artif. Organs* 2006;29(4):402–6.
 54. **Qin X, Singh K V, Weinstock GM, Murray BE.** Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 2000;68(5):2579–86.
 55. **Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ.** Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.* 2001;183(24):7341–53.

56. **Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE.** Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2004;72(6):3658–63.
57. **Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J.** A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J. Infect. Dis.* 2004;189(3):420–30.
58. **Mohamed JA, Teng F, Nallapareddy SR, Murray BE.** Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* sagA-like genes, salA and salB, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type i and fibronectin. *J. Infect. Dis.* 2006;193(2):231–40.
59. **Murray BE, Weinstock GM.** Enterococci: New Aspects of an Old Organism. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1999;111(4):328–334.
60. **Waar K, Muscholl-Silberhorn AB, Willems RJL, Slooff MJH, Harmsen HJM, Degener JE.** Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. *J. Infect. Dis.* 2002;185(8):1121–7.
61. **Theilacker C, Krueger WA, Kropec A, Huebner J.** Rationale for the development of immunotherapy regimens against enterococcal infections. *Vaccine* 2004;22 Suppl 1:S31–8.
62. **Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L.** Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;256(1):145–50.
63. **Extremina CI, Costa L, Aguiar AI, Peixe L, Fonseca AP.** Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J. Microbiol. Methods* 2011;84(2):167–73.
64. **Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L.** Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J. Med. Microbiol.* 2004;53(Pt 1):13–20.

65. **Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 1999;67(1):193–200.
66. **Sandoe JAT, Wytome J, West AP, Heritage J, Wilcox MH.** Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57(4):767–70.
67. **AKÇELİK N, AKÇELİK M.** In Vitro Production of MisL Autotransporter Protein in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2009;17:159–166.
68. **Woodward MJ, Sojka M, Sprigings KA, Humphrey TJ.** The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J. Med. Microbiol.* 2000;49(5):481–7.
69. **Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2000;40(2):175–9.
70. **Rasmussen R.** Quantification on the LightCycler. İçinde: Meuer PD med S, Wittwer PDC, Nakagawara DK-I, ed. *Rapid Cycle Real-Time PCR*. Springer Berlin Heidelberg; 2001:21–34.
71. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
72. **Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002;29(1):23–39.
73. **Macovei L, Ghosh A, Thomas VC, Hancock LE, Mahmood S, Zurek L.** *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environ. Microbiol.* 2009;11(6):1540–7.
74. **Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N.** Enterococcal surface protein, *Esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2004;72(10):6032–9.

75. **Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N.** Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2006;188(6):2063–72.
76. **Diani M, Esiyok OG, Ariafar MN, Yuksel FN, Altuntas EG, Akcelik N.** The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. *African J. Biotechnol.* 2014;8(2):129–137.
77. **Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW.** Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 2005;34(3):597–601.
78. **Shockman GD, Cheney MC.** Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. V. Nature of the autolysin-cell wall complex and its relationship to properties of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 1969;98(3):1199–207.
79. **Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM.** Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.* 2003;185(12):3613–23.
80. **Mohamed JA, Murray BE.** Lack of Correlation of Gelatinase Production and Biofilm Formation in a Large Collection of *Enterococcus faecalis* Isolates Lack of Correlation of Gelatinase Production and Biofilm Formation in a Large Collection of *Enterococcus faecalis* Isolates. 2005;43(10):5405–5407.
81. **Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I.** The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67(10):4538–45.
82. **Van Merode AEJ, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP.** Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2006;188(7):2421–2426.
83. **Van Wamel WJB, Hendrickx APA, Bonten MJM, Top J, Posthuma G, Willems RJJ.** Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2007;75(2):924–31.
84. **Ramadhan AA, Hegedus E.** Biofilm formation and *esp* gene carriage in

- enterococci. *J. Clin. Pathol.* 2005;58(7):685–6.
85. **Flemming HC, Wingender J.** Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 2001;43(6):1–8.
 86. **Uttley AH, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, Morrison D, Gilfillan AJ, Fitch LE, Heptonstall J.** High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol. Infect.* 1989;103(1):173–81.
 87. **Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P.** Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198807213190307> 2010.
 88. **Arias CA, Murray BE.** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10(4):266–78.
 89. **Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D YA ve ark.** Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *Ankem Derg 131* 1999;1-4:4.
 90. **Shankar N, Lockatell C V, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE.** Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 2001;69(7):4366–72.
 91. **Eaton TJ, Gasson MJ.** A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002;216(2):269–75.
 92. **Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N.** Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2004;72(10):6032–9.
 93. **Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR.** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001;183(9):2888–96.

