



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM
SENSING İNHİBİTÖRÜ LİKEN SEKONDER
METABOLİTLERİNİN VE İNHİBİSYON
MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

BARIŞ GÖKALSIN

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2021



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM
SENSING İNHİBİTÖRÜ LİKEN SEKONDER
METABOLİTLERİNİN VE İNHİBİSYON
MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

BARIŞ GÖKALSIN

720115003

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2021

TEŞEKKÜR

Tez sürecimde yardımlarını esirgemeyen, çalışma olanaklarını sağlayan, bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren ve her aşamada destek olan değerli danışmanım Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL'a; tez izleme komitemde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Yıldız AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi İskender KARALTI'ya; jüri üyelerim Prof. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER ve Dr. Öğr. Üyesi Vahap ELDEM'e

Üzerimde emeği geçen ve bana her daim destek olan Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki tüm değerli öğretim görevlileri ve araştırma görevlilerine,

Deneyselerimde, tez sürecimde ve birlikte çalıştığımız projelerde yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarında birlikte çalışmaktan zevk aldığım Doç. Dr. Didem BERBER, Dr. Birkan AÇIKGÖZ, Tunahan Irmak BAŞARAN, Ezgi UÇARKUŞ, Şevval Maral ÖZCAN, Nazlıhan YILDIRIM, Orçun TOKSÖZ, Arhun Ali BALKAN, Ayla YILDIZ, İpek TÜRKMENOĞLU, Yiğitcan ÖZBAY, Elif YAMAN, İlkay İSPİ, Elif MURCAK, Gamze KURTULUŞ başta olmak üzere tüm çalışma ekip arkadaşlarıma; Dr. Merve ERGİNER HASKÖYLÜ'ye ve manevi destekleri ile beni bilimsel çalışmalarım için motive etmiş tüm arkadaşlarıma,

Yurt dışında bana laboratuvarlarını açarak çalışma olanağı sağlayan ve yeni bilgiler edinmeme yardımcı olan Prof. Dr. Tzanko TZANOV ve Doç. Dr. Kojiro HARA'ya,

Tez sürecini FEN-C-DRP-131217-0680 no'lu proje ile destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne, BİDEB-2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında "Likenslerdeki Fungal Topluluklar için Metabarkodlama ve Metabolit Analizleri" başlıklı araştırma ve 216S885 no'lu "Türk Liken Biyokaynakları Kullanılarak Bakteriyel Quorum Sensing İnhibitörü Yeni Antimikrobiyal Bileşenlerin Geliştirilmesi ve Sanayiye Aktarılması" başlıklı proje kapsamında desteklerini sunan TÜBİTAK'a,

Bana her zaman destek olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mart / 2021

Barış GÖKALSIN

İÇİNDEKİLER	SAYFA
TEŞEKKÜRLER	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
YENİLİK BEYANI	viii
SEMBOLLER	ix
KISALTMALAR	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama)	1
1.1.1 Quorum sensing inhibisyonu	3
1.2. QSI Metabolitlerin Belirlenmesi	3
1.3. Liken Sekonder Metabolitleri	4
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.4.1. <i>P. aeruginosa</i> quorum sensing sistemleri	7
1.4.2. <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm	8
1.4.3 <i>P. aeruginosa</i> QS inhibisyonu	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM	11
2.1. Materyal	11
2.1.1. Bakteri suşları	11
2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	11
2.1.3. Kullanılan cihazlar	12
2.1.4. Besiyerlerinin hazırlanması	14
2.1.4.1. Sıvı besiyeri - Lysogeny Broth (LB Broth)	14
2.1.4.2. Sıvı minimal besiyeri - M9 Minimal Medium	14
2.1.4.3. Katı besiyeri - Lysogeny Agar (LB Agar)	14
2.2. Yöntem	15
2.2.1. Liken cins ve türlerinin toplanması ve teşhisi	15
2.2.2. Liken örneklerinden özüt eldesi	15

2.2.3. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması	15
2.2.3.1. Biyomonitör suşların yoğunluklarının belirlenmesi	16
2.2.3.2. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının çoğaltılması ve zamana bağlı büyüme eğri analizlerinin yapılması	17
2.2.4. Floresan biyosensör yöntemiyle QSI taraması	17
2.2.4.1. Liken özütlerinin biyomonitör suşlara uygulanması	17
2.2.4.2. GFP ekspresyon ölçümleri	17
2.2.5. Liken özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> üzerinde biyofilm inhibisyonu özelliklerinin belirlenmesi	18
2.2.6. Etkileri belirlenen liken özütlerinin içerdiği metabolitlerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi ve izolasyonu	18
2.2.7. Metabolitlerin <i>P. aeruginosa</i> sensör suşları üzerinde QSI özelliklerinin belirlenmesi	19
2.2.8. Metabolitlerin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerinde anti-biyofilm özelliklerinin belirlenmesi	19
2.2.9. Virülans analizleri	19
2.2.9.1. Piyosianin üretimi	19
2.2.9.2. Elastaz aktivitesi	19
2.2.9.3. Proteaz aktivitesi	20
2.2.10. Gen ekspresyon analizleri	20
2.2.10.1. RNA izolasyonu	20
2.2.10.2. cDNA sentezi	20
2.2.10.3. Hedef genlere uygun primer tasarımı	21
2.2.10.4. kRT-PZR ile cDNA'ların çoğaltılması	22
2.2.10.5. kRT-PZR bulgularının analizi	23
2.2.11. Metabolitlerin hücre kültürü yöntemi ile toksik etkilerinin araştırılması	23
2.2.11. Yeni-nesil RNA sekanslama ve transkriptomik analizler	24
2.2.11.1. Örneklerin kalite kontrolü	25
2.2.11.2. Kütüphane hazırlanması ve sekanslama	25
2.2.11.3. Biyoinformatik analizler	27
2.2.13. İstatiksel analizler	28

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
3.1. Bulgular	29
3.1.1. Toplanan likenlerin cins ve türleri	29
3.1.2. Likenlerden özüt eldesi	30
3.1.3. Bakteri suşlarının büyüme eğrileri	31
3.1.4. Özütlerin <i>P. aeruginosa</i> biyomonitör suşları üzerinde quorum sensing	33
inhibisyonu (QSI) özelliklerinin belirlenmesi	
3.1.4.1. Absorbans ve floresans grafiklerinin yorumu	34
3.1.4.2. <i>lasB-gfp</i> biyosensör suşu bulguları	35
3.1.4.3. <i>rhlA-gfp</i> biyosensör suşu bulguları	38
3.1.5. Liken özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> üzerinde biyofilm inhibisyonu	41
bulguları	
3.1.6. Etkileri belirlenen liken özütlerinin içerdiği metabolitlerin	43
kromatografik yöntemlerle belirlenmesi ve izolasyonu	
3.1.7. Metabolitlerin <i>P. aeruginosa</i> monitör suşları üzerinde QSI özellikleri	48
3.1.8. Metabolitlerin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerinde biyofilm	50
inhibisyonu	
3.1.9. Virülans analizleri	53
3.1.9.1. Piyosiyenin üretimi	54
3.1.9.2. Elastaz analizi	55
3.1.9.3. Proteaz analizi	56
3.1.10. QS bağlantılı virülans gen ekspresyonu inhibisyonları	57
3.1.11. Metabolitlerin hücre kültürü yöntemi ile toksik etkilerinin	59
araştırılması	
3.1.12. Yeni-nesil RNA sekanslama ve transkriptomik analizler	60
3.1.12.1. Yeni-nesil sekanslama okumalarının kalite bulguları	60
3.1.12.2. Biyoinformatik analizler	61
3.1.13. İstatiksel analizler	66
3.2. Tartışma	68
3.2.1 Liken örneklerinin toplanılması ve özüt eldesi	69
3.2.2 Özütlerin QSI özelliklerinin araştırılması	70
3.2.3 Özütlerin <i>P. aeruginosa</i> biyofilm oluşumu üzerine etkisi	71

3.2.4 Özütlelerin sekonder metabolit içeriklerinin belirlenmesi	71
3.2.5 Sekonder metabolitlerin <i>P. aeruginosa</i> QS sistemleri, biyofilm oluşumu ve virülans faktörleri üzerine etkileri	73
3.2.6. kRT-PZR deneyleri	74
3.2.7. RNAseq analizleri	76
3.2.7.1. Psoromik asitin QS bağlantısı olmayan metabolizmalar üzerine etkileri	77
4. SONUÇLAR	79
KAYNAKLAR	81
EKLER	92
ÖZGEÇMİŞ	168

ÖZET

PSEUDOMONAS AERUGINOSA QUORUM SENSING İNHİBİTÖRÜ LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN VE İNHİBİSYON MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa*'nın patojenitesinin, çevresindeki organizmalar tarafından algılanabilecek moleküller ile iletişimine dayalı “salt çoğunluk algılama” (Quorum Sensing, QS) ile düzenlendiği bilinmektedir. Bakterileri öldürmeden QS sistemlerini inhibe ederek onları etkisiz ve savunmasız halde bırakmak “quorum quenching” (QQ) olarak isimlendirilmekte ve anti-virülans yaklaşımlar arasında önemli bir yol olarak kabul edilmektedir. Yeni QS inhibitörü metabolitlerin araştırılmasında çoğunlukla doğal kaynaklar kullanılmaktadır. Likenler, geniş ve kendilerine özgü sekonder metabolitleri ile bu bağlamda yüksek potansiyele sahiplerdir.

Bu çalışmanın amacı ülkemiz liken türlerine ait özütlerin *P. aeruginosa* üzerindeki QQ etkilerini belirlemek, etkili türlerin sekonder metabolit içeriklerini analiz etmek, baskın olarak bulunan sekonder metabolitlerin seçilerek QS bağlantılı virülans faktörleri üzerindeki etkilerini incelemek ve *P. aeruginosa* transkriptomunda meydana gelen değişiklikleri araştırmaktır. Çalışmada farklı bölgelerden 17 liken türüne ait 34 örnek toplanmış, referans ve GFP temelli biyomonitör suşlar kullanılarak QS ve biyofilm inhibitörü içerebilecek etkili örnekler belirlenmiştir. Kromatografik yöntemler ile etkili özütlerin içerikleri analiz edilmiştir. Seçilen atranorin ve psoromik asit saf metabolitlerin *P. aeruginosa* QS, biyofilm ve virülans faktörlerine karşı inhibisyon miktarları monitör suşlar, biyokimyasal analizler ve kRT-PZR yöntemleri kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir. İki metabolitin de uygulanan konsantrasyonlarda yüksek virülans inhibisyonu gerçekleştirdiği anlaşılmıştır. Ayrıca, insan fibroblast hücre hattında canlılığa olan etkileri araştırılmış ve atranorinin canlılığı %50 kadar azalttığı tespit edilmiştir. Psoromik asit uygulaması yapılan *P. aeruginosa* transkriptomunda gerçekleşen tüm değişimler yeni-nesil RNA sekanslama aracılığı ile incelenmiştir. Sonuçlara göre QS bağlantılı genler dahil toplam 533 genin aşağı-regüle, 664 genin ise yukarı-regüle olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, likenlerin QS inhibisyonu için önemli bir kaynak olabileceğini ve psoromik asit metabolitinin *P. aeruginosa*'ya karşı bu amaçla kullanılabileceğini öne sürmektedir.

ABSTRACT

DETERMINATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING INHIBITOR LICHEN SECONDARY METABOLITES AND THEIR INHIBITION MECHANISMS

Opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* regulates its pathogenicity through communication via small and diffusible molecules, that is called "quorum sensing" (QS). Inhibition of QS systems without killing the bacteria and thus leaving them ineffective and vulnerable is called "quorum quenching" (QQ), which is considered an important method for anti-virulence approach. Natural resources are used in search for new QS inhibitor metabolites. Lichens have high potential in this context with their unique and broad range of secondary metabolites.

The aim of this study is to determine the QQ effects of extracts from lichen species in our country on *P. aeruginosa*, to analyze secondary metabolite contents of the effective species, to examine the effects of dominant secondary metabolites on QS-related virulence factors and to investigate the changes in *P. aeruginosa* transcriptome. To this end, 34 samples belonging to 17 lichen species from different regions were collected and the effective samples that may contain QS and biofilm inhibitors were determined by reference and GFP-based biomonitor strains. The metabolite ingredients of the effective extracts were analyzed via chromatographic methods. Inhibitions of selected pure metabolites of atranorine and psoromic acid against *P. aeruginosa* QS, biofilm and virulence factors were quantitatively determined using monitor strains, biochemical analyses and qRT-PCR methods. Both metabolites performed high virulence inhibition for the applied concentrations. In addition, the effects on viability in human fibroblast cell line were investigated and it was found that atranorine reduced viability by 50%. All changes in *P. aeruginosa* transcriptome treated with psoromic acid were analyzed by next-generation RNA sequencing. According to the results, a total of 533 genes, including QS related genes, were down-regulated and 664 genes were upregulated. The results obtained suggest that lichens can be an important source for QS inhibition and that the psoromic acid metabolite can be used against *P. aeruginosa* for this purpose.

YENİLİK BEYANI

Son yıllarda bakteri kaynaklı pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan topikal ilaçların ve antibiyotiklerin sorunların tam olarak giderilmesinde yetersiz kaldığı bildirilmektedir. Bu sebeple alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması gerekliliği öne çıkmaktadır. Dolayısıyla, QS inhibisyonu başta olmak üzere yenilikçi anti-virülans yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Bu amaçla, hastalığın tedavisinde etkili olabilecek, yan etki ve toksisite riski düşük, biyolojik materyallerden elde edilen doğa kaynaklı daha güçlü ve yararlanımı yüksek yeni etken maddelerin keşfinin ve kullanılmasının önemi gün geçtikçe artmaktadır. İlaç keşfi ve geliştirilmesinde öncü bileşiğin bulunması aşamasında doğa ve özellikle bitkilerdeki zengin sekonder metabolit çeşitliliği en önemli kaynaklardandır. Onaylanmış ilaçların %60'ından fazlası doğal kökenli olmasına rağmen, dünyanın biyolojik çeşitliliğinin %10'undan daha azının potansiyel biyolojik aktivite için değerlendirildiği düşünüldüğünde, ilaç etken maddesi için doğada halen büyük bir potansiyelin keşfedilmeyi beklediği görülmektedir. Bu noktada tıbbi özellikleri itibarıyla dünyada ve ülkemizde antik çağlardan beri halk arasında birçok hastalığın tedavisinde kullanılan likenlerin yeni ilaç keşfinde ve çeşitli endüstri alanlarında kullanılabilecek önemli bir canlı grubu olduğu düşünülmektedir. Fakat liken maddeleri ile gerçekleştirilmiş anti-virülans çalışmaları sınırlı sayıdadır. Özellikle ülkemizde geniş çeşitliliğe sahip liken türlerinin *P. aeruginosa* QS sistemlerine karşı etkilerine ait yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen çalışmada, farklı bölgelere ait daha önce *P. aeruginosa* üzerinde anti-virülans etkileri araştırılmamış örnekler toplanarak ilk kez GFP temelli monitör suşlar üzerinde uygulamaları yapılmıştır. Etkili liken örneklerinin sekonder metabolit içerikleri, Japonya'da bu konuda tecrübeli ekipler ile ortak olarak ortaya çıkarılmıştır. Seçilen saf liken sekonder metabolitlerinin QS ve biyofilm inhibisyonları ve virülans faktörlerine karşı etkinlikleri ilk kez bu çalışma ile detaylandırılmıştır. Psoromik asit sekonder metabolitinin *P. aeruginosa* transkriptomunda meydana getirdiği tüm değişikliklerin açığa çıkarılması da ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

SEMBOLLER / SYMBOLS

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
3-oxo-C12-HSL	: N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin Lakton
C4-HSL	: N-bütanoyl Homoserin Lakton
C6-HSL	: N-hekzanoyl Homoserin Lakton
HCl	: Hidroklorik Asit
g	: Gram
l	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
M	: Molar
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
T _m	: Erime sıcaklığı

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

AHL	: Açıl Homoserin Lakton (Acyl Homoserine Lactone)
AI	: Otoindüktör (Autoinducer)
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Cq	: Eşik Değeri (Crossing Point)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
kRT-PZR	: Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
OD	: Optik Yoğunluk (Optical Density)
PAI	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> otoindüktör molekülleri
PQS	: <i>Pseudomonas</i> Kinolon Sinyali
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNAseq	: Yeni-nesil RNA sekanslama
QQ	: Salt Çoğunluk Baskılama (Quorum Quenching)
QS	: Salt Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing)
QSI	: Quorum Sensing İnhibitörü (Quorum Sensing Inhibitor)
UV	: Ultraviyole (Ultraviolet)

ŞEKİLLERİN LİSTESİ	SAYFA
Şekil 1.1 <i>P. aeruginosa</i> QS sinyal molekülleri.	8
Şekil 1.2 <i>P. aeruginosa</i> QS sistemlerinin regülasyon yollarının şematik olarak gösterimi.	8
Şekil 2.1 RNA kütüphanesi hazırlanmasındaki adımlar	26
Şekil 3.1. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşuna ait zamana bağlı büyüme eğri analizi.	32
Şekil 3.2. <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşuna ait zamana bağlı büyüme eğri analizi.	32
Şekil 3.3 <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşuna ait zamana bağlı büyüme eğri analizi.	33
Şekil 3.4 Grafiklerin yorumlanması için verilen şablon grafik.	34
Şekil 3.5 Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (H4, H5, H6) dozlarının <i>las</i> sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).	36
Şekil 3.6 Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (B4, B5, B6) dozlarının <i>las</i> sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).	37
Şekil 3.7 Bolu Mudurnu bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının <i>las</i> sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).	37
Şekil 3.8 Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (H4, H5, H6) dozlarının <i>rhl</i> sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).	39
Şekil 3.9 Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (B4, B5, B6) dozlarının <i>rhl</i> sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).	40

Şekil 3.10	Bolu Mudurnu bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının <i>rhl</i> sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).	40
Şekil 3.11	Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının biyofilm ölçümleri.	41
Şekil 3.12	Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının biyofilm ölçümleri.	42
Şekil 3.13	Bursa Alaçam bölgesinden toplanan <i>B. capillaris</i> aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının biyofilm ölçümleri.	42
Şekil 3.14	Kloroform-metanol (9:1) çözeltisi ile TLC’de yürütülen özütler.	46
Şekil 3.15	N-hekzan-etil asetat (9:1) çözeltisi ile TLC’de yürütülen özütler.	47
Şekil 3.16	Etil asetat-metanol (9:1) çözeltisi ile TLC’de yürütülen özütler.	47
Şekil 3.17	Psoromik asit uygulamasına ait las sistemi inhibisyon grafiği.	48
Şekil 3.18	Psoromik asit uygulamasına ait <i>rhl</i> sistemi inhibisyon grafiği.	49
Şekil 3.19	Atranorin uygulamasına ait las sistemi inhibisyon grafiği.	49
Şekil 3.20	Atranorin uygulamasına ait <i>rhl</i> sistemi inhibisyon grafiği.	50
Şekil 3.21	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda psoromik asit uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.	51
Şekil 3.22	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda atranorin uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.	51
Şekil 3.23	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatında psoromik asit uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.	52
Şekil 3.24	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatında atranorin uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.	52
Şekil 3.25	Uygulanan metabolitlerin kontrol grubuna göre % piyosiyanin üretimleri.	54

Şekil 3.26	Uygulanan metabolitlerin metabolitlerin kontrol grubuna göre % elastaz aktiviteleri.	55
Şekil 3.27	Uygulanan metabolitlerin metabolitlerin kontrol grubuna göre % proteaz aktiviteleri.	56
Şekil 3.28	PAO1 suşuna uygulanan metabolitlerin <i>las</i> QS sistemi ile regüle edilen <i>lasB</i> gen ekspresyonuna etkisi.	57
Şekil 3.29	PAO1 suşuna uygulanan metabolitlerin <i>rhl</i> QS sistemi ile regüle edilen <i>rhlA</i> gen ekspresyonuna etkisi.	58
Şekil 3.30	PAO1 suşuna uygulanan metabolitlerin <i>pqs</i> QS sistemi ile regüle edilen <i>pqsA</i> gen ekspresyonuna etkisi.	58
Şekil 3.31	Psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin PCS-201-012 hücre hattında farklı konsantrasyonlardaki uygulamaları sonucu hücre canlılığı yüzdeleri.	59
Şekil 3.32	Sekansların kalite skorları (Q-score).	59
Şekil 3.33	Sekansların baz hata oranları.	60
Şekil 3.34	Psoromik asit uygulaması sonucu <i>P. aeruginosa</i> QS yolaklarında regülasyonu değişen faktörler.	61
Şekil 3.35	Psoromik asit uygulaması sonucu <i>P. aeruginosa</i> biyofilm yolaklarında regülasyonu değişen faktörler.	62
Şekil 3.36	Tez çalışmasına ait iş akışının görsel özeti.	69

TABLO LİSTESİ	SAYFA
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları.	16
Tablo 2.2. Kullanılan primerler.	22
Tablo 3.1. Toplanan likenlerin isimleri ve lokaliteleri. İST: İstasyon.	29
Tablo 3.2. Toplanan liken türlerinin isimleri ve hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonları.	30
Tablo 3.3. <i>lasb-gfp</i> suşuna uygulanan liken özütlerinin konsantrasyonları ve QS inhibisyon yüzdeleri.	35
Tablo 3.4. <i>rhlA-gfp</i> suşuna uygulanan liken özütlerinin konsantrasyonları ve inhibisyon yüzdeleri.	38
Tablo 3.5. HPLC analizleri sonucunda liken özütlerinde belirlenen sekonder metabolit içerikleri.	43
Tablo 3.6. RNA sekans verilerinin örneklere ait istatistikleri.	61
Tablo 3.7. Gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile aşağı-regülasyona uğrayan genlerin KEGG veritabanına göre ait oldukları metabolik yollar.	63
Tablo 3.8. Gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile yukarı-regülasyona uğrayan genlerin KEGG veritabanına göre ait oldukları metabolik yollar.	65

1. GİRİŞ

P. aeruginosa fırsatçı patojen bir bakteri olup, hava yolu ile kişiye bulaşarak, epitel yüzeyinde kolonize olmaya başladığında, epitel yüzeyini tahrip edici enzimler salgılamaya başlamaktadır. *P. aeruginosa* kolonizasyonunda kronik enfeksiyonun baskılanması için çeşitli antibiyotiklerin kullanıldığı ancak ilaçla tedavinin bazı durumlarda başarısız olduğu literatürde yer almaktadır (Proesmans ve ark., 2013). *P. aeruginosa*'nın patojenitesinin, çevresindeki organizmalar tarafından algılanabilecek küçük ve yayılabilir moleküller ile iletişimine dayalı "salt çoğunluk algılama (Quorum Sensing, QS)" ile düzenlendiği bilinmektedir (Daniels ve ark., 2004). Bu bilgiler ışığında, *P. aeruginosa*'nın QS sinyal mekanizmasını engelleyerek tedaviye yardımcı olabilecek yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç ile savaşabilmek için alternatif stratejiler geliştirmeye odaklanmıştır. Bu alternatif stratejilerden biri de bakterileri öldürmek yerine virülans faktörlerini inhibe edip savunmasız bırakarak etkisiz hale getirmektir. Anti-virülans stratejilerinden QS iletişimini engelleyen veya inhibe eden yaklaşımlar quorum quenching (QQ) olarak adlandırılmaktadır. Doğal veya sentetik QS inhibitörü (QSI) bileşikler keşfedilmiş, incelenmiş ve giderek artan hızla araştırılmaya devam edilmektedir.