8. EKLER

Ek 1. esp primer çiftlerinin bağlanma bölgeleri

>gi|3873186|gb|AF034779.1| *Enterococcus faecalis* surface protein precursor, gene, complete cds

TATTTACAAGAATTCCTATTTTGTATTATTTATAATAAAAAATGTAATTTTAAATTTAAATAAGGAAGGGAGCAAATTTAGT
TTGTTTGGAAAAACAATAAGCATATGATTTTAAAAAAGGGAGAAAAAGAGTATTAAAGTATAGCATAAAAAAATTAAGT
GTGGGTGTTGCATCAGTATTAGTTGGTGTAGGCCTTGTTTTTGGGGCAACTGGAATAGTTAATGCACAAATGGGTGAAGGA
AGATTAGCAAATTATTCTGCTTCAGGAAATACGTTTCAAGAAAAATCCGGGATATACGAAGAATTATAATTTCTCGGATTTA
CAATTC AACCTAAAGCAATAACTGGTGATGTGTTACAGGGAAATACAATTGATTTTGAGGTTTATGGGAAACATAATATT
GCAGCTTCAACTGCAAACGGGAAATTCGTCTTCAATTAGATGAACGATTGGCCAGTATGTGAAAAAATTC AAGTTGAT
CCGAAGAAGGGCGTAGGAAATAGTAGACGAACCTTTTGTAGAATTAATGATTCGCTTGGCAGACCTACAAACATTTGGAAG
GTTAATTACATTCGAGCAAATGATGGACTATTTGCTGGGGCAGAAACAACCTGATACACAACTGCTCCTAACGGTGTGATT
ACATTTGAAAAAATTTAGATGAAATTTTAAAGAAATTTGGTGCAGATAATCTTAAAAGCGACCGTTTAAATGTATCGTATC
TATTTGGTAAGTCATCAAGATGACGATAAAATTTGACCTGGAATAGAAAGCACTGGTTACTTTTTGACAGATCAAGATGAT
TTCTATAATAAGTTAGATGTATCCGAAAATAATTCTGATCAATTTAAGCATGGATCGGTAAATACTAAATATGAAGAAGCT
AATATCCAAACAAAAGACGGTTCTGGGTCTACTGGTGCTAATGGAGCTATAATTTTAGATCATAAGTTAACGAAAAGAAAAG
AATTTTTCTTATTCAACTTCTGCAAAGGGAAACGCCTTGGTATGCTAACTACAAAATCGATGAACGTTTAGTACCATATGTA
TCTGGAATACAAATGCATATGGTTCAGGCTGATAAAGTGGCATATAATGTTGCTTTTGAATCAGGAAAAAAGTGGCTGAT
TTAGCAATTGAGCGACGTGAAGGTCATGAGAATTATGGTATGGGTTCAATCACTGACAATGATTTAACTAACTTATTGAT
TTTGCTAATGCTAGTCCACGACC TATCGTTGTTAGATATGTTTTACAACCTGACTAAACCTTTAGATGAAATCTTAGAAGAA
ATGAAAGCAGCGGATAAAATCGAAGAAAATGCGCCATTTGGTGAAGATTTTCATCTTTGATTCCTGGTTGTCGGATACGAAT
AAAAAATTAATCCAGAACACTTATGGAACAGGTTATTATTATTTGCAAGATATTGATGGTGATGGAACCCCTGACGATAAA
GAAGAGAGCGGAGACACGAATCCATATATCGGGAAACCTGAATTAGAAGAAGTATATGATGTTGACACAACAGTTAAGGGG
AAAGTATTCATCCACGAGTTAGCGGGAACAGGTCACAAAGCGCAACTTGTGATAAAGAAGTACTGTATTAGCAGAAAAA
ACTATCGCTCCAAATGAAAAAGATGGGGCTCCAATTTAGATACTGTAGAATTTGAATTTACGGGTGTAGATTC AAGTAAA
CTAATCGGAAAGATGAATTA AAAATCCAAATCGTTTCTCCAGGTTTTGATAAACCAGAAGAAGGTTCAACCGTTATTAAG
GAATCACCAAAAGCGGTTGATAAACAAACCGTGGTAGTTGGATTTAAACCAGATGCTAAAGAATCAATTCGGAATAATAAAA
AACTTACCTGAAGATGCAGAGTATTCATGGAAAACAGAGCCTGATACTTCTAACGTTACTGATAGTACGAAAGGTATTGTA
ACTGTTAAGATAGGAAATCGAACTTTCGACGTGGATGTAGAGTTTGCTGTAAAAGCTTCTCAAGCTATGGAAAATGATGCA
ACATACGTACCTATAACAACAACCCAGAAAACGACAATTC AAAGTGGTAAACCTACATTTGATAAAACCAGATGTTCCCTCTA
GCTAACGATGCCTTTTTCAGTTTTAGATGTTTATAATAAGGACTTCGGCAATGCAAGTGTGACGC AAATACTGGTATTGTT
ACATTCCTCCAGCTAAAGGTGTAGGAGAATCGGAGCCGATTACTGGAACAATTCCTATTTAAAATTTGTTTACCAAGATGGT
TCTGTAGGCACGACCGATTAGCAGTA ACTGTAAGTAAAAATATTTATGAAAAATCCAGGAGAAAAACATTCCTGCAGGCTAC
CACAAAGTAACCTTCACCGCAGGAGAAGGAACAAGTATTGAAAGTGAACAACAGTCTTTGCAGTGAAAGACGGCGTAAGC
TTACCAGAAGATAAACTTCCGGTGTGAAAGCAAAGATGGTTATACAGATGCGAAATGGCCAGAAGAAGCAACGCAACCA
ATTAAGCAGATGATACAGAATTTGTATCAAGTGAACAAAATTTGGATGATATCATTGAAAACCCAGGGGATAACATTCCT
GCAGGCTACCACAAAGTAACCTTCACCGCAGGAGAAGGAACAAGTATTGAAAGTGAACAACAGTCTTTGCAGTGAAAGAC
GGCGTAAGCTTACCAGAAGATAAACTTCCGGTGTGAAAGCAAAGATGGTTATACAGATGCGAAATGGCCAGAAGAAGCA
ACGCAACCAATTAAGCAGATGATACAGAATTTGTATCAAGTGAACAAAATTTGGATGATATCATTGAAAACCCAGGGGAT