1.1. Quorum Sensing (Salt Çoğunluk Algılama)

Geçmişte pek çok bakterinin, aralarında herhangi bir etkileşim olmaksızın, bağımsız olarak doğal ortamda bir arada yaşadıklarına ve çok hücreli organizmalarda görüldüğü gibi çevresel değişikliklere tepki veremeyeceğine inanılmaktaydı. Ancak ileri araştırmalarla, planktonik hücrelerin çevrede özgürce var olamayacakları, çünkü birlikte var olan diğer organizmalarla rekabet etmek ve aşırı koşullarda hayatta kalmak zorunda oldukları tespit edilmiştir (Vu ve ark., 2009). Bu nedenle bakterilerin QS aracılığıyla iletişim kurdukları belirlenmiştir. Daha yüksek seviyelerde bakteri popülasyon yoğunluğunun tür içi ve türler arası etkileşimler için QS sistemini aktive ettiği bilinmektedir. QS sistemlerinde öncelikle otoindüktör (AI) adı verilen küçük kimyasal sinyal molekülleri bakteriler tarafından ortama salgılanır. Bakteri popülasyonu çoğaldıkça ortama salgılanan sinyal molekül yoğunluğu artar ve eşik değerini geçtiğinde hücreler tarafından algılanmakta ve QS bağlantılı genlerin toplu olarak ekspresyonu

sağlanmaktadır. Bakteriler için 3 temel tür AI tanımlanmıştır. Homoserin laktonlar (HSL'ler) olarak da adlandırılan AI-1, Gram negatif bakteriler tarafından kullanılmaktadır. Gram pozitif bakteriler tarafından otoindiktör peptidler (AIP) ve türler arası etkileşim için hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler tarafından otoindiktör-2 (AI-2) sinyal molekülleri sentezlenmektedir (Dunny ve Leonard, 1997; Fuqua ve ark., 2001; Miller ve Bassler, 2001; Rutherford ve Bassler, 2012). QS sistemleri, düzenlemesinden sorumlu beş unsurdan oluşmaktadır. Bunlar AI molekülleri, sinyal sentaz enzimleri, reseptörler, regülatörler ve genlerdir (Nazzaro ve ark., 2013). Çoğu patojenik bakteri, virülans faktörlerini, biyofilm oluşumunu ve antibiyotik direncini QS sistemleri ile yönetmektedir (Li ve Tian, 2012).

İlk tanımlanan AI, Gram negatif *Aliivibrio fischeri* bakterisine ait N-3-(oxohexanoyl)-homoserin laktondur (3OC6HSL) (VAI) (Eberhard ve ark., 1981). VAI biyosentezinin, pozitif bir geri bildirim mekanizmasında *luxI* geni tarafından kodlandığı tespit edilmiştir. Bakteriyel popülasyon yoğunluğundaki artış, çevredeki ortamda daha yüksek konsantrasyonlarda VAI moleküllerinin birikmesine yol açmakta ve bu sinyal molekülleri ile LuxR regülatör proteini arasındaki etkileşim *luxICDABE* operonunun transkripsiyonuyla sonuçlanmaktadır. Daha sonra *luxCDABE* operonuna bağlı olarak lusiferaz sentezlenmekte ve dolayısıyla QS aktivasyonu lüminesans aracılığıyla görünür hale gelmektedir. Öte yandan, düşük hücre yoğunluklarına bağlı olarak daha düşük VAI konsantrasyonları *luxR* ve *luxI* genlerini etkinleştirmek için yetersizdir ve bu durumda lusiferaz kodlanmamaktadır.

Kolonize olmuş bakteriler, belli bir popülasyon yoğunluğuna eriştiklerinde QS sistemlerinin de yardımıyla geri dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurarak bu yapı içinde çoğalmakta ve biyofilm yapısını oluşturmaktadırlar (Proesmans ve ark., 2013). Biyofilm tabakası bakteriye besin biriktirme, dezenfektanlardan, antibiyotikten, UV ışınları, pH ve sıcaklık dalgalanmaları gibi tehditlerden korunma avantajı sağlamaktadır (Hall-Stoodley ve ark., 2004). Amerika'da bulunan Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC), hastane enfeksiyonlarının %65'inin biyofilm kaynaklı olduğunu belirtmektedir. Geliştirdikleri biyofilm modeli içerisinde yaşayan türlerin, aynı türe ait planktonik türlere göre 1000 kata kadar daha fazla antibiyotik direncini arttırabildiği bildirilmektedir (Lebeaux ve ark., 2013).

1.1.1. Quorum sensing inhibisyonu

Anti-virölans yaklaşımlar içinde önemli bir yere sahip olan QQ stratejisi, bakterileri öldürmek ya da çoğalmalarını engellemek yerine QS sistemlerini hedef alarak iletişimlerini kesmeyi amaçlamaktadır. QS inhibisyonu temel olarak 3 ana başlık altında toplanmaktadır.

Bunlardan birincisi QS sinyal sentezinin engellenmesidir. Gram negatif bakterilerde, enoil-açıl-taşıyıcı protein (ACP), redüktaz (ENR) ve S-adenosil metiyonin (SAM), Açıl-homoserinlakton (AHL) sentezinin engellenmesi için hedeflenebilir yapılarıdır (Dong ve ark., 2007). AI-2 QS inhibisyonu için, S-ribosil-L-homosistein (SHR)'nin LuxS enzimi tarafından bölünmesinden oluşan 4,5-dihidroksi 2,3 pentandion (DPD) sentezinin engellenmesi bu açıdan hedeflenebilmektedir (Galloway ve ark., 2011).

İkinci olarak sinyal moleküllerinin parçalanması ya da inaktif hale getirilmesi amaçlanabilmektedir. Bu yaklaşımda genellikle kimyasal olarak pH değişimi, antikorlar veya sinyalleri parçalayacak AHL-laktonazlar, açılazlar, oksidoredüktazlar, paraksonazlar ve 2,4-dioksijenaz (Hod) gibi enzimler kullanılmaktadır.

Üçüncü olarak ise sinyal moleküllerinin algılanmasını engelleyerek QS inhibisyonu hedeflenmektedir. Bu inhibisyon antagonist ajanların yarışmalı olarak reseptör proteinlerin aktif bölgelerine bağlanmasını temel almaktadır.

Bu yaklaşımlar için doğal ve sentetik pek çok metabolit günümüzde araştırılmaktadır. Doğada uzun zamandır var olduğu düşünülen ve pek çoğu sekonder metabolitlerden oluşan QS inhibitörleri bu konuda önemli yere sahiptir (Borges ve Simões, 2019). Doğal QS inhibitörleri, bakteriler, algler, hayvanlar, bitkiler veya mantarlar gibi çeşitli organizmalar tarafından üretilenmektedir. Bu inhibitörler, biyokimyasal yapılarında yüksek çeşitlilik sergilemektedirler. Fakat, bu QSI maddelerinin çoğunun moleküler yapıları veya kimyasal grupları ve de QS yollarındaki inhibisyon mekanizmaları hakkında aşırı bilgi eksikliği vardır (LaSarre ve Federle, 2013).

1.2. QSI Metabolitlerin Belirlenmesi

QS inhibisyonunun belirlenebilmesi için öncelikle incelenecek bakteri türüne ait QS sistemleri hakkında bilgi sahibi olmak gereklidir. Günümüzde az sayıda bakteri türünün QS sistemleri ile ilgili yeterli bilgi bulunsa da bu sayı gün geçtikçe artmaktadır.

Gram negatif bakterilerde çoğunlukla açıl zincirdeki karbon sayısı değişiklik gösteren AHL sinyal molekülleri kullanıldığı için QS inhibisyonu genellikle LuxI/R ve homologu proteinlere sahip olan bakteri türleri ile çalışılmaktadır. İnhibisyonun belirlenmesi genellikle biyokimyasal analiz yöntemleri ile gösterilebilmektedir. Örnek olarak, *Chromobacterium violaceum* türünde C6HSL sinyali ile QS bağlantılı üretilen viyolasein pigmenti miktarına bağlı olarak QS inhibisyon analizleri gerçekleştirilmektedir (McClellan ve ark., 1997). *P. aeruginosa* için QS ile regüle edildiği bilinen piyosyanin üretimi, elastaz ve proteaz aktivitelerinin kolorimetrik ölçümleri örnek olarak gösterilebilir.

Öte yandan, plazmid aktarımı ile monitör bakteri suşlarının oluşturulması, QS aktivitelerinin gerçek zamanlı olarak izlenebilmesine olanak tanımıştır. Lusiferaz veya yeşil floresan protein (GFP) gibi proteinleri kodlayan genlerin ilgili QS promotörü ile bakterilere aktarılması sayesinde, uygulanan QSI maddelerin hızlıca taranarak etkilerinin kantitatif olarak analiz edilmesine imkân tanımıştır.

Bunlar dışında, moleküler yöntemlerle QS inhibisyonunun kantitatif olarak analizi daha masraflı olsa da güvenilir veriler elde edilmektedir. RT-kPZR, blotlama yöntemleri ve yeni nesil sekanslama teknolojileri ile omik veriler daha kapsamlı ve detaylı bir bakış açısı sunmaktadır.

1.3. Liken Sekonder Metabolitleri

Literatürde bakterilerin antibiyotik direncine karşı savaşmada QS inhibitörü olabilecek doğal veya sentetik yeni kimyasal bileşiklerin belirlenmesine duyulan ihtiyaç vurgulanmaktadır (Kalia ve Purohit, 2011; LaSarre ve Federle, 2013). Likenler, Dünya’da ve ülkemizde antik çağlardan beri halk arasında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Yapılarında bulunan asit özellikteki 1050 kadar özgün sekonder metabolitin çeşitli iyileştirici etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Stocker-Wörgötter, 2008). Bu metabolitlerin antibakteriyel, antiviral, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, antitümöral, antialerjik, bitki büyüme inhibitörü, antiherbivor, enzim inhibitörü v.b. geniş kapsamlı etkileri olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Cankili, 2017; Fernandez-Moriano ve ark., 2016; Furmanek ve ark., 2019; Mitrović ve ark., 2011; Nayaka ve Haridas, 2020; Odimegwu ve ark., 2019; Tanas ve ark., 2010). Diğer taraftan, cinslere ve hatta türlere göre likenin yaşadığı iklime, çevre sıcaklığına, ortamın pH’sine, üzerinde yaşadığı substrata göre sekonder bileşiklerin etkinliği ve miktarı

değişebilmektedir (Zraik ve ark., 2018).

Cladonia, *Evernia*, *Cetraria*, *Usnea*, *Alectoria*, *Ramalina* cinslerinin türlerinde bulunan usnik asit, vulpinik asit, evernik asit ve bazı liken yağ asitlerinin karışımlarından bazı antibiyotik etkili bileşikler üretilmektedir. Örneğin usnik asit ile evernik asitin karışımından elde edilen “evosin”in *Mycobacterium tuberculosis* (verem basili) ve *Corynebacterium diphteriae* (difteri basili)’ya karşı kuvvetli bir antibiyotik etkisi olduğu bildirilmiştir. Yine, usnik asidin sodyum tuzlarının da *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Mycobacterium*’a karşı ve *R. reticulata*’nın *Pneumococcus*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* cinslerine karşı kuvvetli bir antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilmiştir (Nayaka ve Haridas, 2020; Özyiğitoğlu ve ark., 2017)

Alectoria, *Cladonia*, *Evernia*, *Hypogymnia*, *Pseudevernia*, *Ramalina* ve *Usnea* gibi cinslere ait liken türlerinin içerdiği antibakteriyel etkiye sahip sekonder metabolitler literatürde yer almaktadır: *Cladonia* cinsine ait türlerin, (+) ve (-) usnik asit, atranorin, didimik asit, fumar protosetrarik asit, taraksen, ursolik asit, thamnolik asit, perlatolik asit, fenolik maddeler, (+) ve (-) isousnik asit gibi sekonder metabolitleri içerdiği; *Alectoria sarmentosa* türünün dibenzofuran grubundan alektosarmentin, alektonik asit, depsidon grubundan usnik asit gibi sekonder metabolitleri içerdiği; *Evernia* cinsinin divarikatik asit, evernik asit, paradeptit, usnik asit, atranorin, stearik asit, palmitik asit, likhesterol ve ergosterol gibi sekonder metabolitlerini içerdiği; *Hypogymnia physodes* türünün stearik asit, palmitik asit, likhesterol ve ergosterol gibi sekonder metabolitler ve özellikle 3-Hidroksifisodik asit içerdiği; *Pseudevernia furfuracea* türünün fisodik asit, kloroatranorin, atranorin, olivetorik asit, D-usnik asit, evernik asit gibi liken asitleri içerdiği; *Ramalina* cinsinin (+) ve (-) usnik asit, protosetrarik asit, sekikaik asit, norstiktik asit, obtusatik asit, galbinik asit ve diffraktaik asit içeriği; *Usnea* türlerinin ise başta usnik asit olmak üzere diffraktaik asit, protosetrarik asit, salazinik asit, norstiktik asit ve evernik asit içerdiği ve bu liken asitlerinin antimikrobiyal öneme sahip olduğu belirlenmiştir (Goga ve ark., 2020; Kanivebaguli ve Mesta, 2020; Nayaka ve Haridas, 2020; Ranković ve Kosanić, 2019; Shukla ve ark., 2010)

Usnea türlerinden elde edilen usnik asit maddesinin liken metabolitleri içindeki en etkili antimikrobiyal madde olduğu ve bu maddenin özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu açıklanmıştır (Ingolfsdottir, 2002). Ayrıca *U. barbata*’nın usnik

asit, barbatik asit gibi metabolitlerinin antimikrobiyal, antifouling, ve antipatojenik özellik gösterip, dental plaklar üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Chifiriuc ve ark., 2009). Tay ve ark. (2004), *R. farinacea* türünden izole edilen (+)-usnik asidin ve norstiktik asidin bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Yılmaz ve ark. (2005), *H. tubulosa* türünden izole edilen 3-hidroksifisodik asidin *E. coli* de dahil birçok Gram negatif bakteri ve *S. aureus* başta olmak üzere birçok Gram pozitif bakteri üzerinde antimikrobiyal olarak etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ranković ve ark. (2009), *Cladonia furcata* ve *H. physodes* türlerinin Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal olarak etkili olduğunu görmüşlerdir. *C. foliacea* metanol özütü ile *C. rangiformis* ve *P. furfuracea* aseton ve kloroform özütlerinin bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğunu literatürde yer almaktadır (Mitrović ve ark., 2011). Açıkgöz ve ark. (2013), *C. convoluta* metanol özütünün *E. coli* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Zengin bir bitki örtüsüne sahip olan ülkemizin doğal kaynaklarının ilaç geliştirilmesinde kullanılmasının hem insan sağlığı hem de ekonomik açıdan sağlayacağı katkı şüphesizdir. Yeni ilaç moleküllerinin keşfedilmesinde likenlerin türe özgün olarak ürettiği ve çeşitli biyoaktivitelere sahip sekonder metabolitlerin etkin ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceği öngörülmektedir.

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

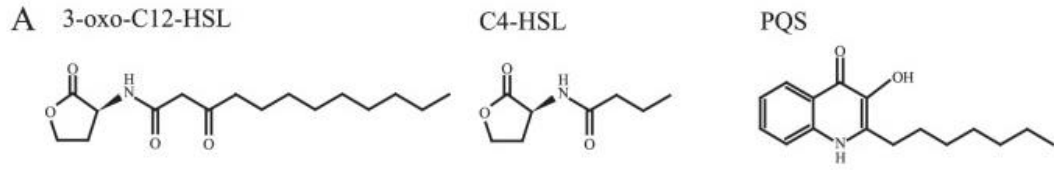
P. aeruginosa, genellikle toprak ve suda bulunan ve özellikle bağışıklık sistemleri yetersiz kişilerde kronik enfeksiyonlara sebep olan nozokomiyal fırsatçı bir patojendir (Koch ve Høiby, 1993; Proesmans ve ark., 2013) Solunum, idrar ve deri enfeksiyonlarına yol açan heterotrof, motil Gram negatif bir bakteridir. Tüm hastane enfeksiyonlarının %10-25'inin *P. aeruginosa* kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Gül ve ark., 2004). *P. aeruginosa*, 1-5 µm uzunluğunda ve 0,5-1 µm kalınlığında, basil morfolojisinde bir bakteridir. Fakültatif aerob olmasına rağmen anaerobik bir ortamda arjinin ile hayatta kalabilmektedir. Optimal olarak 37°C'de sporsuz olarak üremekte fakat 4-42°C aralığında yaşayabilmektedir. Yapılan çalışmalara göre, pan-genomları 54272 genden oluşmaktadır. Bu genlerin sadece 665 adetinin ortak olarak tüm suşlarda bulunduğu (core-genome) belirtilmektedir (Freschi ve ark., 2019). İzole edilen klinik

izolatların pek çoğunda birden fazla profaj bulunduğu bilinmektedir (Diggle ve Whiteley, 2020).

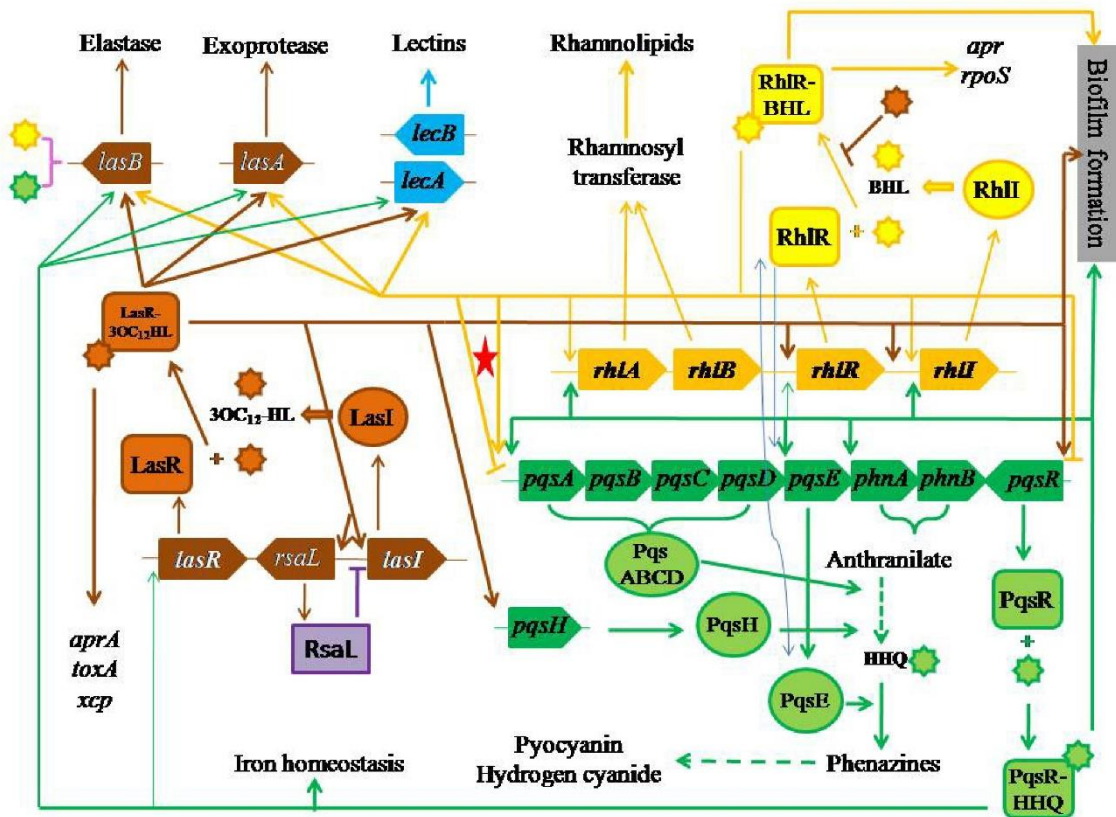
1.4.1. *P. aeruginosa* quorum sensing sistemleri

P. aeruginosa QS sistemleri N-açıl-homoserinlakton ve alkil-kinolon sinyal moleküllerini kullanarak bakterinin kolektif olarak biyofilm ve virülans faktörlerini regüle etmektedir. Hiyerarşik bir düzen içerisinde çalışan *las*, *rhl* ve *pqs* olarak 3 adet temel QS sistemine sahiptir (Daniels ve ark., 2004). QS sistemleri ile genlerinin %10 kadarını regüle ettiği tahmin edilmektedir (Bjarnsholt ve Givskov, 2007; Rumbaugh ve ark., 2000; Smith ve Iglewski, 2003).

AHL temelli QS sistemleri *luxIR* sistemine homolog iki önemli sistem ile düzenlenmektedir: *las* ve *rhl* (Maurer ve ark., 2015). Bu iki sistem, isimlerini regüle ettikleri gen ailelerinden almışlardır. *las* sistemi N-3-oxododekanoyl-homoserinlakton (3-oxo-C12-HSL, OddHL) sinyalini sentezleyen LasI ve transkripsiyonel regülatör LasR proteinlerinden ve *rhl* sistemi N-butanoyl-homoserinlakton (C4-HSL, BHL) sinyalini sentezleyen RhII ve transkripsiyonel regülatör RhIR proteinlerinden oluşmaktadır. Ayrıca bunlar dışında 2-heptil-4-hidroksikinolon (HHQ) ve 2-heptil-3-hidroksi-4 (PQS) olarak 2-alkil-4-kinolonları (AQ) sinyal olarak kullanan *pqs* sistemi bulunmaktadır. Bu sistem regülatör olarak PqsR proteinini kullanmakta ve sinyal sentezini *pqsABCDE-phnAB* operonu ve *pqsH* ile gerçekleştirmektedir (Lee ve Zhang, 2015). Bu üç sistem arasında, *las* sistemi diğer sistemleri hiyerarşik olarak yönetmekte; *pqs* sistemi ise bazı virülans faktörlerini düzenlerken *las* ve *rhl* sistemleri arasında aracılık ediyor gibi görünmektedir (Lee ve Zhang, 2015). QscR ve CdpR gibi diğer regülatörlerin ise sinyal üretimini inhibe ederek QS sistemlerini dengede tuttuğu düşünülmektedir. QS sistemleri elastaz, ekzotoksin A, ramnolipidler, piyosianin, lipaz, pyoverdin, lektinler, hidrojen siyanür ve benzeri birçok virülans faktörünün üretimini düzenlemektedir.



Şekil 1.1. *P. aeruginosa* QS sinyal molekülleri.



Şekil 1.2. *P. aeruginosa* QS sistemlerinin regülasyon yollarının şematik olarak gösterimi (Yan ve Wu, 2019).

1.4.2. *P. aeruginosa*'da biyofilm

P. aeruginosa biyofilm formunun bağışıklık yetersizliği olan kişilerde kronik enfeksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir (Høiby ve ark., 2017). Biyofilm oluşumunun ilk adımı, bakterilerin bir yüzeye bağlanmasıdır. Flagellar motilite (tip IV pili) ve adezinler bu aşamada önemli faktörlerdir. Geri döndürülemez yapışmanın ardından mikro koloniler oluşur ve daha sonra QS iletişimi artarak biyofilmin olgunlaşması

başlar. Olgun biyofilmin 3 boyutlu yapısı, çevresel koşulların yanı sıra bakteriler tarafından üretilen faktörlerin miktarına göre değişir. Bu faktörler, aljinat, yapısal DNA, demir şelatör pyoverdin gibi ekzopolisakkaritler (EPS) ve çoğu doğrudan QS metabolizması tarafından kontrol edilen ramnolipid gibi yüzey aktif maddelerdir. Doğru miktarda ramnolipid sekresyonu, olgun bir biyofilm ve bir sonraki adım olan dağılma için çok önemlidir. (Lee ve Yoon, 2017).

1.4.3. *P. aeruginosa* QS inhibisyonu

P. aeruginosa QS sistemleri aracılığı ile elastaz, proteaz, piyosiyenin, lektin, ramnolipitler, kitinaz, lipaz, hidrojen siyanür gibi virülans faktörlerinin kodlandığı genleri regüle ettiği; ayrıca stres yanıtı oluşturma, motilite ve biyofilm oluşumu gibi önemli metabolik yollar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Huang ve ark., 2019). QS sistemlerinin inhibisyonu ile bu yolların sekteye uğratılması amaçlanmaktadır. *P. aeruginosa* QS sistemlerinin inhibisyonu için araştırılmış pek çok enzim, doğal ve sentetik madde literatürde yer almakta olsa da çok az kısmının inhibisyon yolları detaylı olarak incelenmiştir (Gökalsın ve ark. 2019).

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen tez çalışmasının amacı, ülkemiz liken türlerine ait özütlerin *P. aeruginosa* QS sistemleri üzerindeki inhibisyon etkilerini belirlemek, QQ etkisine sahip türlerin sekonder metabolit içeriklerini analiz etmek, baskın olarak bulunan sekonder metabolitlerin seçilerek QS bağlantılı virülans faktörleri üzerindeki etkilerini incelemek ve seçilen sekonder metabolitin *P. aeruginosa* transkriptomunda meydana getirdiği değişiklikleri araştırmaktır.

Çalışmalar sonucunda elde edilecek tüm veriler ışığında araştırmanın hedefleri aşağıda özetlenmiştir:

- *P. aeruginosa* bakterisinin öldürülmesi yerine aralarındaki sinyal mekanizmalarının engellenmesi yoluyla tedavide farklı bir bakış açısının olabilirliğinin araştırılması,
- Ülkemiz biyolojik kaynaklarından olan ve geçmişten günümüze kadar sağlık alanında kullanılan çeşitli liken türlerinin sağlık alanında yeni amaçlarla ve daha fazla kullanılabilmesine imkan sunulması,
- Liken sekonder metabolitlerinin *P. aeruginosa* üzerindeki QS inhibisyon

etkilerinin moleküler yönden ortaya çıkarılması,

- İlaç keşfinde gelecekte önemli kaynak olabileceği düşünülen likenlere ait seçilen sekonder metabolitin tüm *P. aeruginosa* gen ekspresyonlarına olan etkileri belirlenerek kullanım potansiyelinin araştırmılması,
- Uygulanacak moleküler yöntemlerin diğer sekonder metabolitlere de uygulanabilmesi için gerekli bilgi birikiminin oluşturulması,
- Araştırma sonucunda elde edilecek olan veriler ile ulusal ve uluslararası bilim dünyasına katkı sağlanması,
- Bundan sonra benzer konularda yapılacak olan çalışmalara yol gösterici olması,
- Sekonder metabolitlerin sanayide yaygın olarak kullanılabilmesi hedefi ile dışa bağımlılığın azaltılması, ülkemizin hem bilimsel hem de endüstriyel anlamda yurtdışı ile rekabet gücünün artırılması.

BÖLÜM 2

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri suşları

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

2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

1. Lysogeny Broth (LB) Besiyeri (Sigma-Almanya)
2. M9 Minimal Besiyeri (Amresco-ABD)
3. LB agar (BD-Almanya)
4. Etil Alkol (Merck-ABD)
5. Nitril Eldiven (Pudrasız) (Isolab-Almanya)
6. Santrifüj tüpleri 15 ml, 50 ml (Isolab-Almanya)
7. Cam Deney Tüpleri
8. Portüp
9. Şeffaf mikroplaka (TPP-İsviçre)
10. Polistiren 96 Kuyucuklu Siyah Optik Mikroplaka (Greiner-ABD)
11. Plastik Petri Kapları (Fıratmed-Türkiye)
12. Bek Alevi
13. Platin Öze
14. Eküvyon çubuk
15. Cam baget
16. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-ABD)
17. Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 µl) (Hellma-Almanya)
18. Ultra Saf Su (ddH₂O)
19. 0.45 µm'lik Filtre (Whatman-İngiltere)
20. Dimetil sülfoksit (Sigma-Almanya)

21. Gliserol (Merck-ABD)
22. High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche-İsviçre)
23. Gerçek zamanlı SybrGreen PZR kiti (Roche-İsviçre)
24. cDNA sentez kiti (Roche-İsviçre)
25. RNAlater (Invitrogen-ABD)
26. HCl (Merck-ABD)
27. Kristal viyole
28. Gentamisin (Duchefa-Hollanda)
29. Silika
30. Atranorin
31. Psoromik Asit (Extrasynthase-Fransa)
32. Tiyamin (Duchefa-Hollanda)
33. Kazamino asitler (BD-ABD)
34. Glukoz (Merck-ABD)
35. WST-1 (Roche-İsviçre)

2.1.3. Kullanılan cihazlar

1. **Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek-ABD):** Biyosensör ve wild type bakterilerin floresans ve absorbans ölçümleri, biyofilm deneylerinde kristal viyole boyaması ölçümü, RNA kantifikasyonu ve saflık ölçümü için kullanılmıştır.
2. **Multiplaka Dağıtıcı ve Yıkayıcı (Biotek-ABD):** Biyofilm deneylerinde mikropalakaların yıkanmasında ve etanol dağıtımında kullanılmıştır.
3. **Soğutmalı Santrifüj (Beckman-Coulter-ABD):** Biyokimyasal deneyler, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), mRNA (mesajcı ribonükleik asit) ve cDNA (komplementer deoksiribonükleik asit) izolasyonunda kullanılmıştır.
4. **pH Metre (Thermo-ABD):** HCl (Hidroklorik asit) ve NaOH (Sodyum hidroksit) kullanılarak besiyerlerinin ve kimyasalların pH ayarlamasında kullanılmıştır.
5. **Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur):** Suşların -86°C’de uzun süreli saklanması için kullanılmıştır.
6. **Derin Dondurucu (Vestel-Türkiye):** Özütler, primer, prob, mRNA, cDNA ve kitlerin -20 °C’de saklanması için kullanılmıştır.

7. **Manyetik Karıştırıcı (WiseStir-Almanya):** Besiyerleri otoklava atılmadan önce karışımın homojenize edilmesi için kullanılmıştır.
8. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD):** Sıvı bakteri kültürlerinin optik yoğunluklarının ölçümünde kullanılmıştır.
9. **Dijital Hassas Terazı (Ohaus-ABD):** Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
10. **İnkübatör (Mettler-Almanya):** Besiyerlerine ekilen suşların ve biyofilm plakalarının inkübasyonu için kullanılmıştır.
11. **Vorteks (Heidolph-Almanya):** Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.
12. **Buzdolabı (Siemens-Almanya):** Kimyasal ve hazırlanan katı-sıvı besiyerlerinin +4°C’de saklanması için kullanılmıştır.
13. **Otoklav (Nüve-Türkiye):** Besiyeri hazırlama ve tüm sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.
14. **Mikropipetler (1000µl, 100µl, 10µl) (Thermo/ Finnpiette-ABD):** Besiyerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.
15. **Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD):** Besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
16. **Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya):** *In vitro* süreçte yapılan bütün deneylerin gerçekleştirilmesi, kimyasalların hazırlanması, mRNA ve cDNA’ların kontamine olmasını engellemek için kullanılmıştır.
17. **Gerçek Zamanlı PZR (Roche LightCycler 96-İsviçre):** QS inhibisyonunun wild type suşta gen ekspresyonu ölçümü ile incelenmesi için kullanılmıştır.
18. **Termal döngü cihazı (Biorad-ABD):** mRNA’lardan cDNA eldesinde kullanılmıştır.
19. **Ultra Distile Saf Su Cihazı (Millipore-ABD):** Besiyeri ve PZR deneyleri için kullanılmıştır.
20. **HPLC (Shimadzu-Japonya):** Liken özütlerinde bulunan metabolitlerin belirlenmesi için kullanılmıştır.
21. **LC/MS (Thermo-ABD):** Liken özütlerinde bulunan metabolitlerin belirlenmesi için kullanılmıştır.

2.1.4. Besiyerlerinin Hazırlanması

2.1.4.1. Sıvı besiyeri - Lysogeny Broth (LB Broth)

- 10 g tripton
- 5 g maya özütü
- 5 g NaCl

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

2.1.4.2. Sıvı minimal besiyeri - M9 Minimal Medium

- 10,5 g M9 Tuzları
- 5 g Glukoz
- 5 g Kazamino Asitler
- 2 mM MgSO₄
- 0,1 mM CaCl₂
- 2.5 mg tiyamin

LB besiyerinin oto-floresansı nedeniyle ölçümleri etkilememesi için deneylerde M9 minimal besiyeri kullanılmıştır. Toz halindeki M9 broth, bir miktar distile su ile çözüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri oda sıcaklığına ulaştıktan sonra glukoz, kazamino asitler, tiyamin, MgSO₄ ve CaCl₂ eklenmiş, daha sonra son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Biyosensör suşları için 50µg/ml son konsantrasyon olacak şekilde gentamisin antibiyotiği eklenmiştir.

2.1.4.3. Katı besiyeri - Lysogeny Agar (LB Agar)

- 10 g tripton
- 5 g maya özütü
- 5 g NaCl
- 12 g Bacto agar

LB agar toz olarak 40 g bir miktar distile suda çözündürülmüştür. Ardından hacmi 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra soğutularak steril koşullarda 90mm çapındaki petri kaplarına 15'er ml dağıtılmıştır. Katı besiyerleri kullanıma kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Liken cins ve türlerinin toplanması ve teşhisi

Liken örnekleri 216S885 no'lu TÜBİTAK-JSPS İkili İşbirliği kapsamındaki “Türk Liken Biyokaynakları Kullanılarak Bakteriyel Quorum Sensing İnhibitörü Yeni Antimikrobiyal Bileşenlerin Geliştirilmesi ve Sanayiye Aktarılması” isimli proje kapsamında T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı iznine tabi olarak ilgili bölgelerde gerçekleştirilen arazi çalışmaları ile toplanmıştır.

Toplanan örnekler zarf ve kese kağıtları içine alınmıştır. Toplama zarflarının üzerine; istasyon numarası, toplanma tarihi, koordinatları ve substrat adı (ağaç türü) yazılmıştır. Örnekler, toprak, yosun vb. diğer bitki artıkları gibi yabancı maddelerden temizlendikten sonra, Marmara Üniversitesi Herbaryum (MUFE)’unda iyice havalandırılarak kurutulmuş ve örneklerin tür tayinleri araştırmacı Prof. Dr. Gülşah ÖZYİĞİTOĞLU danışmanlığında Dr. Birkan AÇIKGÖZ tarafından yapılmıştır. Tayinleri yapılan örnekler, üzerinde istasyon numarası, tür adı yazılan yeni zarflara konularak özütleri çıkarılmak üzere oda sıcaklığında gün ışığı almayacak şekilde saklanmıştır.

2.2.2. Liken örneklerinden özüt eldesi

El ve havan yardımıyla ufak parçalar haline getirilmiş liken örnekleri tartılarak ayrı ayrı steril tüplere alınmıştır. Tartımı yapılan türlerin ekstraksiyonları için çeşitli çözücüler denenmiş ve en geniş sekonder metabolit içeriği eldesi için aseton çözücüsü kullanılarak, steril kaplarda oda ısısında 1 gece bekletilerek (maserasyon) ekstraksiyon suretiyle 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Bir gece bekletilerek likenlerden elde edilen çözeltiler süzülerek ve santrifüjlenerek katı artıklardan kurtarıldıktan sonra çözücülerini rotary-evaporda düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. (Alzoreky ve Nakahara, 2003). Özütler önce DMSO ile çözülmüş ve seyreltik sıvı alikotlara alınmıştır. Daha sonra 0.45 mikrometrelik filtrelerden geçirilerek steril edilmiş ve -20°C’de saklanmıştır.

2.2.3. Bakteri suşlarının temini, saklanması ve çoğaltılması

Floresan biyomonitör suşlar, QS ile regüle edilen *lasB* (elastaz) ve *rhlA*

(ramnosiltransferaz 1 alt birim A) genleri ile GFP füzyonu ve marker olarak Gentamisin direnç geni bulundurmaktadır. Suşların QS mekanizmaları aktif hale geldiğinde taşıdıkları plazmidlerdeki spesifik promotörlere göre genlerinin ekspresyonu gerçekleşmekte ve buna bağlı olarak GFP sentezlenmektedirler. Dolayısıyla ölçülen floresan miktarı, bakteri yoğunluğu ve QS mekanizmasının çalışmasıyla orantılıdır.

Kullanılan tüm bakteriler Kopenhag Üniversitesi Dr. Tim Holm Jakobsen ve Prof. Dr. Michael Givskov'dan temin edilmiştir (**Tablo 2.1**). Bakteri stok kültürleri, -86°C'de %15 gliserol içeren LB broth besiyeri içerisinde muhafaza edilmiştir. Stok kültürden deney sırasında kullanmak üzere antibiyotik içeren LB broth besiyerine ardı ardına 2 kez pasaj alınmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı antibiyotikli katı besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları.

<i>P. aeruginosa</i>	Suş	Açıklama
	PAO1	Yabanıl tip (Wild type)
	-	Klinik izolat
	<i>lasB-gfp</i>	Gm ^{r-30γ} ; PAO1-ATCC, P _{lasB-gfp} (ASV)-P _{lac-lasR} -mini-Tn5 türevi: pMHLAS (Hentzer ve ark., 2002)
	<i>rhlA-gfp</i>	Gm ^{r-30γ} ; PAO1-ATCC, P _{rhlA-gfp} (ASV)-P _{lac-lasR} -mini-Tn5 türevi: pMHLAS (Yang ve ark., 2009)

2.2.3.1. Biyomonitör suşların yoğunluklarının belirlenmesi

50 µg/ml gentamisin içeren M9 besiyerinde 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılan bakterilerin konsantrasyonları UV-Vis spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD) yardımıyla belirlenmiştir. 600 nm dalga boyunda optik yoğunlukları (OD) ölçülmüş, gerekli seyreltmeler yapılarak 1 McFarland standardı (yaklaşık 3x10⁸ cfu/ml) elde edilmiştir.

2.2.3.2. *P. aeruginosa* suşlarının çoğaltılması ve zamana bağlı büyüme eğri analizlerinin yapılması

P. aeruginosa PAO1, *lasB-gfp* ve *rhlA-gfp* suşlarının bir gecelik kültürlerinin 0.5 McFarland standardında mikropalakalara inokülasyonları yapılmıştır. Mikroplaka 180 rpm'de 20 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve her 15 dakikada bir örneklerin absorbans ölçümleri (OD: 600nm, 450nm) multimode mikropalaka okuyucuda (Biotek – ABD) gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Floresan biyosensör yöntemiyle QSI taraması

2.2.4.1. Liken özütlerinin biyomonitör suşlara uygulanması

QSI taramaları Bjarnsholt ve ark. (2010) tarafından yayımlanan metodun modifiye edilmiş hali kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu, floresan ölçümler için özel üretilmiş altı şeffaf optik siyah mikropalakaların kuyucuklarına 100'er µl olacak şekilde M9 minimal besiyeri dağıtılmıştır. Mikropalakalarda dikey sıralardaki ilk kuyucuklara 100'er µl seyreltilmiş özüt eklendikten sonra pipetaj yapılmış ve 100 µl çekilerek bir sonraki yatay kuyucuğa aktarılmıştır. Tekrar pipetaj yapılarak bir sonraki kuyucuğa 100 µl aktarılmıştır. Bu işlem tekrarlanarak ½ oranında bir seri dilüsyon elde edilmiştir. Kontrol olarak uygulama yapılmamış kuyucuklar bırakılmıştır. 1 McFarland standardına ayarlanmış biyomonitör suşlar, kör hariç tüm kuyucuklara 100 µl hacimde eklenmiştir. Son hacme göre (200 µl) tüm kuyucuklar, 0,5 McFarland standardında bakteri ve ilk kuyucuklar 120 µg/ml özüt konsantrasyonlarına sahip olmuştur.