AACATTCCCTGCAGGCTACCACAAAGTAACCTTCACCGCAGGAGAAGGAACAAGTATTGAAAGTGGAACAACAGTCTTTGCA
GTGAAAGACGGCGTAAGCTTACCAGAAGATAAACTTCCGGTGTGAAAGCAAAAAGATGGTTATACAGATGCGAAATGGCCA
GGAGAAGCAACGCAACCAATTAAGCAGATGATACAGAATTTGTATCAAGTGCAACAAAATTTGGATGATAAATCTGATGCT
GACAAATATACTCCTGAAGGTCAAAAAGTGACTACAGAATTTGAATAAAGAACCCTGACGCATCTGAGGGAATTAATAAAG
AAAGATTTA CCAAAAAGATGCTAAGTATACTTGG AAAGAAAAAGTAGATATTAGTACAGCTGGAAATAAAAAAGGTACGGTT
GTAGTGACATATT CAGATGGATCATCTGATGAAGT TGAAGTAGATGTCACAGTAACAGACAATCGCTCTGACGCTGATAAA
TATGAGCCAACAGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATCGGTGGTAAAGTAGATTTAACAGATAACGTTACTAACTTACCAACG
TTACCACAAGGAACAACAGTAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCAGGTAATTACGAAGGTGTC
ATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGACAATCGCTCTGACGCTGAT
AAATATGAGCCAACAGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATCGGTGGTAAAGTAGATTTAACAGATAACGTTACTAACTTACCA
ACGTTACCACAAGGAACAACAGTAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCAGGTAATTACGAAGGT
GTCATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGACAATCGCTCTGACGCT
GATAAATATGAGCCAACAGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATCGGTGGTAAAGTAGATTTAACAGATAACGTTACTAACTTA
CCAACGTTACCACAAGGAACAACAGTAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCAGGTAATTACGAA
GGTGTTCATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGACAATCGCTCTGAT
GCTGATAAATATACACCAATGGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATCGGTGGTAAAGTAGATTTAACAGATAACGTTACTAAC
TTACCAACGTTACCACAAGGAACAACAGTAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCAGGTAATTAC
GAAGGTGTTCATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGACAATCGCTCT
GACGCTGATAAATATGAGCCAACAGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATGGTGGTAAAGTAGATTTAACAGATAACGTTACT
AACTTACCAACGTTACCACAAGGAACAACAGTAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCAGGTAAT
TACGAAGGTGTTCATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGACAATCGC
TCTGACGCTGATAAATATGAGCCAACAGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATCGGTGGTAAAGTGGATTTAACAGATAACGTT
ACTAACTTACCAACGTTACCACAAGGAACAACAATAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCAGGT
AATTACGAAGGTGTTCATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGACAAT
CGCTCTGACGCTGATAAATATGAGCCAACAGTAGAAGGTGAAAAAGTAGAAATCGGTGGTAAAGTGGATTTAACAGATAAC
GTTACTAACTTACCAACGTTACCACAAGGAACAACAATAACAGATGTTACTCCTGGTGGTACAATCGATACTAATACACCA
GGTAATTACGAAGGTGTTCATTGAAGTAACGTATCCAGATGGTACAAAAGATACAGTAAAAGTTCCAGTAGAAGTAACAGAC
AATCGCTCTGACGCTGATAAATATACACCTAAAGGTCAAAAAGTAACTACTGAATTAATAAAGAACCAGAAGCATCTGAT
GGAATTAATAAATAAATCGGATCTACCAAAAGGAAGTATGTATTTTGGAAAGAAAAAGTAGATGTGGGTATACCTGGAAAT
AAAAAGCTACTGTTGTAGTAATATATCCAGATGGATCTAAAGAAGAGGTAGAGGTTGTTATTTCTGTAGTAGATAAAAAA
GCGCCGAATAAACCTCAAGTTGATCCTATTACAGATGGTGACAAAATTTGTTACTGGTAAAACCTGAACCAAAT GCAGATGTA
ACAGTAACGTTAC CTGATGGAAGTCAATACCATGGCACAGCTGATAAGAGTGGTTACTTTAAAGTTAACGTTCCATAATTA
GAGGCAGGGACAAAAGTAAAAGTAACTTCAACTGATGAATCTGGCAATACTAGTGAACCTACTGATGTAGTTGTTTCGTCA
AATGAATTAACGGTGGAAAAGGTAATGGAACAGACAGTAAGACTAACAACAATCAAGATAAAAAACAATTTCTGAAAACCT
TATCCTAAAACAGGAGAGGTTGATAGTAATATTTATACATATGCTGGTGGTTAATATTGTTAGGAACTTTAGGGTTATTA
GGGTATGAAAAATGAAAAAAGAGGATGAATAGAAGTTTTAAATATTTAAATATTTCTCTGAAAAGAGGAAGAAGTCTCTTCC
TCTTTTTGTTTTATTGTTGTTTATTTAAATAATATTGTGG