2.2.4.2. GFP ekspresyon ölçümleri

Özüt dağıtımı tamamlanan mikropalakalar multimod mikropalaka okuyucuya (Cytation 3 Biotek-ABD) yerleştirilmiştir. 20-24 saat boyunca 37°C'de 180 rpm çalkalamada 15 dakikada bir floresans ve OD 450, 600 nm ölçümleri alınmıştır. GFP floresans ölçümlerinde eksitasyon dalga boyu 485 nm ve emisyon dalga boyu 535 nm olarak ayarlanmıştır. Monitör suşlar için elde edilen sonuçlar grafiklere aktarılmıştır.

2.2.5. Liken özütlerinin *P. aeruginosa* üzerinde biyofilm inhibisyonu özelliklerinin belirlenmesi

P. aeruginosa PAO1 suşunun LB besiyerindeki bir gecelik kültürleri absorbans 600 nm: 0.01 olacak şekilde seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu şeffaf mikropalakaların her kuyucuğuna LB besiyerleri dağıtılmış ve biyomonitör suşlara yapılan uygulama aynı şekilde tekrarlanmıştır. Mikropalakalar çalkalama olmadan 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Mikropalakalar 3 defa FTS ile yıkanarak planktonik hücrelerden arındırılmıştır. Mikropalakalarda yer alan kuyucukların üzerinde bulunan biyofilm tabakası %0,1’lik kristal viyole çözeltisi ile boyanmıştır. Mikropalakaların multimode mikropalaka okuyucuda 590 nm’de absorbans ölçümleri alınmıştır (O’Toole, 2011).

2.2.6. Etkileri belirlenen liken özütlerinin içerdiği metabolitlerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi ve izolasyonu

Elde edilen liken özütleri aseton ile 2mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Kimyasal analizler daha sonra, YMC-Pack ODS-A kolona sahip SHIMADZU 10A-DP (CH₃CN: H₂O = 12: 88; 1 ml / dakika; 254 nm; SHIMADZU, Kyoto, Japonya) kullanılarak HPLC-PDA sistemi ve Accela 600 HPLC sistemine bağlı TSQ Quantum Ultra kütle spektrometresi (LC-ESI-MS) ile gerçekleştirilmiştir (Hikari ve ark., 2011).

Analiz sonrası izole edilecek metabolitler için özütlerin fraksiyonlanacağı uygun çözücüyü belirlemek üzere seçilen özütler ince tabaka kromatografisi (TLC) ile silika kaplı alüminyum tabakalarda yürütülmüştür. TLC işlemi için 3 adet çözücü karışımı denenmiştir (9:1 oranında: kloroform-metanol, n-hekzan-etil asetat, etil asetat-metanol). Tabakalar UV altında incelenerek ayrıışan metabolitler kurşun kalem ile işaretlenmiştir. Daha sonra özütler belirlenen karışım ile silika kolon kullanılarak fraksiyonlandırılmış ve metabolitler saflaştırılarak uçucuları uzaklaştırılmıştır. Özütler sonraki deneylerde kullanılmak üzere toz halde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.7. Metabolitlerin *P. aeruginosa* sensör suşları üzerinde QSI özelliklerinin belirlenmesi

Saf metabolitler çözünürlüklerine uygun molaritelerde saf DMSO ile çözülmüştür. Daha sonra liken özütlerinin uygulanmasındaki yöntem tekrarlanarak

seyreltilerek siyah mikropalakalara seri dilüsyon halinde dağıtılmış ve biyomonitör suşlar eklenmiştir. GFP ekspresyonu ölçümleri mikropalaka okuyucuda gerçekleştirilmiştir.

2.2.8. Metabolitlerin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde anti-biyofilm özelliklerinin belirlenmesi

Saf metabolitler biyomonitör suşlara uygulanan aynı konsantrasyonlarda PAO1 suşuna şeffaf mikropalakalarda uygulanmıştır. Liken özütlerinin biyofilm inhibisyonu taranmasındaki aynı yöntem tekrarlanmıştır. Saf metabolitler ayrıca antibiyotiğe dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatına uygulanmıştır.

2.2.9. Virülans analizleri

Bir gecelik *P. aeruginosa* PAO1 suşları, 7 ml LB besiyeri içeren steril tüplere absorbansları 600 nm: 0.02 olacak şekilde seyreltilmiştir. Saf metabolitler önceki deneylerde elde edilen sonuçlara göre uygun konsantrasyonlarda 3'er tekrarlı olarak tüplere eklenmiştir. Negatif kontrol olarak uygulama yapılmamış örnekler ve pozitif kontrol olarak C-30 furanon metaboliti uygulanan örnekler seçilmiştir.

QSI metabolit uygulaması yapılan ve 20 saat boyunca 37°C'de inkübe edilen 5 ml PAO1 bakteri kültürleri 6000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatantları ayrı tüplere alınmıştır. Daha sonra süpernatantlar 0,45 µm şırınga filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir.

2.2.9.1. Piyosiyanin üretimi

Filtratlara 3 ml kloroform eklenerek 1'er dakika vorteks ile çalkalanmış ve tekrar santrifüjlenerek ve mavi renkli kloroform fazı ayrılmıştır. Kloroform fazlarına 1'er ml 0,2 M HCl ilave edilerek çalkalanmış ve 4000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan HCl fazı için 530 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır (Essar ver ark., 1990). Piyosiyanin üretimi, uygulama yapılan ve yapılmayan örneklerin absorbans oranlarına göre hesaplanmıştır.

2.2.9.2. Elastaz aktivitesi

Filtratların elastaz aktivitesi, Ohman ve ark. (1980) tarafından tarif edilen

yönteme uygun şekilde optimize edilerek gerçekleştirilmiştir. 500 µl filtrat, 10 mg elastin-kongo kırmızısı (ECR) içeren 500 µl ECR tamponuna (100 mM Tris-HCl, pH 7.5) eklenmiştir. Karışım daha sonra 37°C'de 180 rpm çalkalamada 3 saat inkübe edilmiştir. Çözünmeyen ECR, 10 dakika boyunca 3000 g'de santrifüjlenerek pelletlenmiştir. Süpernatantlar ayrı tüplere toplanarak 495 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elastaz üretimi, uygulama yapılan ve yapılmayan örneklerin absorbans oranlarına göre hesaplanmıştır.

2.2.9.3. Proteaz aktivitesi

Filtratların toplam proteolitik aktivitesi, El-Mowafy ve ark. (2014) tarafından tarif edilen yönteme uygun şekilde optimize edilerek gerçekleştirilmiştir. 500 µl filtrat, 1 ml %1,25'lik skim milk ile karıştırılmıştır. 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra örneklerin 600 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Proteaz aktivitesi, uygulama yapılan ve yapılmayan örneklerin absorbans oranlarına göre hesaplanmıştır.

2.2.10. Gen ekspresyon analizleri

2.2.10.1. RNA izolasyonu

Saf metabolitler uygulanmış PAO1 suş örnekleri RNA izolasyon işlemleri gerçekleştirilene kadar RNAlater (Invitrogen) solüsyonunda -80°C'de saklanmıştır. RNA izolasyonu için Roche *High Pure RNA Isolation Kiti* (Roche-İsviçre) kullanılmıştır. İzole edilen RNA miktarı ve kalitesi OD ölçümleri ile Cytation 3 multimode okuyucuda belirlenmiştir. Safılıkları ve miktarları belirlenen RNA örnekleri seyreltilerek 500 ng/µl konsantrasyonlarına eşitlenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri cDNA sentezi gerçekleştirilmek üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.10.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi Roche *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti* (Roche-İsviçre) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buz üzerinde çalışılmış her örnek için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

RNA	4 µl
Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer	1 µl
Random hekzamer primer	1 µl
H ₂ O	7 µl
Toplam	13 µl

Örnekler 65°C’de 10 dakika boyunca bekletildikten sonra buz üstüne alınmıştır. Daha sonra her bir örnek için aşağıdaki karışım hazırlanmış ve örneklerle toplam hacim 20 µl elde edilecek şekilde ilave edilmiştir.

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

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

25 °C	10 dakika
55 °C	30 dakika
85 °C	5 dakika

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

2.2.10.3. Hedef genlere uygun primer tasarımı

Karşılaştırma için hedef gen bölgeleri olarak, floresan biyomonitör suşlarda GFP füzyonu yapılmış, QS bağlantılı *lasB* ve *rhlA* genleri ve referans gen olarak da *rpoD* geni seçilmiştir. Bu gen bölgelerinin sekansları *Pseudomonas* Genome Database’den (www.pseudomonas.com) elde edilmiş, uygun primerler Thermo Fisher *OligoPerfect Primer Designer* (<https://apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/>) uygulaması kullanılarak tasarlanmış ve IDT Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>) ile analiz edilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Kullanılan primerler.

Primer	Uzunluk	Tm	%GC	Dizi (5' – 3')
<i>lasB</i> F	17	59,1	52,9	AACTCCGGGCTGATCTA
<i>lasB</i> R	17	59,1	52,9	TCTTGCCGCGCATATAG
<i>rhlA</i> F	18	59,8	55,6	GAGACCGTCGGCAAATAC
<i>rhlA</i> R	18	59,3	50	CACCTGGTCGATGTGAAA
<i>pqsA</i> F	18	60	50	CCCTTTGCTCGACGATTT
<i>pqsA</i> R	18	60,2	50	TGGAACCCGAGGTGTATT
<i>rpoD</i> F	20	59,2	50	GCTATATCGATCCCGATGAC
<i>rpoD</i> R	19	59,2	52,6	CTCGTCGTCCTTCTCTTTC

2.2.10.4. kRT-PZR ile cDNA'ların çoğaltılması

cDNA'lar belirlenen primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR cihazında çoğaltılmış ve ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. kRT-PZR yöntemi *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche-İsviçre) kiti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Çoğalma Roche LightCycler 96 (Roche-İsviçre) cihazında gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen karışım hazırlanmış ve ilgili protokol kite uygun olarak uygulanmıştır. Öncelikle her primer çifti için DNA seyreltmeleri kullanılarak PZR verimliliği hesaplanmıştır.

PZR Karışımı:

Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Master Mix	10 µl
H ₂ O	3 µl
cDNA	5 µl
Toplam	20 µl

PCR Döngüsü:	45 döngü		
Ön inkübasyon:	95°C	10 dk	
Amplifikasyon:	95°C	10 sn	Denatürasyon
	59°C	10 sn	Yapışma
	72°C	10 sn	Uzama
Erime	95°C	10 sn	
	55°C	60 sn	
	97°C	1 sn	

2.2.10.5. kRT-PZR bulgularının analizi

kRT-PZR sonucunda elde edilen “Geçiş Noktası” (Cq) değerleri ile gen ekspresyon miktarları analiz edilmiştir. Saf metabolit uygulaması sonucu elde edilen değerler referans gen ekspresyonu ile karşılaştırılarak normalize edilmiş ve kontrol grubuna oranları Pfaffl yöntemine göre hesaplanmıştır (Denklem 2.1) (Pfaffl, 2001). Denklemde PZR verimliliği “E” olarak gösterilmiştir.

$$Oran = \frac{E^{\Delta Cq_{Örnek}}(Cq_{kontrol} - Cq_{örnek})}{E^{\Delta Cq_{Referans}}(Cq_{kontrol} - Cq_{örnek})} \quad (\text{Denklem 2.1})$$

2.2.11. Metabolitlerin hücre kültürü yöntemi ile toksik etkilerinin araştırılması

Psoromik asit ve atranorin metabolitleri DMSO içerisinde çözüldükten sonra *in vitro* biyoyumluluk deneyleri Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Biyoteknoloji ve Sistem Biyolojisi Laboratuvarı’na bağlı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tüm aşamaları bakteri, maya ve mantar kontaminasyonunu önleyecek şekilde steril ekipmanlar ve steril besiyeri kullanılarak yapılmıştır.

In vitro hücre kültürü deneylerinde aderent (yapışık) hücre hattı olan PCS-201-012 (İnsan Dermal Fibroblast Hücre Hattı) kullanılmıştır. Uygun son

konsantrasyonlardaki metabolitler hücre hattıyla 24 saat inkübe edilmiş ve sonrasında *in-vitro* biyoyoumluluk testi yapılmıştır. Kontrol olarak hiç örnek içermeyen besiyeri kullanılmıştır.

5 % CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 10 ml besiyeri içerisinde T75 cm² hücre kültürü flasklarında çoğaltılan hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. 10 ml besiyerinin (%10 Fetal Dana Serum (FBS-PAN Biotech-Almanya), %1 penisilin-streptomisin (PAN Biotech-Almanya) (PAN Biotech-Almanya) ve DMEM besiyeri (PAN Biotech-Almanya) çekilmesinin ardından hücreler 5 ml fosfat tamponu ile (PBS-Amresco) yıkanarak serum kalıntıları, metabolitler ve ölü hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 2 ml tripsin (PAN Biotech-Almanya) ile 3 dakika inkübe edilmiş böylece hücrelerin adezyonu bloke edilmiştir. Blokasyonun ardından 5 ml taze besiyeri eklenerek tripsin inktifleştirilmiş, 2000 rpmde 5 dakika santrifüjlenmiş ve hücreler çöktürülmüştür. Sonrasında tripsinli üst faz uzaklaştırılıp, hücre peleti 1 ml besiyeri solüsyonu içerisinde çözülerek 10 ml taze besiyeri bulunan yeni bir flaska aktarılıp tekrar %70 doygunluğa ulaşana kadar inkübatörde bekletilmiştir. Tüm deneylerin hücrelerin 3. ve 14. pasajları arasında gerçekleştirilmesine özen gösterilmiştir.

Sayımı tamamlanan hücreler 96 kuyucuklu steril tabaklarda kuyucuk başına 5 X 10³ hücre olacak şekilde 100 µl DMEM steril besiyeri ile tamamlandıktan sonra damlalar halinde ekilerek hücrelerin tabakların tabanına yapışması için 24 saat %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki örnek ile 24, saat inkübe edilen PCS-201-012 hücreleri inkübasyon sürelerinin ardından hücre proliferasyon kiti olan WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio] 1,3benzenedisulfonate) (Roche-İsviçre) solüsyonu kuyucuk başına 10 µl olacak şekilde eklenip 2 saat daha inkübe edilmiştir. 2 saatlik inkübasyonun sonunda Biotek-Cytation 3 ile 450 nm absorbans ölçümü yapılmıştır. Deneyler 3 set halinde tekrarlanmıştır.

2.2.12. Yeni-nesil RNA sekanslama ve transkriptomik analizler

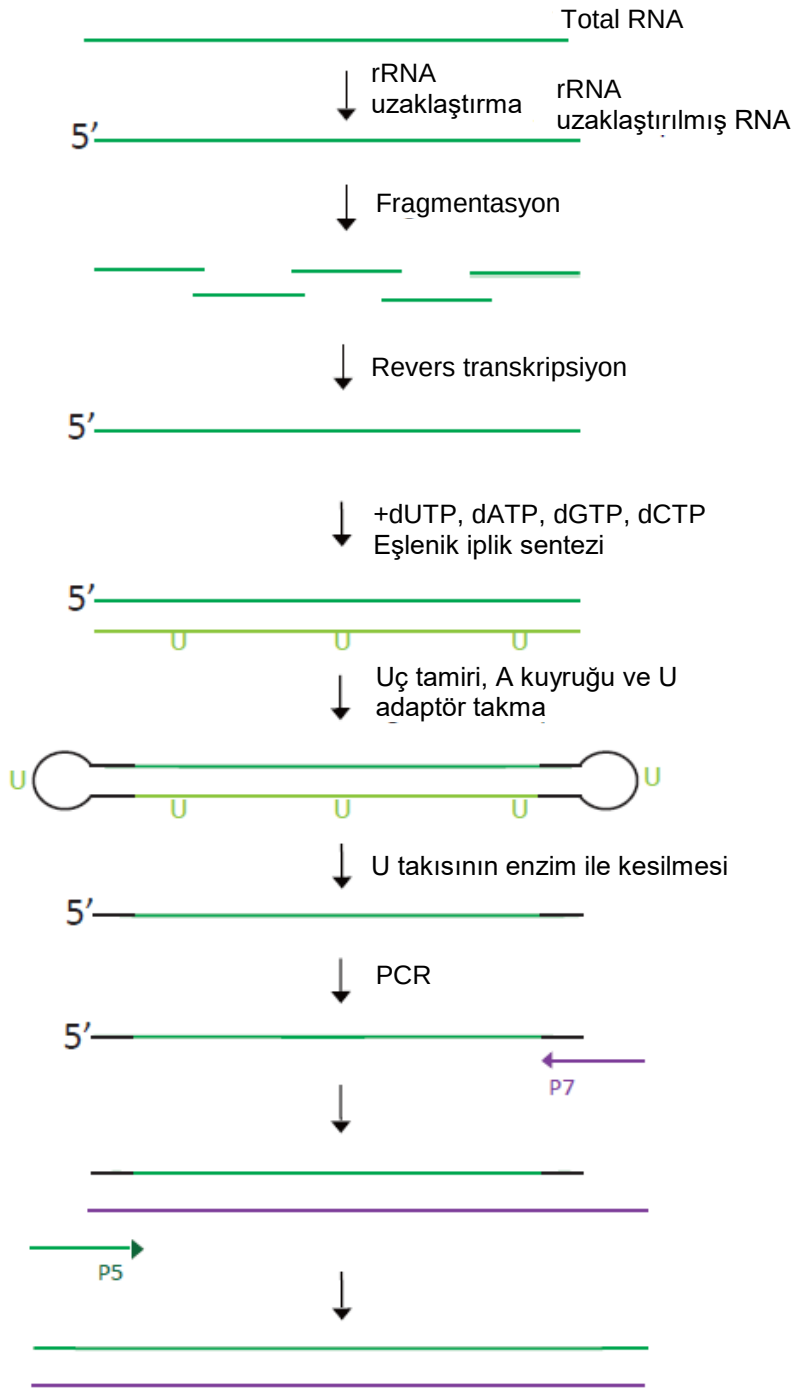
P. aeruginosa QS inhibisyonu mekanizması üzerinde etkili olduğu önceki deneyler ile belirlenmiş psoromik asit metabolitinin, *P. aeruginosa* QS yolağı ile ilişkili genler ile QS dışındaki diğer metabolik yolak genleri üzerindeki etkisinin yeni-nesik RNA sekanslama temelli transkriptomik yöntemler ile araştırılması hedeflenmiştir.

2.2.12.1. Örneklerin kalite kontrolü

RNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri spektrofotometrik ve florometrik olarak NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ABD) ve Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazları ile ayrıca belirlenmiştir. Miktar açısından uygun RNA örneklerinin bütünlüğü ve konsntrasyonları sırasıyla Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) ve kRT-PZR ile saptanmıştır. Miktar bakımından en az 100 ng/μl olmak üzere, A260/A280 absrobsiyon oranı ~2.0 olan RNA örnekleri yeni nesil dizileme reaksiyonu için seçilmiştir.

2.2.12.2. Kütüphane hazırlanması ve sekanslama

Kalite kontrolü prosedürlerinden sonra organizmalardan alınan mRNA'lar oligo (dT) boncuklar kullanılarak zenginleştirilmiştir. Daha sonra rRNA'ların uzaklaştırılması Ribo-Zero kiti kullanılarak manyetik boncuklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış mRNA örnekleri fragmentasyon tamponu eklenerek rastgele fragmentlere ayrılmış ve rastgele hekzamer primer kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Ardından özel bir ikinci iplik sentez tamponu (Illumina), dNTP'ler (dUTP, dATP, dGTP ve dCTP), RNaz H ve DNA polimeraz I eklenerek çift iplikli cDNA'lar elde edilmiştir. Daha sonra AMPure XP boncukları ile saflaştırma, terminal onarımı, poliadenilasyon, sekanslama adaptörü ligasyonu, boyut seçimi gerçekleştirilmiş ve urasil içeren ikinci iplikler USER enzimi tarafından ayrılmıştır. İpliklere özgü cDNA kütüphaneleri son PCR zenginleştirmesi ile tamamlanmıştır. Kütüphane oluşturma basamakları özet olarak **Şekil 2.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. RNA kütüphanesi hazırlanmasındaki adımlar.

Tekrar kalite kontrolü gerçekleştirilen cDNA kütüphaneleri Novaseq 6000 (Illumina, ABD) sekanslama cihazında PE150 kit ile, uygun konsantrasyonlara seyreltilerek ve kontrol olarak PhiX genomu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.12.3. Biyoinformatik analizler

Sekanslamalar sonucu her bir örnek için çift-yönlü 150 baz uzunluğunda “*.fastq*” formatında sekans verilerinin analizi için öncelikle verilerin kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir. Diğer bir ifadeyle, dizileme reaksiyonun tamamlanması ve “*base calling*” yazılımı sayesinde “*.fastq*” formatında elde edilen ham okumalar doğrudan transkriptom inşası için uygun kalitede olmayabilir. Bu nedenle, ham okumaların filtreleme gibi ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Filtreleme işlemleri Trimmomatic v0.39 (Bolger vd., 2014) ve fastp v0.20.0 (Chen vd., 2018) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filtreleme işlemi şu adımları kapsamaktadır; (i) adaptör dizilerinin kaldırılması, (ii) düşük kaliteli okumaların filtrelenmesi (<Q20, Phred skoru), (iii) baz uzunluğu 50 bp’nin altındaki okumaların kaldırılması ve (iv) okumaların ilk 5 bazında görülen düşük kaliteli dizilerin uzaklaştırılmasıdır. Filtreleme işleminden önce ve sonra okumalar FASTQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) yazılımı ile görselleştirilmiş ve MultiQC v1.6 (Ewels vd., 2016) aracı dosyaların biraraya getirilerek kalite kontrol dosyası oluşturulmuştur. Böylece analize hazır yüksek kaliteli RNA-dizileme verileri oluşturulmuştur.

Literatürde belirtildiği gibi, RNA-Dizileme temelli transkriptom analizine ilişkin geliştirilen yazılımların büyük çoğunluğu ökaryotik gen yapısına göre tasarlanmıştır. Bakteriler gibi prokaryotik organizmalar intronik dizilerin içermemesi ve alternatif kırılma gibi post-transkripsiyonel modifikasyonların gözlenmemesi nedeniyle ökaryotik organizmalarda kullanılan programların bakterilerde kullanılmasını güç kılmaktadır. Örneğin, ökaryotik transkriptom çalışmalarında rutin olarak kullanılan kırılma bölgelerini (ing. splice-aware) dikkate alan hizalama (ing. alignment) yazılımları bakterilerde kullanılmamaktadır. Bu nedenle, bakterilerde RNA-Dizileme çalışmaları için özgün olarak geliştirilmiş güncel ProkSeq (Mahmud vd., 2020) iş akışı kullanılmıştır.

Bu doğrultuda, filtreleme işlemi sonucu elde edilen yüksek kaliteli okumalar öncelikle *P. aeruginosa* PAO1 (GCA_000006765) referans genomuna Bowtie2 v2.4.2 (Langmead ve Salzberg, 2012) yazılımı ile hizalanmış ve sonuçlar “*.bam*” formatında saklanmıştır. Her bir örnek için; (i) kapsam homojenliği (ing. coverage uniformity), (ii) protein kodlayan genler ve 5'/3' UTR bölgelerine hizalanma oranı, (iii) okuma

duplikasyon oranı ve (iv) DNA zincir özgünlüğü (ing. strand specificity) gibi hizalamaya ilişkin özet istatistiksel bilgiler RseQC v4.0.0 (Wang vd., 2012) yazılımı ile elde edilmiştir. Daha sonra, her bir gene hizalanmış okumalar featureCounts v2.0.1 (Liao vd., 2014) yazılımı ile tespit edilmiştir. Deneysel süreçlerden kaynaklanan hataların giderilmesi için her bir örneğe ait okumalar ProkSeq yazılımı içinde yer alan “transcripts per million (TPM)” ve “counts per million (CPM)” gibi yöntemler ile normalize edilmiştir. Gruplar arası ifadesinde farklılık gösteren genlerin tespiti için DeSeq2 (Love vd., 2014) yazılımı kullanılmıştır (R versiyon: "4.0"). Gruplar arasındaki gen ifade değerlerine ilişkin farklılıkların görselleştirilmesi (volcano plot, MA plot, heatmap vb.) DEBrowser v1.19.0 (Kucukkural vd., 2019) R paketi ile yapılmıştır. Gen ifadesinde farklılık gösteren genlerin biyolojik süreç (ing. biological process), moleküler işlev (ing. molecular function) ve hücresel bileşen (ing. cellular component) gibi kategorilerine ilişkin gene ontoloji (GO) zenginleştirme analizleri ile metabolik yolak analizleri ProkSeq iş akışı içinde yer alan clusterProfiler v3.10.1 (Yu vd., 2012) yazılımı ile yapılmıştır. Yolak zenginleştirme analizleri ShinyGO web uygulaması ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.13. İstatiksel analizler

Özütler ile uygulama yapılan ve uygulama yapılmamış kontrol gruplarının karşılaştırmaları çoklu t-test, tek yönlü ANOVA ve parametrik olmayan Kruskal-Wallis analizleri ile gerçekleştirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Biyofilm inhibisyonu, virülans analizleri ve kRT-PZR analizleri için de parametrik olmayan Kruskal-Wallis yöntemi kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizlerde Gruplar arasında gen ifade değerleri açısından uyum olup olmadığı temel bileşenler analizi (ing. principal component analizi) yapılmış ve grupların kümelenme durumları ClustVis (Metsalu ve Vilo, 2015) internet aracı ile görselleştirilmiştir. Grafiklerde ns anlamsız, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$ olarak gösterilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. Toplanan liken cins ve türleri

Taze liken örnekleri araziden toplanmış ve tür tayinleri gerçekleştirilmiştir. Sistematik teşhisleri tamamlanan 11 cins, 17 tür ve toplandığı lokaliteler **Tablo 3.1**'de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Toplanan likenlerin isimleri ve lokaliteleri. İST: İstasyon.

Liken Adı	Lokalite
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Ramalina farinaceae</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Ramalina calicaris</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Usnea florida</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Bryoria capillaris</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Platismatia glauca</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Usnea sp.</i>	Bolu – Mudurnu
<i>Evernia divaricata</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Ramalina farinaceae</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Bryoria capillaris</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Ramalina calicaris</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Platismatia glauca</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Bursa-Alaçam İST1
<i>Evernia prunastri</i>	Bursa-Alaçam İST4
<i>Ramalina farinaceae</i>	Bursa-Alaçam İST4
<i>Bryoria capillaris</i>	Bursa-Alaçam İST4
<i>Evernia divaricata</i>	Bursa-Alaçam İST4
<i>Usnea sp.</i>	Bursa-Alaçam İST4
<i>Platismatia glauca</i>	Bursa-Alaçam İST3

<i>Hypogymnia physodes</i>	Bursa İST2
<i>Usnea barbata</i>	Bursa-Alaçam İST3
<i>Cladonia rangiformis</i>	Bursa-Alaçam İST3
<i>Parmelia submontana</i>	Bursa-Alaçam İST2
<i>Cladonia rangiformis</i>	Bursa-Alaçam İST2
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	Bursa-Alaçam İST2
<i>Parmelia sulcata</i>	Bursa-Alaçam İST2
<i>Usnea sp.</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Melanohalea exasperata</i>	Bursa-Alaçam İST4
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	Bursa-Alaçam İST1
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Bursa – Alaçam IST3
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Bolu – Aladağlar
<i>Ramalina calicaris</i>	Bolu – Yedigöller

3.1.2. Likenlerden özüt eldesi

Arazi çalışmalarında toplanan ve daha sonra teşhis edilen tüm örneklerden çözücüler (aseton) uçtukten sonra toz halindeki liken özütleri steril santrifüj tüplerine alınmış ve her bir liken özütüne ait toz ağırlıklar tartılmıştır.

Özütler tartıldıktan sonra saf DMSO ile çözülmüş ve daha sonra bakterilere uygulamak üzere FTS ile seyreltik sıvı bölüntülere alınmıştır. Toplanan likenlerin özüt konsantrasyonları **Tablo 3.2**'de gösterilmiştir.

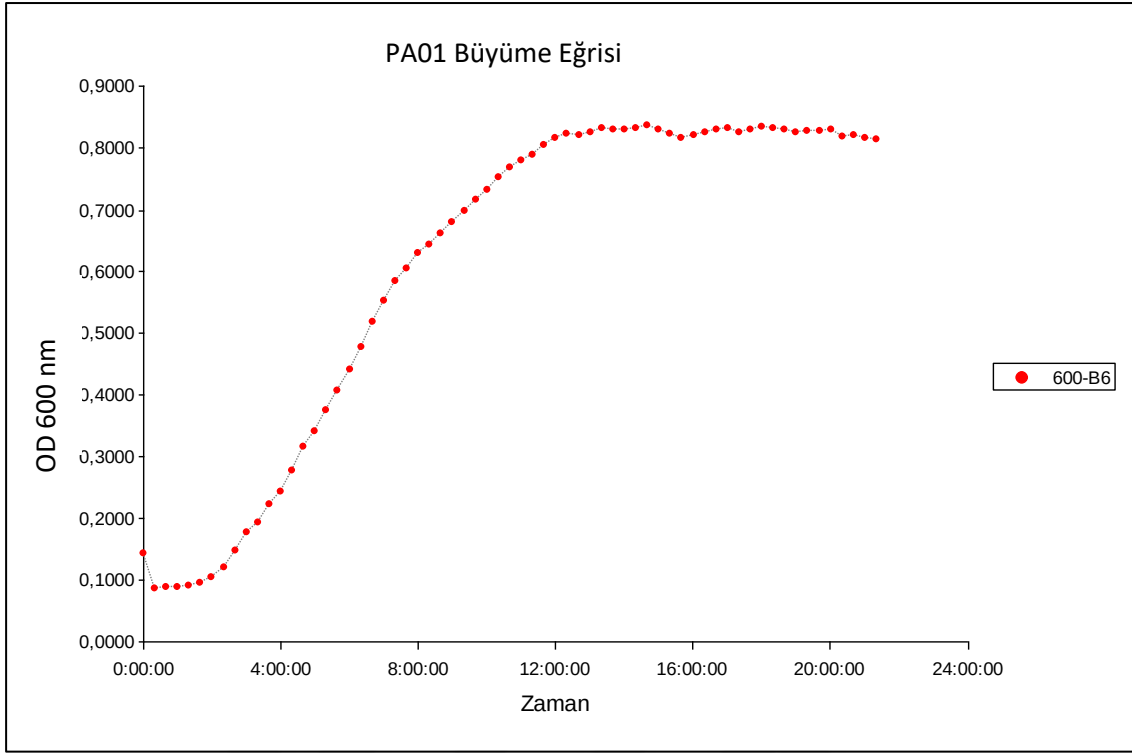
Tablo 3.2. Toplanan liken türlerinin isimleri ve hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonları.

No:	Liken adı	Stok konsantrasyon (mg/ml)	Seyreltmeler (µg/ml) %6 DMSO
1	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	8,00	480
2	<i>Ramalina farinaceae</i>	8,00	480
3	<i>Ramalina calicaris</i>	8,00	480
4	<i>Usnea florida</i>	8,00	480
5	<i>Bryoria capillaris</i>	8,00	480

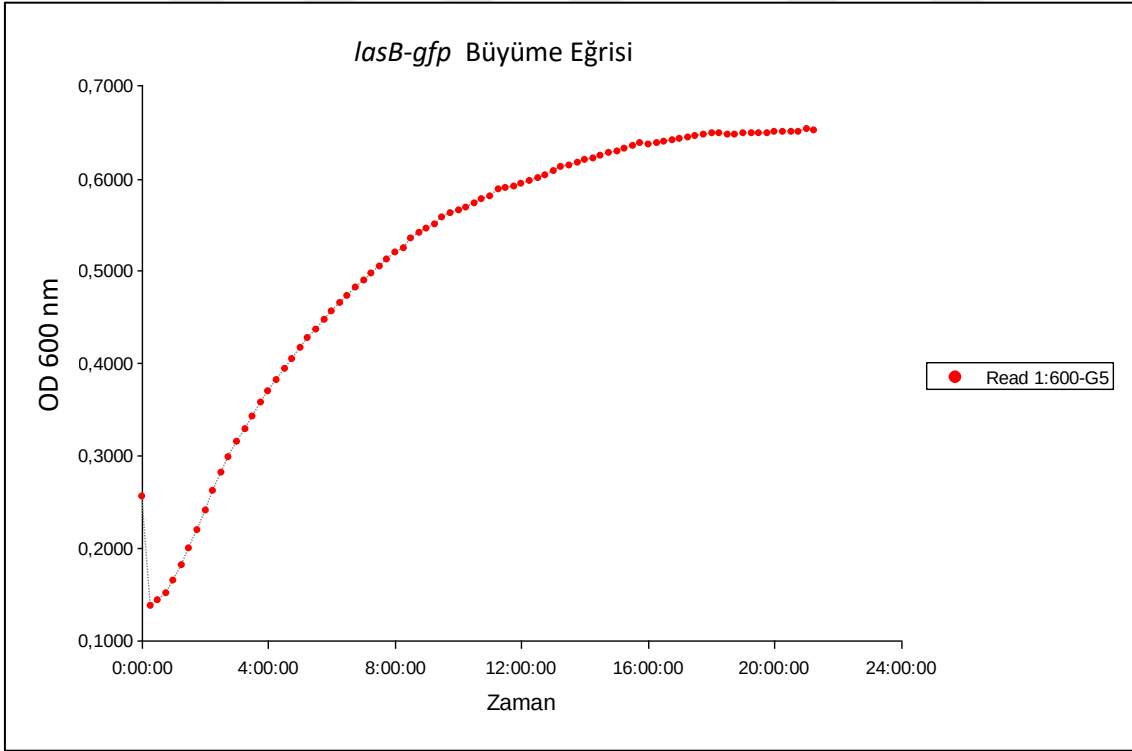
6	<i>Platismatia glauca</i>	8,00	480
7	<i>Usnea sp.</i>	8,00	480
9	<i>Evernia divaricata</i>	8,00	480
10	<i>Ramalina farinaceae</i>	8,00	480
11	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	8,00	480
12	<i>Bryoria capillaris</i>	8,00	480
13	<i>Ramalina calicaris</i>	8,00	480
14	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	8,00	480
15	<i>Platismatia glauca</i>	8,00	480
16	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	8,00	480
17	<i>Evernia prunastri</i>	8,00	480
18	<i>Ramalina farinaceae</i>	8,00	480
19	<i>Bryoria capillaris</i>	8,00	480
20	<i>Evernia divaricata</i>	8,00	480
21	<i>Usnea sp.</i>	8,00	480
22	<i>Platismatia glauca</i>	8,00	480
23	<i>Platismatia glauca</i>	8,00	480
24	<i>Usnea barbata</i>	8,00	480
25	<i>Parmelia submontana</i>	8,00	480
26	<i>Cladonia rangiformis</i>	8,00	480
27	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	8,00	480
28	<i>Parmelia sulcata</i>	8,00	480
29	<i>Cladonia rangiformis</i>	8,00	480
30	<i>Melanohalea exasperata</i>	8,00	480
31	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	8,00	480

3.1.3. Bakteri suşlarının büyüme eğrileri

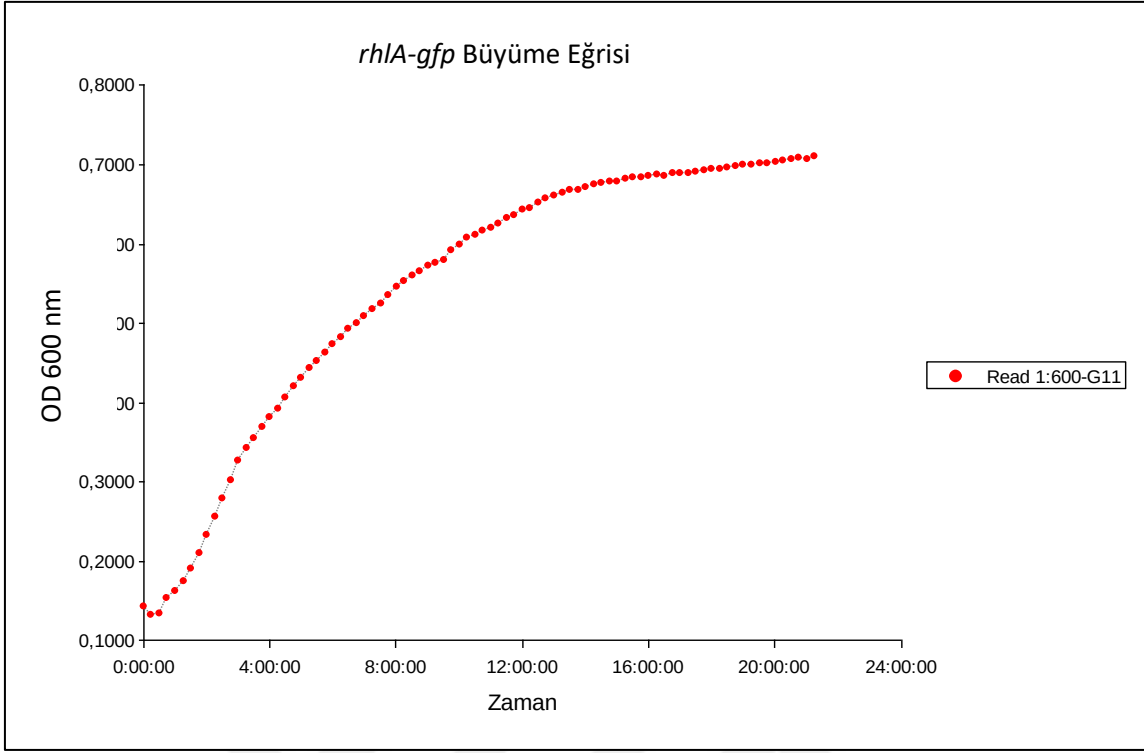
P. aeruginosa PAO1, *lasB-gfp* ve *rhIA-gfp* suşlarına ait zamana bağlı büyüme eğri analizleri sırasıyla Şekil 3.1-3'te yer almaktadır.



Şekil 3.1. *P. aeruginosa* PA01 suşuna ait zamana bağlı büyüme eğri analizi.



Şekil 3.2. *P. aeruginosa lasB-gfp* suşuna ait zamana bağlı büyüme eğri analizi.



Şekil 3.3. *P. aeruginosa* *rhlA-gfp* suşuna ait zamana bağlı büyüme eğri analizi.

3.1.4. Özütlerin *P. aeruginosa* biyomonitör suşları üzerinde quorum sensing inhibisyonu (QSI) özelliklerinin belirlenmesi

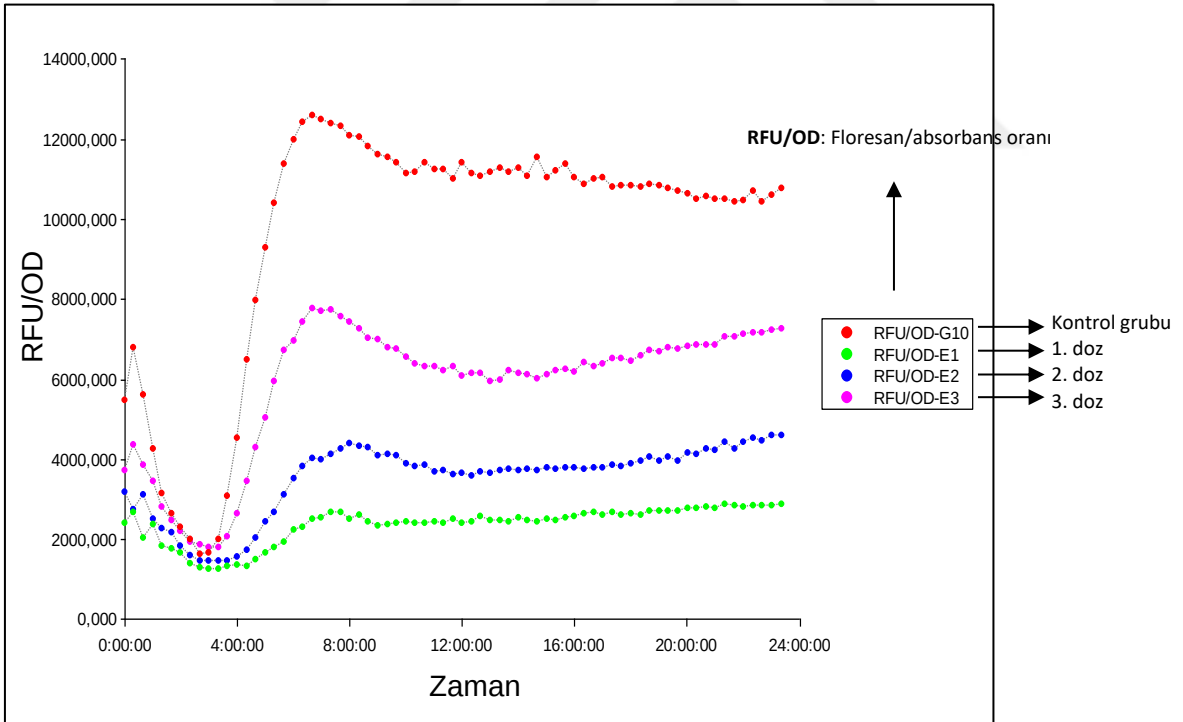
QS inhibisyonlarını belirlemek için biyomonitör suşlar kullanılmıştır. Bu sensör suşların özelliği, *las* ve *rhl* promotörlerine bağlı GFP içeren plazmid aktarılmış olmalarıdır. Dolayısıyla *lasB-gfp* ve *rhlA-gfp* suşlarında gen ekspresyonu oldukça GFP'den dolayı floresans ışınması gözlenebilmekte ve gen ekspresyonu olmadığında GFP floresan ışınması olmamaktadır. Grafiklere bakıldığında, RFU/OD'ye karşı zaman grafikleri görülmektedir. Bağlı floresan birimi (RFU) floresans miktarına göre yapılan analizlerde dakikada üretilen floresansı saptamak için kullanan bir ölçüm birimidir. Zamana bağlı olarak çıkarılan grafiklerde test edilen özütlerin farklı 3 konsantrasyonunun kontrole göre floresan ışınmaları yani gen ekspresyon düzeyleri görülebilmektedir. Kontrollere göre düşük saptanan floresan düzeyleri ilgili genin baskılanmasını sağladığı dolayısıyla QS sistemi üzerine inhibitor etki gösterdiğini ifade etmektedir.