*esp11-12 esp46-47 esp2-5 esp 1-2

Ek 2. *esp* genin N-terminal bölgesinin dizi analizi

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structures Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident	Links
NC_017312.1	Enterococcus faecalis 62 chromosome, complete genome	813	813	100%	0.0	98%	

Alignments

Select All Get selected sequences Distance tree of results

> ref|NC_017312.1 Enterococcus faecalis 62 chromosome, complete genome
Length=2988673

Features in this part of subject sequence:
Enterococcal surface protein, ESP

Score = 813 bits (440), Expect = 0.0
Identities = 458/465 (98%), Gaps = 7/465 (2%)
Strand=Plus/Plus

Score = 813 bits (440), Expect = 0.0
Identities = 458/465 (98%), Gaps = 7/465 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      CAAATGCATGATGGGTTGAGGCTGATGAAAGTGGCATGATGAATGTGTTTCGTTTGAATGC 60
Sbjct 896337  CAAATGCAT-AT-GGTTGAGGCTGAT-AAAGTGGCAT-AT-AATGT-TTCGTTTGAAT-C 896389

Query 61     AGGaaaaaaaaGTGGCTGATTTAGCGATTGAGCGACGTGAAGTTCATGAGAATTATGGTAT 120
Sbjct 896390  AGGAAAAAAAAAGTGGCTGATTTAGCGATTGAGCGACGTGAAGTTCATGAGAATTATGGTAT 896449