3.1.4.1. Absorbans ve floresans grafiklerinin yorumu

Verilen grafikler ile ilgili açıklama örnek grafik üzerinde aşağıda sunulmuştur. Tüm grafikler uygulama yapılmamış bakteri suşlarının bulunduğu kontrol grupları ile birlikte verilmiştir.

Floresans ölçümleri, biyosensör suşlardaki QS bağlı promotör kaynaklı GFP ekspresyonunu belirtmektedir (Eksitasyon: 485 nm, Emisyon: 535 nm). Kontrole göre düşük floresans miktarı QS inhibisyonu miktarını kantitatif olarak göstermektedir. Kontrole, yani kırmızı çizgiye göre altta kalanlar QS sistemini inhibe edenler - QSI özellik gösterenler, kırmızı çizginin üstünde kalanlar QS sistemini teşvik edenler olarak yorumlanmıştır.

Kırmızı renkli eğriler, özüt veya fraksiyon uygulaması yapılmamış kontrolleri (ör: A12, H12, H11, H10); diğer renkteki ölçümler ise seri dilüsyon halinde özüt veya fraksiyon uygulanmış grupları (ör: A1, A2, A3) ifade etmektedir.



Şekil 3.4. Grafiklerin yorumlanması için verilen şablon grafik.

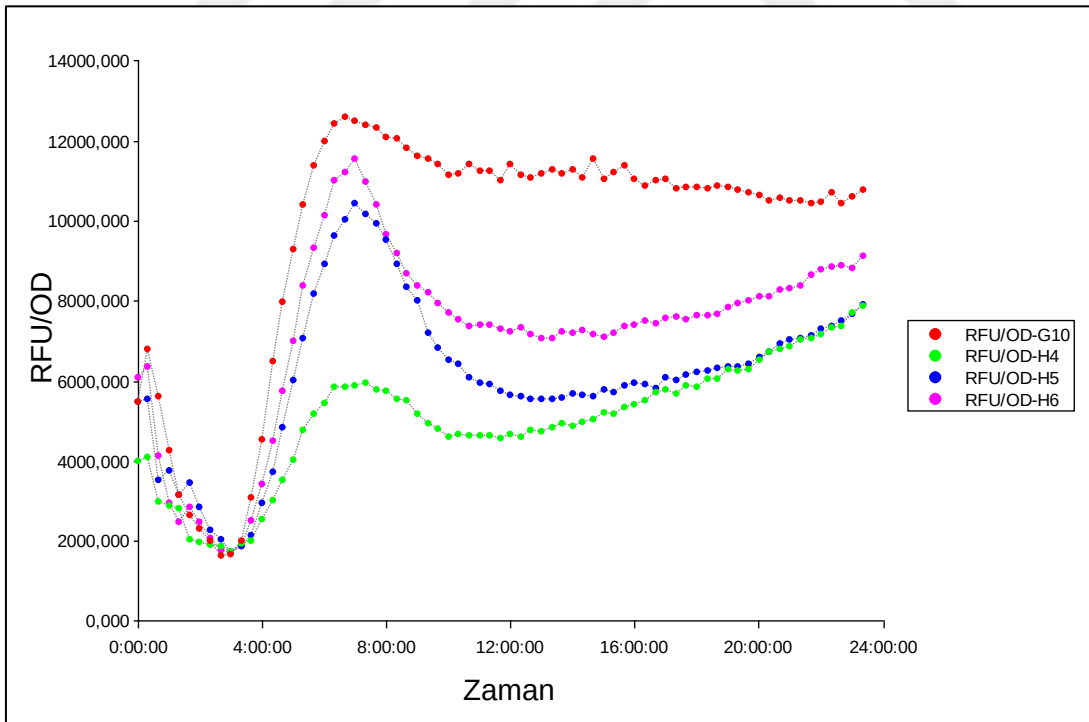
3.1.4.2. *lasB-gfp* biyosensör suşu bulguları

120, 60 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında liken özütleri uygulanmış bakterilerden 24 saat boyunca 15 dakikada bir alınan floresan ışıma ve absorbans (OD 450 ve 600 nm) ölçümleri sonunda elde edilen verilerle zamana karşı floresans ve absorbans grafikleri oluşturulmuştur. Uygulanan liken özütlerine ait inhibisyon yüzdeleri **Tablo 3.3**'te verilmiştir. Sonuçlar, bakteri suşlarının büyüme inhibisyonlarının da göz önünde bulundurularak floresans/absorbans (RFU/OD) değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek inhibisyon gösteren *Bryoria* özütü uygulamalarının grafikleri **Şekil 3.5-7**'de gösterilmiştir. Diğer liken özütlerine ait grafikler **Ekler** kısmında verilmiştir.

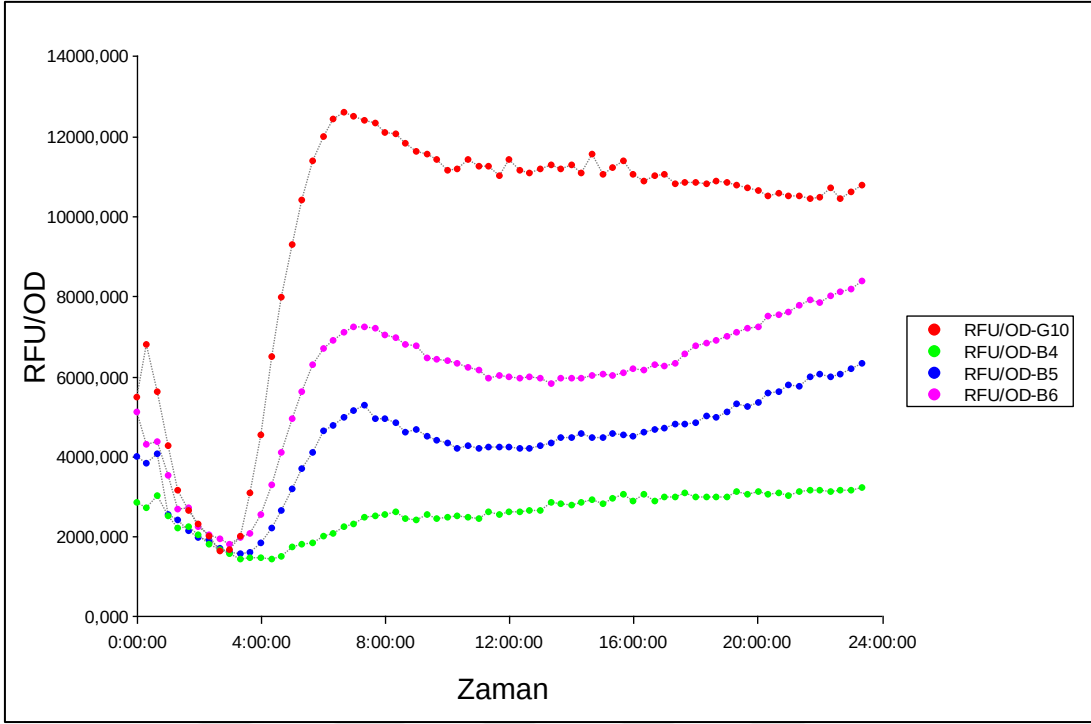
Tablo 3.3. *lasb-gfp* suşuna uygulanan liken özütlerinin konsantrasyonları ve QS inhibisyon yüzdeleri.

No:	Liken adı	Doz 1	Doz 2	Doz 3
		%	%	%
		İnhibisyon (120 µg/ml)	İnhibisyon (60 µg/ml)	İnhibisyon (30 µg/ml)
1	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	87,4	68,9	47,2
2	<i>Ramalina farinaceae</i>	93,4	74,3	48,5
3	<i>Ramalina calicaris</i>	76,4	63,7	29,9
4	<i>Usnea florida</i>	91,2	67,4	38,1
5	<i>Bryoria capillaris</i>	94,9	83,1	70,9
6	<i>Platismatia glauca</i>	83,3	58,2	48,9
7	<i>Usnea sp.</i>	89,7	68,6	37,8
9	<i>Evernia divaricata</i>	49,1	18,0	-0,8
10	<i>Ramalina farinaceae</i>	92,5	65,6	46,3
11	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	94,0	75,8	55,3
12	<i>Bryoria capillaris</i>	92,8	81,7	75,0
13	<i>Ramalina calicaris</i>	64,6	28,0	23,1
14	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	89,6	67,6	42,2
15	<i>Platismatia glauca</i>	76,1	63,3	34,9
16	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	87,1	67,4	42,2

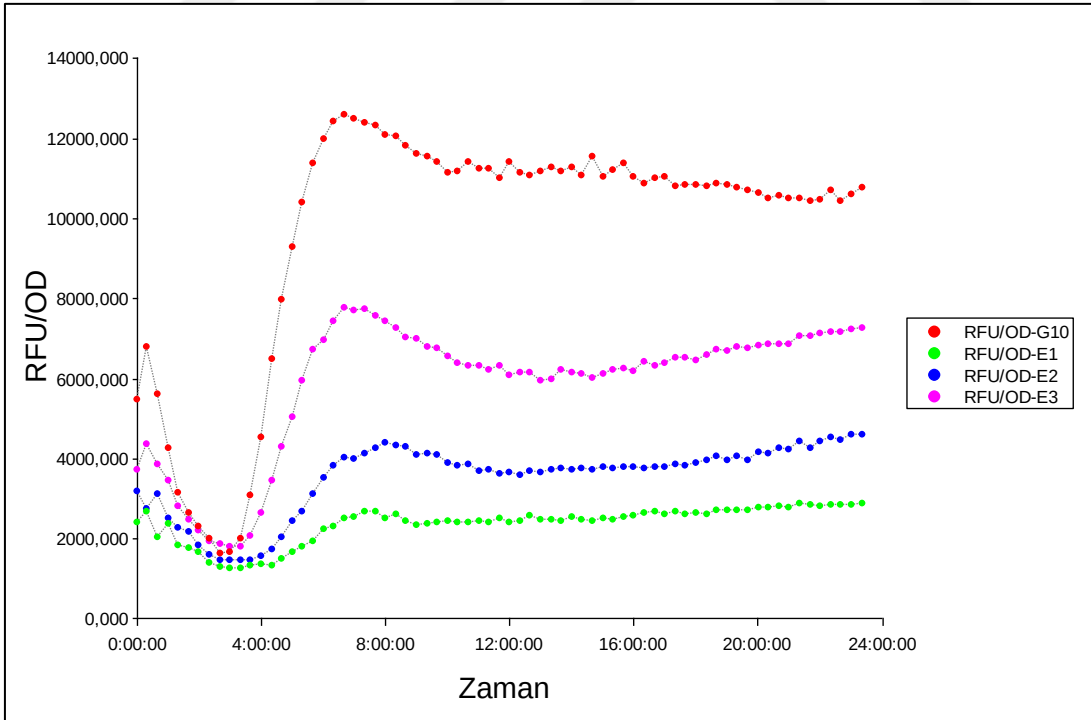
17	<i>Evernia prunastri</i>	72,1	43,5	19,3
18	<i>Ramalina farinaceae</i>	91,9	64,8	47,9
19	<i>Bryoria capillaris</i>	87,6	78,9	60,1
20	<i>Evernia divaricata</i>	55,3	35,8	29,2
21	<i>Usnea sp.</i>	87,4	68,1	41,9
22	<i>Platismatia glauca</i>	80,7	53,3	31,8
23	<i>Platismatia glauca</i>	76,0	53,4	38,4
24	<i>Usnea barbata</i>	93,8	72,9	46,0
25	<i>Parmelia submontana</i>	86,6	70,7	50,5
26	<i>Cladonia rangiformis</i>	82,9	62,0	47,8
27	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	88,0	66,9	49,6
28	<i>Parmelia sulcata</i>	86,8	73,2	51,1
29	<i>Cladonia rangiformis</i>	77,0	55,0	31,3
30	<i>Melanohalea exasperata</i>	64,1	41,9	30,1
31	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	86,6	69,4	46,9



Şekil 3.5. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (H4, H5, H6) dozlarının *las* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



Şekil 3.6. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (B4, B5, B6) dozlarının *las* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



Şekil 3.7. Bolu Mudurnu bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının *las* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).

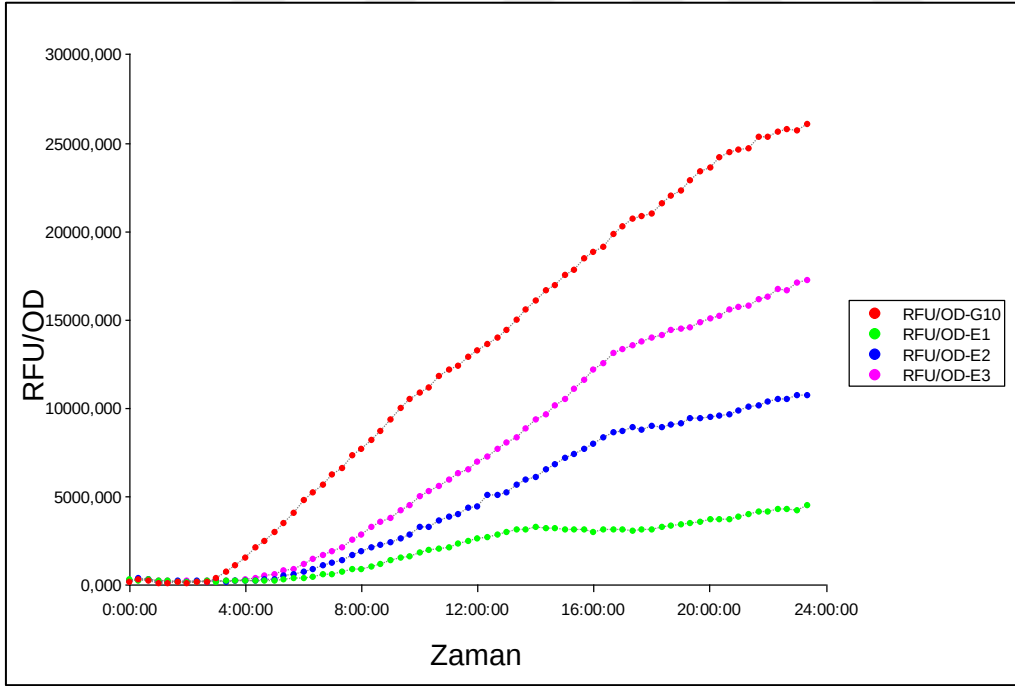
3.1.4.3. *rhlA-gfp* biyosensör suşu bulguları

120, 60, 30 µg/ml konsantrasyonlarında liken özütleri uygulanmış bakterilerden 24 saat boyunca 15 dakikada bir alınan floresan ışıma ve absorbans (OD 450 ve 600 nm) ölçümleri sonunda elde edilen verilerle zamana karşı floresans ve absorbans grafikleri oluşturulmuştur. Uygulanan liken özütlerine ait inhibisyon yüzdeleri **Tablo 3.4**'te verilmiştir. Sonuçlar, bakteri suşlarının büyüme inhibisyonlarının da göz önünde bulundurularak floresans/absorbans (RFU/OD) değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek inhibisyon gösteren *Bryoria* türlerinin özüt uygulamalarının grafikleri **Şekil 3.8-10**'da gösterilmiştir. Diğer liken özütlerine ait grafikler **Ekler**'de verilmiştir.

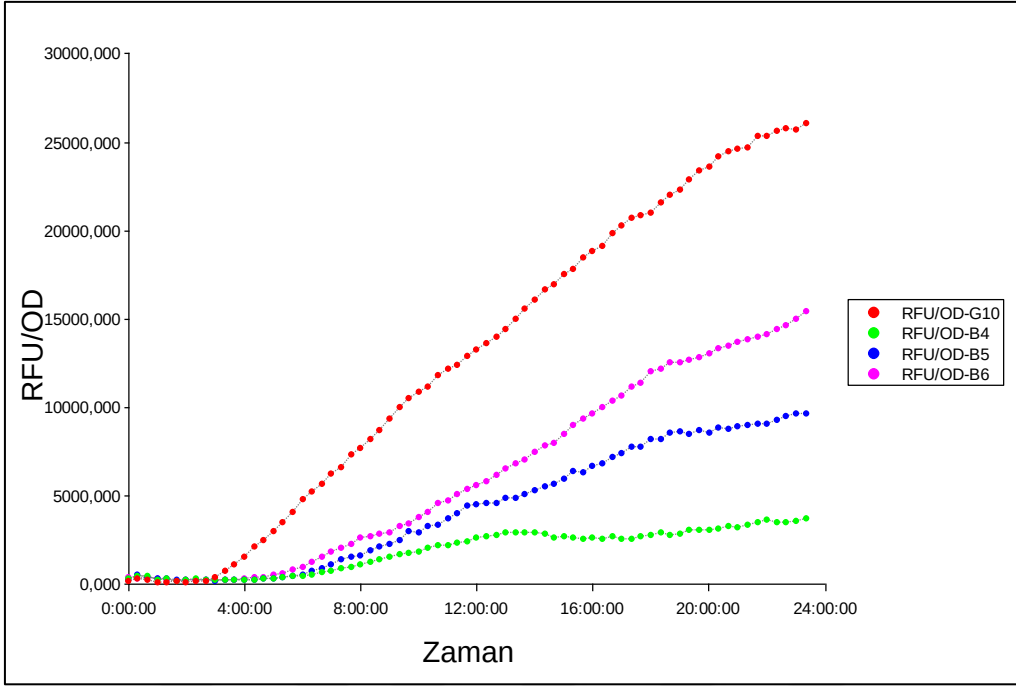
Tablo 3.4. *rhlA-gfp* suşuna uygulanan liken özütlerinin konsantrasyonları ve inhibisyon yüzdeleri.