Query 121    GGGTTCAATCACTGACAATGATTTAACTAAACTTATTGATTTTGCTAATGCTAGTCCAG 180
Sbjct 896450  GGGTTCAATCACTGACAATGATTTAACTAAACTTATTGATTTTGCTAATGCTAGTCCAG 896509

Query 181    ACCTATCGTTGTTAGATATGTTTTACAACCTGACTAAACCTTTAGATGAAATCTTAGAAGA 240
Sbjct 896510  ACCTATCGTTGTTAGATATGTTTTACAACCTGACTAAACCTTTAGATGAAATCTTAGAAGA 896569

Query 241    AATGAAAGCAGCGGATAAAAATCGAAGAAAATGCGCCATTTGGTGAAGATTTCACTTTGA 300
Sbjct 896570  AATGAAAGCAGCGGATAAAAATCGAAGAAAATGCGCCATTTGGTGAAGATTTCACTTTGA 896629

Query 301    TTCTTGGTTGTCGGATACGAATAAAAAAATAATCCAGAATACTTATGGAACAGGTTATTA 360
Sbjct 896630  TTCTTGGTTGTCGGATACGAATAAAAAAATAATCCAGAATACTTATGGAACAGGTTATTA 896689

Query 361    TTATTTGCAAGATATTGATGGTGATGGAACCCTGACGATAAAGAAGAGAGCGGAGACAC 420
Sbjct 896690  TTATTTGCAAGATATTGATGGTGATGGAACCCTGACGATAAAGAAGAGAGCGGAGACAC 896749

Query 421    GAATCCATATATCGGGAAACCTGAATTAGAAGAAGTATATGATGT 465
Sbjct 896750  GAATCCATATATCGGGAAACCTGAATTAGAAGAAGTATATGATGT 896794
  
```

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Maryam DIANI

Doğum Yeri: İran

Doğum Tarihi: 24.06.1983

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Türkçe

Eğitim Durumu

Lise: İran- Hedef Lisesi (1996-2000)

Lisans: İran-Arak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Mikrobiyoloji (2002-2006)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji (2008-2010)

İş Tecrübesi

Kurumu: TUBİTAK 2216

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2010-2014

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Doktora Tezinden Yapılan Yayınlar

Diani M, Gunay Esiyok O, Ariafar M.N, Yuksek F.N, Gunes Altuntas E, Akcelik N. The interactions between esp, fsr, gelE genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical Enterococcus faecium strains. African Journal of Microbiology Research. 2013; Vol. 8(2):129-137.

Uluslararası Kongreler

M. Diani, Ö. Günay, M.N. Badali, F.N. Yüksel, B. Buyer, E. Gunes Altuntas, N. Akçelik. “Difference in biofilm producing ability between rectal, urine and blood *Enterococcal* isolates from Turkey.”, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

Tez Dışında Doktora Sürecinde Yapılan Yayınlar ve Bildiriler

O. Gunay Esiyok, N. Yüksel, **M. Diani**, M.N. Badali, N, Akcelik. “Determination of genetic diversity among vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and identification of virulence genes by polymerase chain reactions (PCR)”. 24rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 2014.

M.N. Badali, N. Igci, **M. Diani**, M. Akcelik, N. Akcelik. “Investigation of the effect of different temperature and acidic conditions on biofilm structure of *Salmonella enterica* serotype Virchow by FTIR spectroscopy”. 24rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 2014.

M.N. Badali, **M. Diani**, N. Taskale Karatug, N. Akçelik, M. Akçelik. “Biofilm producing ability of *Salmonella enterica* serotype Virchow, isolated from Turkey.”, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

E. Günes Altuntas, **M. Diani**, M.N. Badali, B. Yener İlçe, N. Akçelik, M. Akçelik. “Comparison of two different evaluation methods for biofilm formation of bacteria isolated

from teeth” 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

M. N. Ariafar, E. Güneş Altuntaş, B.Yener İlçe, **M. Diani**, N. Akçelik “Kekik ve yeşil çay ekstraktinin biyofilm oluşturan ve dişlerden izole edilmiş olan *streptococcus* spp. Üzerindeki etkisi” Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, Türkiye, 2013.