No:	Liken adı	Doz 1 % İnhibisyon (120 µg/ml)	Doz 2 % İnhibisyon (60 µg/ml)	Doz 3 % İnhibisyon (30 µg/ml)
1	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	71,9	54,0	48,9
2	<i>Ramalina farinaceae</i>	66,3	41,8	29,3
3	<i>Ramalina calicaris</i>	51,4	20,0	24,1
4	<i>Usnea florida</i>	55,4	26,3	11,5
5	<i>Bryoria capillaris</i>	79,4	62,8	43,6
6	<i>Platismatia glauca</i>	66,7	36,8	19,6
7	<i>Usnea sp.</i>	57,4	30,0	9,9
9	<i>Evernia divaricata</i>	20,9	14,3	-
11	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	72,9	54,0	47,4
12	<i>Bryoria capillaris</i>	82,7	68,5	55,5
13	<i>Ramalina calicaris</i>	57,4	29,1	27,8
14	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	66,6	52,8	50,6
15	<i>Platismatia glauca</i>	47,8	26,0	7,4

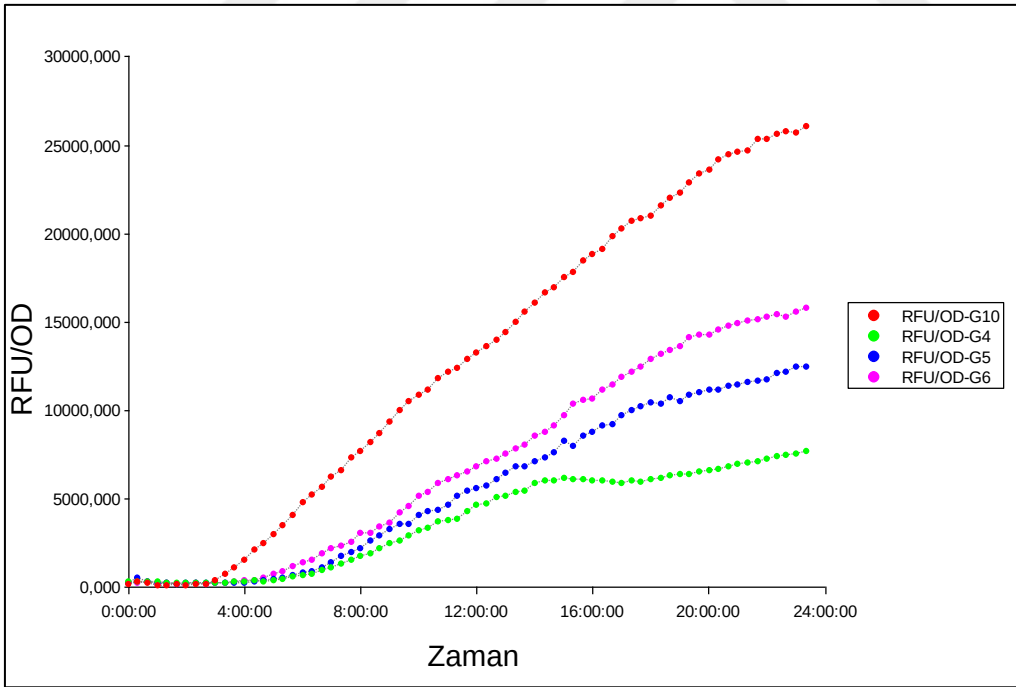
17	<i>Evernia prunastri</i>	53,8	36,4	27,7
19	<i>Bryoria capillaris</i>	65,0	57,2	47,6
20	<i>Evernia divaricata</i>	19,6	10,2	-
21	<i>Usnea sp.</i>	56,1	23,9	10,1
22	<i>Platismatia glauca</i>	76,8	44,1	22,2
23	<i>Platismatia glauca</i>	65,4	28,0	14,6
24	<i>Usnea barbata</i>	51,4	27,4	13,3
25	<i>Parmelia submontana</i>	52,3	20,0	5,4
26	<i>Cladonia rangiformis</i>	75,7	55,6	46,8
28	<i>Parmelia sulcata</i>	75,2	57,7	40,8
29	<i>Cladonia rangiformis</i>	40,6	21,6	-
30	<i>Melanohalea exasperata</i>	57,2	40,6	18,4
31	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	65,4	57,7	48,8



Şekil 3.8. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



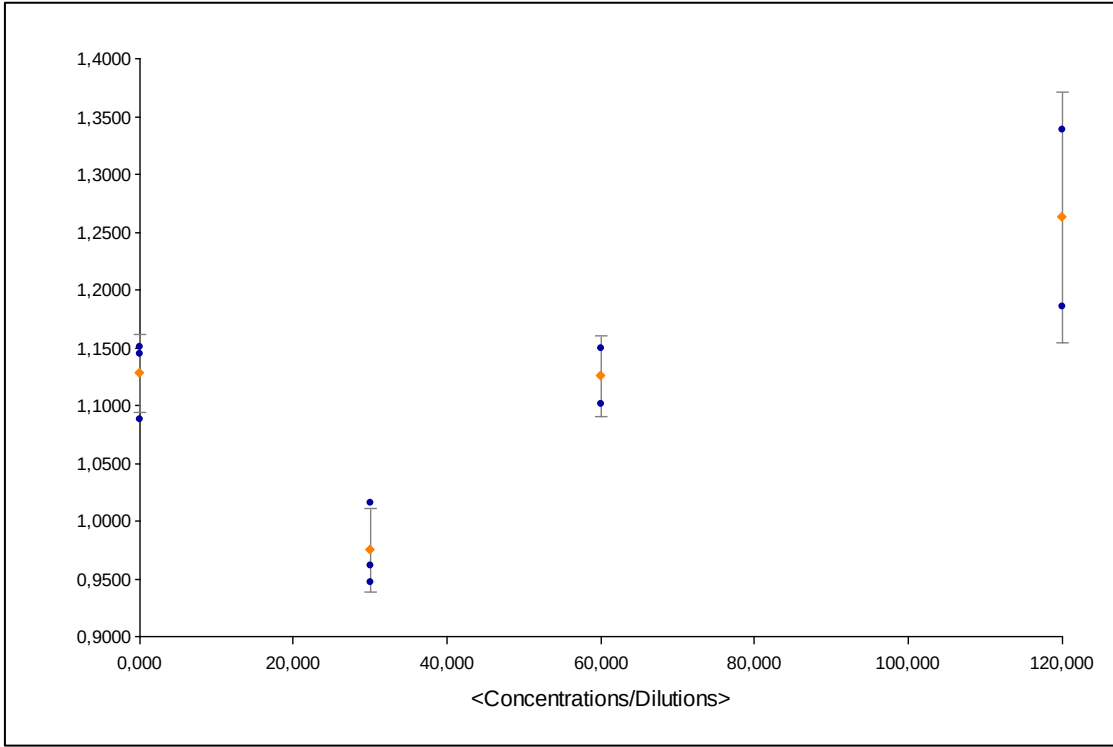
Şekil 3.9. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B4, B5, B6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



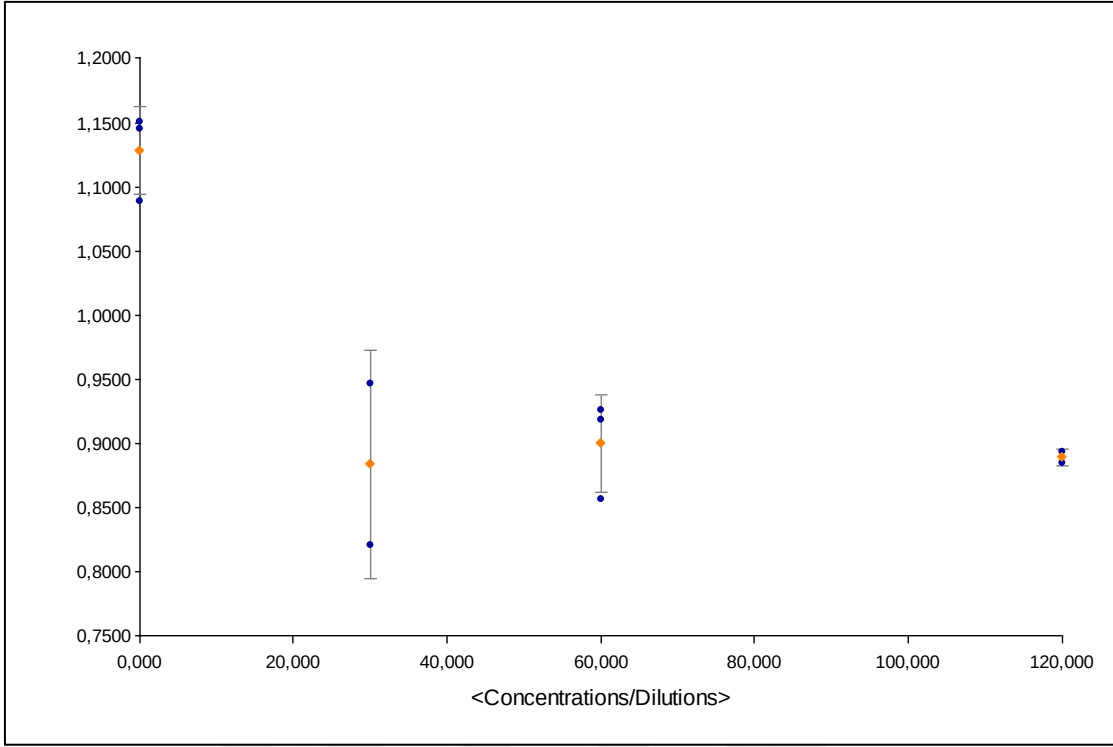
Şekil 3.10. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G4, G5, G6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).

3.1.5. Liken özütlerinin *P. aeruginosa* üzerinde biyofilm inhibisyonu bulguları

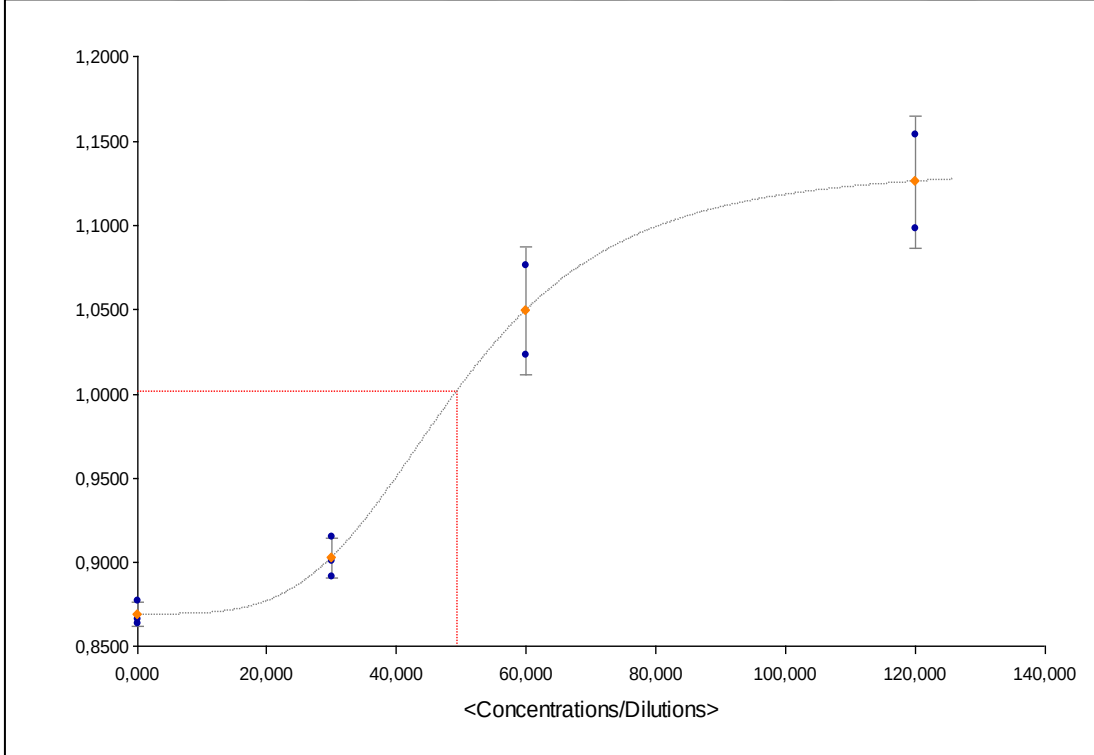
P. aeruginosa PAO1 wild type üzerinde kristal viyole boyama yöntemi ile yapılan deneyler ile elde edilen *Bryoria* cinslerine ait biyofilm inhibisyon grafikleri **Şekil 3.11-13**'te verilmiştir. Diğer liken özütlerine ait biyofilm inhibisyon grafikleri **Ekler** kısmında gösterilmiştir. Sonuçlara göre *P. aeruginosa*'ya uygulanan liken özütlerinin bir kısmı düşük konsantrasyonlarda biyofilm kütleinde yaklaşık %15 azalmaya sebep olurken, pek çoğunun da biyofilm kütleinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.11. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının biyofilm ölçümleri.



Şekil 3.12. Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının biyofilm ölçümleri.



Şekil 3.13. Bursa Alaçam bölgesinden toplanan *B. capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E1, E2, E3) dozlarının biyofilm ölçümleri.

3.1.6. Etkileri belirlenen liken özütlerinin içerdiği metabolitlerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi ve izolasyonu

QSI etkinlikleri belirlenen liken özütlerinin fraksiyonlanma, HPLC ve LC/MS analizleri Japonya Akita Prefectural University’de TÜBİTAK BİDEB-2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında “Likenslerdeki Fungal Topluluklar için Metabarkodlama ve Metabolit Analizleri” başlıklı araştırma ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada Doç. Dr. Kojiro HARA’nın araştırma laboratuvarına ait liken metabolit kütüphanesinin kullanılması ile literatürde karakterizasyonu bulunmayan bileşiklerin hızlıca tanımlanmasına olanak sağlanmıştır. HPLC ve LC/MS analizleri ile belirlenen özüt içerikleri **Tablo 3.5**’te, analizlere ait grafikler **Ekler** kısmında verilmiştir.

Tablo 3.5. HPLC analizleri sonucunda liken özütlerinde belirlenen sekonder metabolit içerikleri. (? : benzer türev olabilir)

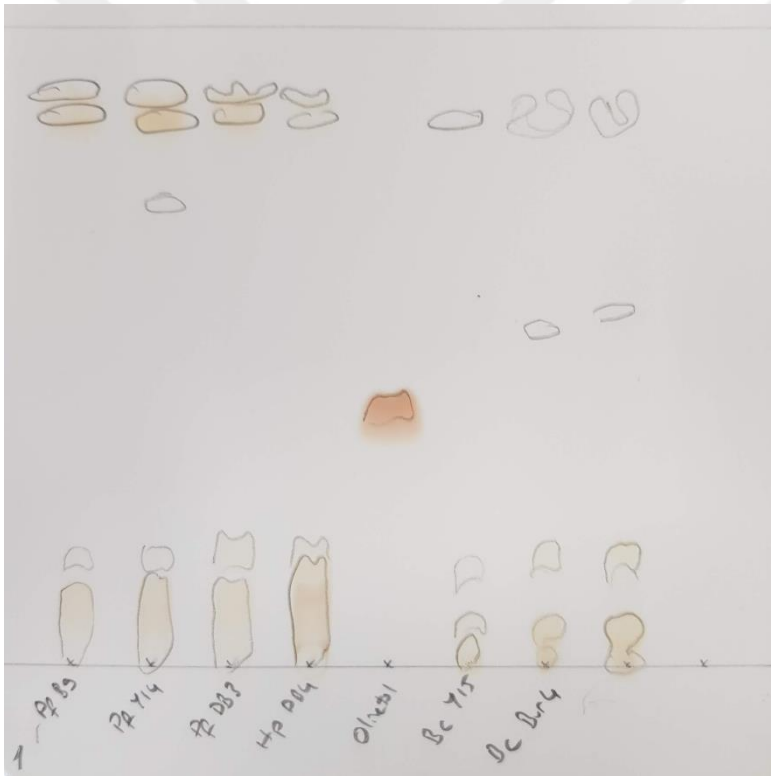
Liken türü	Alıkonma zamanı (dak)	m/z([M-H] ⁻)	Bileşik
<i>Evernia divaricata</i>	2,0	195	divaric acid? ethyl orsellinate? Haematommic acid?
	3,5	209	ethyl everninate?
	5,6	517	unknown
	13,1	387	divaricatic acid
	14,4	343	usnic acid
<i>Evernia divaricata</i>	2,0	195	divaric acid? ethyl orsellinate? Haematommic acid?
	3,5	209	ethyl everninate?
	5,5	517	unknown
	13,1	387	divaricatic acid
	14,4	343	usnic acid
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	2,7	229	unknown

	5,8	485	3-hydroxyphysodic acid?
	9,1	483	unknown
	9,4	469	physodic acid
	11,5	511	unknown
	15,8	373	atranorin
	19,3	407	chroloatranorin
<i>Parmelia sulcata</i>	1,9	387	salazinic acid
	3,5	427	unknown
	5,8	485	unknown
	6,7	503	unknown
	9,4	469	physodic acid
	19,2	407	chroloatranorin
<i>Ramalina farinaceae</i>	1,9	387	salazinic acid
	3,4	371	unknown
	3,8	413	grayanic acid?
	5,7	331	evernic acid
	9,5	345	obtusatic acid
	14,5	343	usnic acid
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	2,7	229	unknown
	5,8	485	3-hydroxyphysodic acid?
	9,1	483	unknown
	9,3	469	physodic acid
	11,4	511	unknown
	15,7	373	atranorin
	19,1	407	chroloatranorin
<i>Usnea florida</i>	1,9	387	salazinic acid
	3,5	427	alectorialin derivatives
	5,5	387	dibenzofurans?
	14,6	343	usnic acid
<i>Platismatia glauca</i>	1,9	387	salazinic acid
	21,2	401	caperatic acid
	29,0	387	unknown

<i>Platismatia glauca</i>	1,9	387	salazinic acid
	5,8	485	3-hydroxyphysodic acid?
	9,2	469	physodic acid
	21,1	401	caperatic acid
<i>Platismatia glauca</i>	2,4	387	salazinic acid
	5,7	485	3-hydroxyphysodic acid?
	9,3	469	physodic acid
	21,1	401	caperatic acid
	29,0	387	unknown
	34,0	639	unknown
<i>Usnea barbata</i>	1,9	387	salazinic acid
	14,5	343	usnic acid
<i>Cladonia rangiformis</i>	15,5	373	atranorin
	27,0	385	rangiformic acid? İsorangiformic acid?
<i>Cladonia rangiformis</i>	15,5	373	atranorin
	26,9	385	rangiformic acid?
	3.9		2'-O-physodic acid?
	4.4		physodalic acid
	5.0		physodic acid deriv.
	6.8		physodic acid
	14.0		atranorin
<i>Bryoria capillaris</i>	3.0		norstictic acid
	3.2		barbatolic acid türevi
	4.0		fumarprotocetraric acid
	4.9		psoromic acid
	7.56		barbatolic acid
<i>Bryoria capillaris</i>	3.0		norstictic acid
	3.6		alectorialic acid?
	4.0		fumarprotocetraric acid
	4.9		psoromic acid
	7.5		barbatolic acid

<i>Bryoria capillaris</i>	2.8	alectorialin?
	3.2	barbatoric acid türevi
	3.6	alectorialic acid?
	7.5	barbatolic acid
	18.4	chloroatranorin

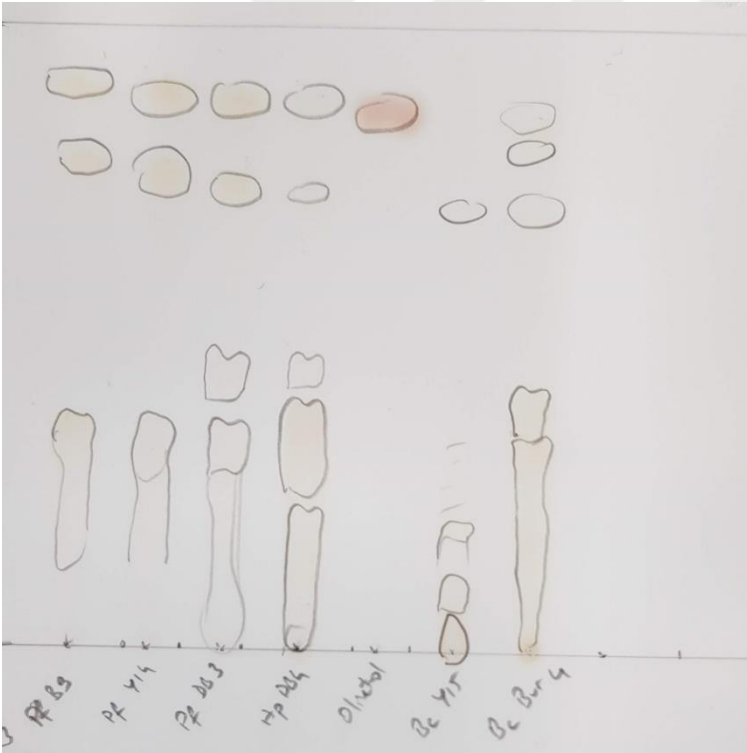
Analiz sonuçlarına göre, monitör suşlarda düşük konsantrasyonlarda dahi QS inhibisyonu gözlenen *P. furfuracea* türünden “atranorin” ve *B. capillaris* türünden “psoromik asit” izole edilmesi kararlaştırılmıştır. İzolasyon için en uygun çözücü karışımını belirlemek üzere gerçekleştirilmiş olan TLC sonuçları **Şekil 3.14-16**'da gösterilmiştir.



Şekil 3.14. Kloroform-metanol (9:1) çözeltisi ile TLC’de yürütülen özütler. (Pf: *P. furfuracea*, Hp: *H. pysodes*, Bc: *B. capillaris*)



Şekil 3.15. N-hekzan-etil asetat (9:1) çözeltisi ile TLC’de yürütülen özütler. (Pf: *P. furfuracea*, Hp: *H. pysodes*, Bc: *B. capillaris*)

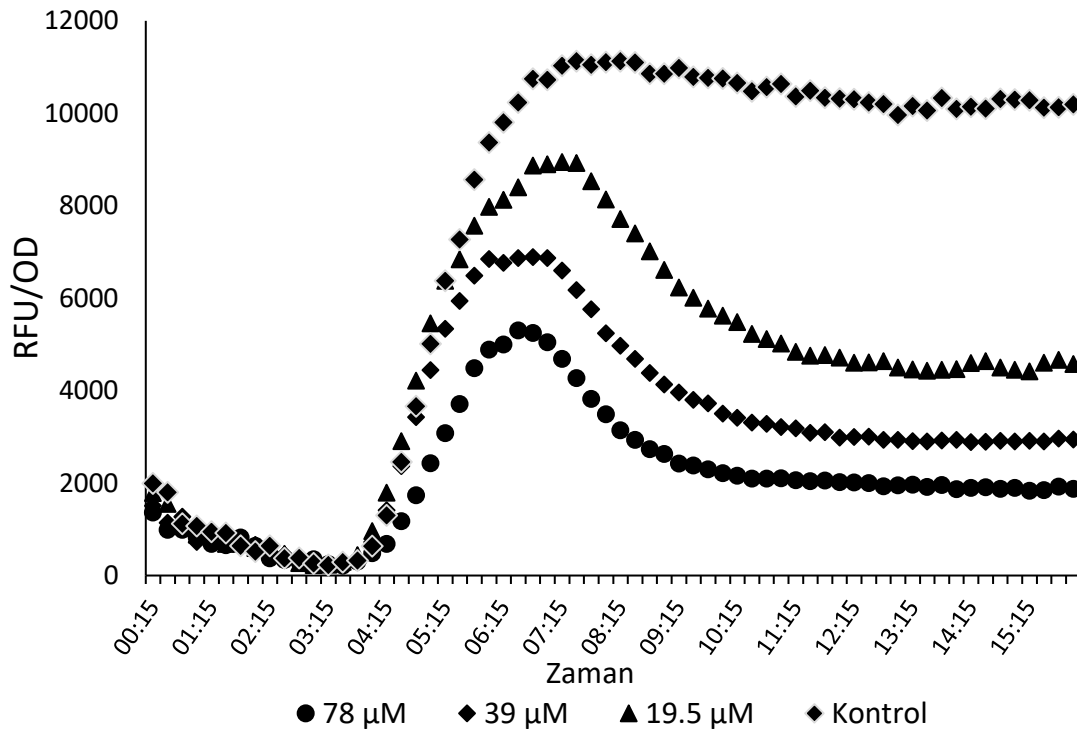


Şekil 3.16. Etil asetat-metanol (9:1) çözeltisi ile TLC’de yürütülen özütler. (Pf: *P. furfuracea*, Hp: *H. pysodes*, Bc: *B. capillaris*)

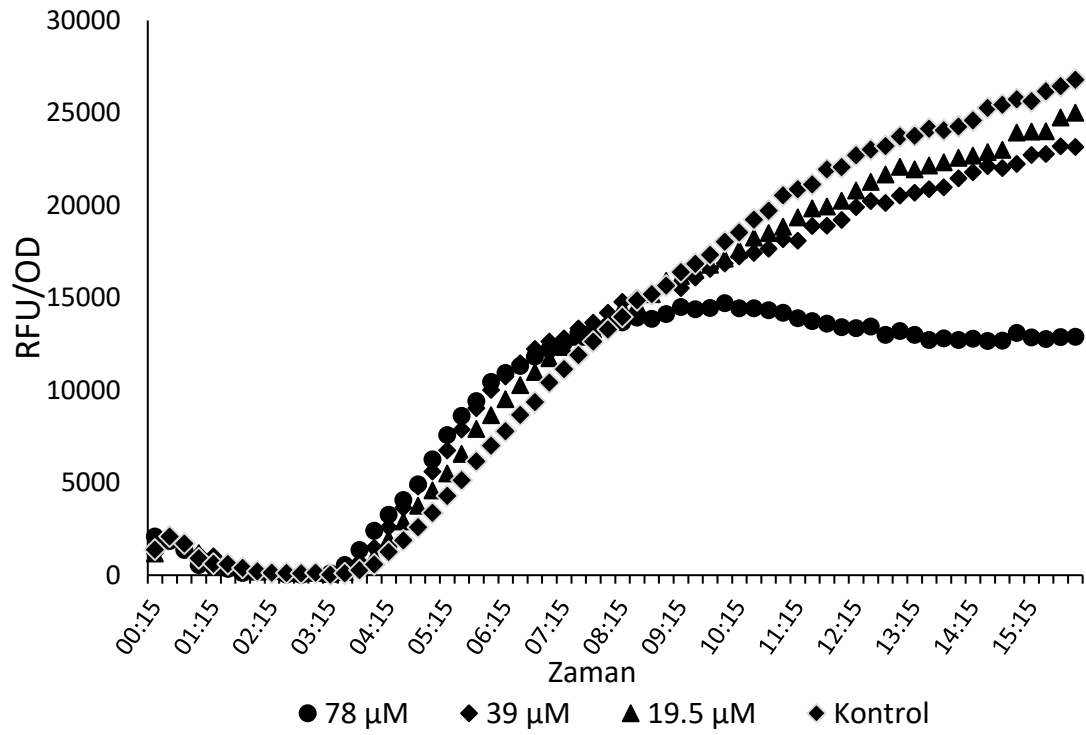
TLC sonuçlarına göre fraksiyonlamada kullanılacak uygun çözücü etil asetat-metanol (9:1) olarak belirlenmiştir. Özütlar bu çözücü ile silika kolon kullanılarak iki defa fraksiyonlarına ayrılmıştır. Atranorin bulunan fraksiyonların çözücüleri uçurularak metabolitleri saflaştırmak üzere bu sefer preperatif HPLC ile tekrar fraksiyonlandırılmıştır. Metabolit daha sonra çözücülerinden uzaklaştırılarak toz halde elde edilmiştir. *Bryoria* özütlarının yetersizliği sebebiyle psoromik asit ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.7. Metabolitlerin *P. aeruginosa* monitör suşları üzerinde QSI özellikleri

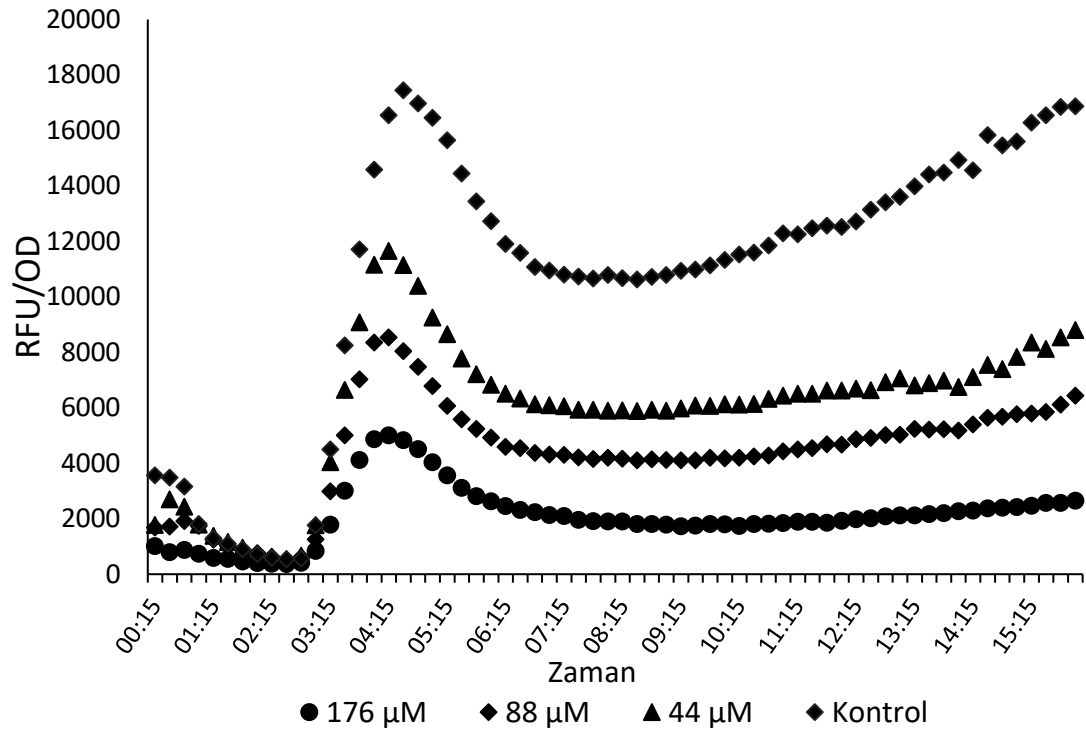
Pseudevernia ve *Cladonia* cinslerinde yaygın olarak rastlanan atranorin ve *Bryoria* cinsinde bulunan psoromik asit metabolitleri DMSO ile çözüldükten sonra FTS ile seyreltilmiştir. Psoromik asit 78, 93 ve 19,5 μM ve atranorin 176, 88 ve 44 μM son konsantrasyonları elde edilecek şekilde monitör suşlara uygulanmıştır. Metabolitlerin *las* ve *rhl* sistemlerine ait QS inhibisyon grafikleri Şekil 3.17-3.20’de verilmiştir.



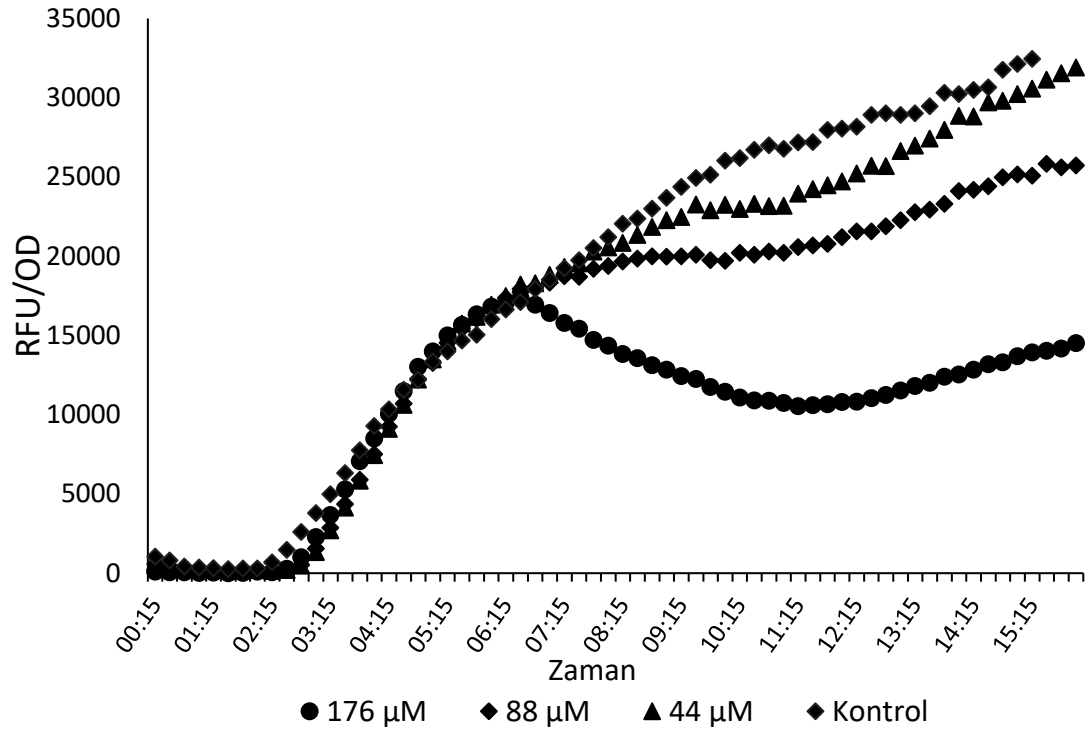
Şekil 3.17. Psoromik asit uygulamasına ait *las* sistemi inhibisyon grafiği.



Şekil 3.18. Psoromik asit uygulamasına ait *rhl* sistemi inhibisyon grafiği.



Şekil 3.19. Atranorin uygulamasına ait *las* sistemi inhibisyon grafiği.

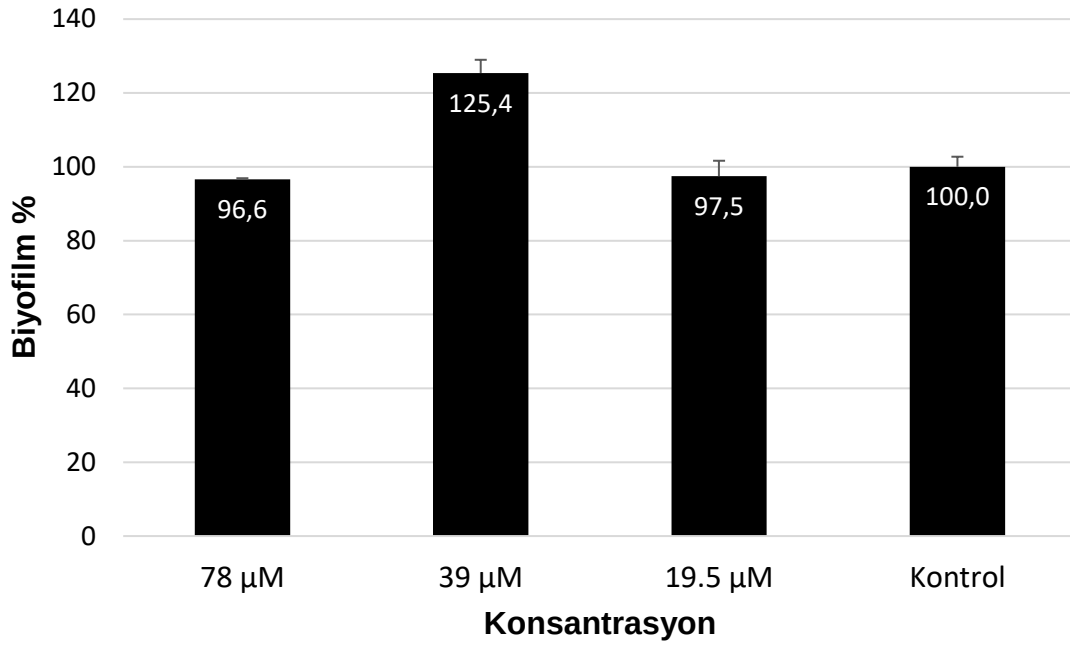


Şekil 3.20. Atranorin uygulamasına ait *rhl* sistemi inhibisyon grafiği.

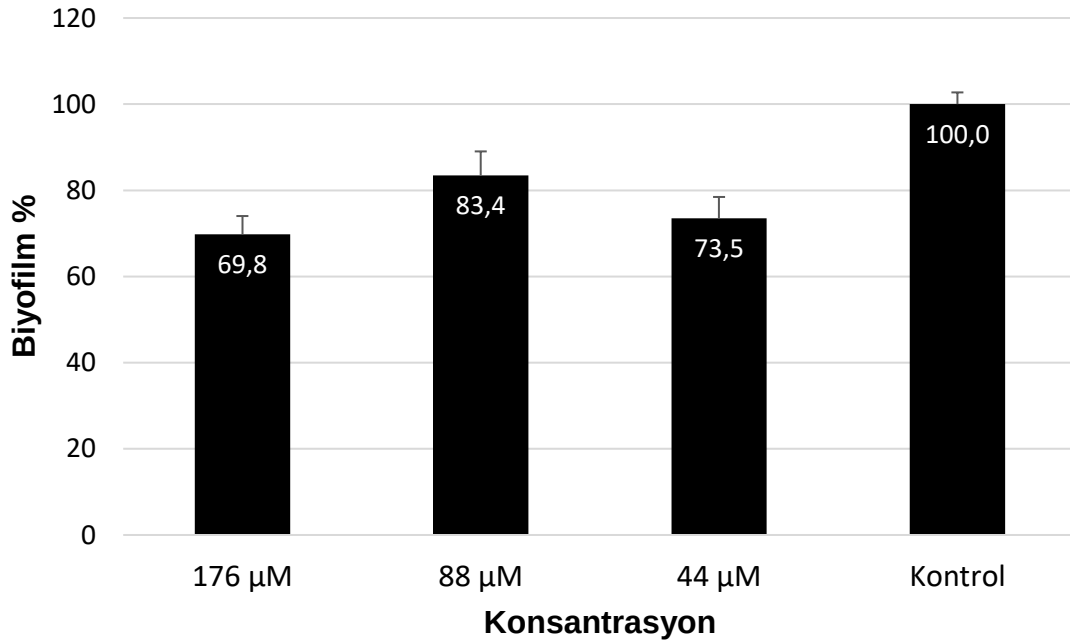
Suşların stabil faz sırasında hesaplanan RFU/OD verilerine göre, psoromik asitin (78 µM) *las* ve *rhl* sistemlerini yaklaşık olarak sırasıyla %80 ve %52 oranlarında; atranorinin (176 µM) ise %84 ve %60 oranlarında inhibe ettiği hesaplanmıştır.

3.1.8. Metabolitlerin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde biyofilm inhibisyonu

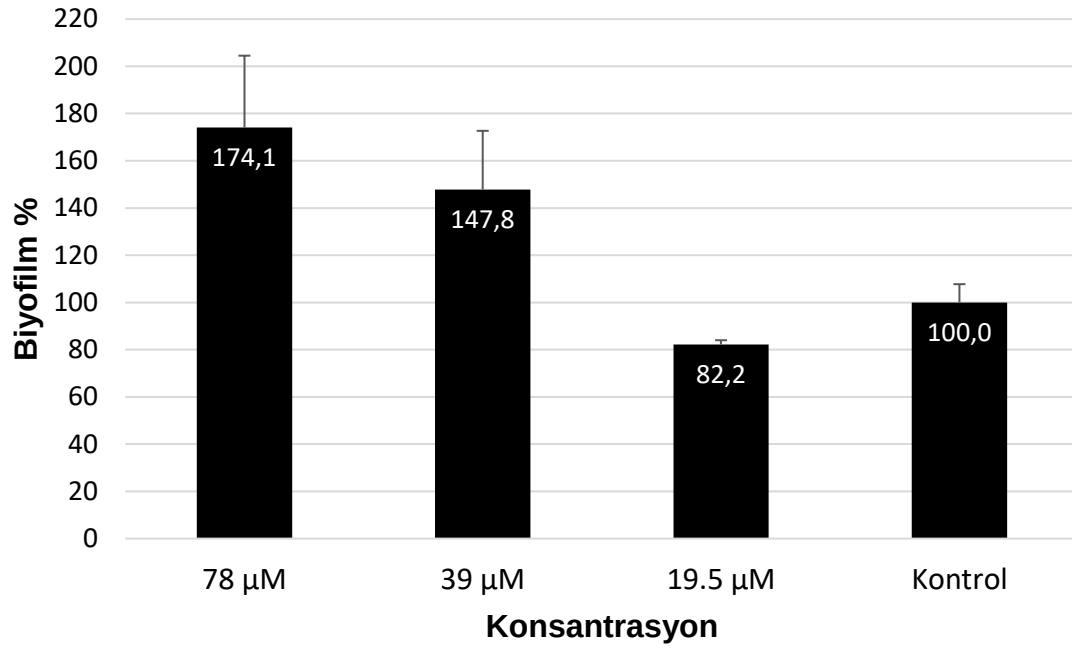
P. aeruginosa PAO1 referans ve klinik izolat suşlarına uygulanmak üzere seçilen atranorin ve psoromik asit metabolitleri, QS inhibisyon deneylerinde kullanıldıkları konsantrasyonlarda kullanılmışlardır. Uygulama sonrası kristal viyole ile boyama sonucunda hesaplanan biyofilm kütleleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve yüzde grafikleri Şekil 3.21-24'te verilmiştir.



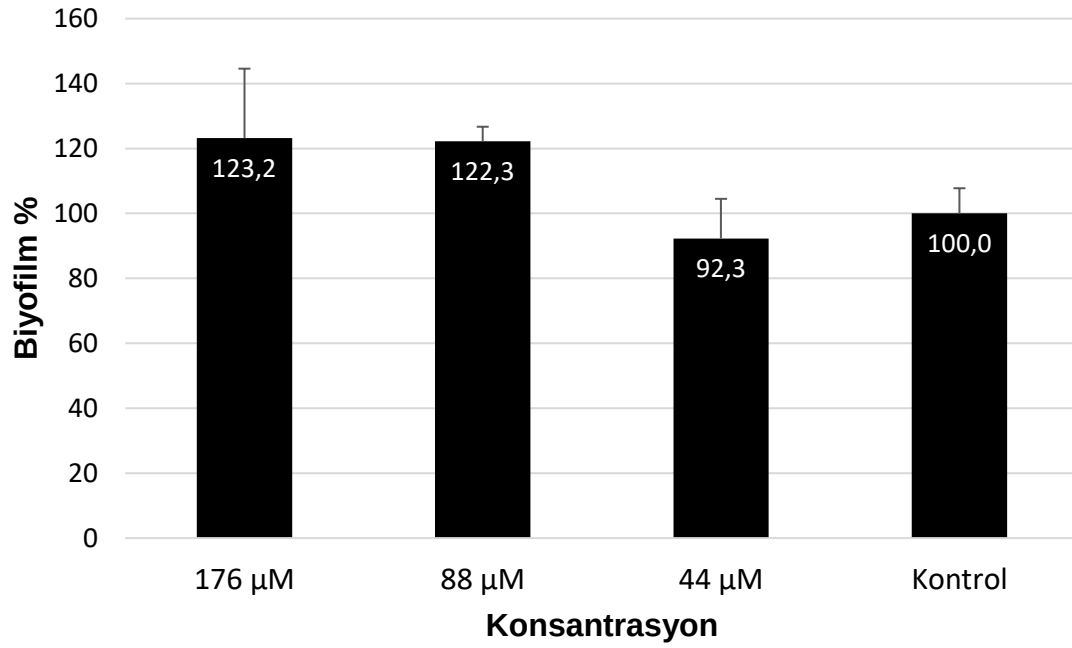
Şekil 3.21. *P. aeruginosa* PAO1 suşunda psoromik asit uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.



Şekil 3.22. *P. aeruginosa* PAO1 suşunda atranorin uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.



Şekil 3.23. *P. aeruginosa* klinik izolatında psoromik asit uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.



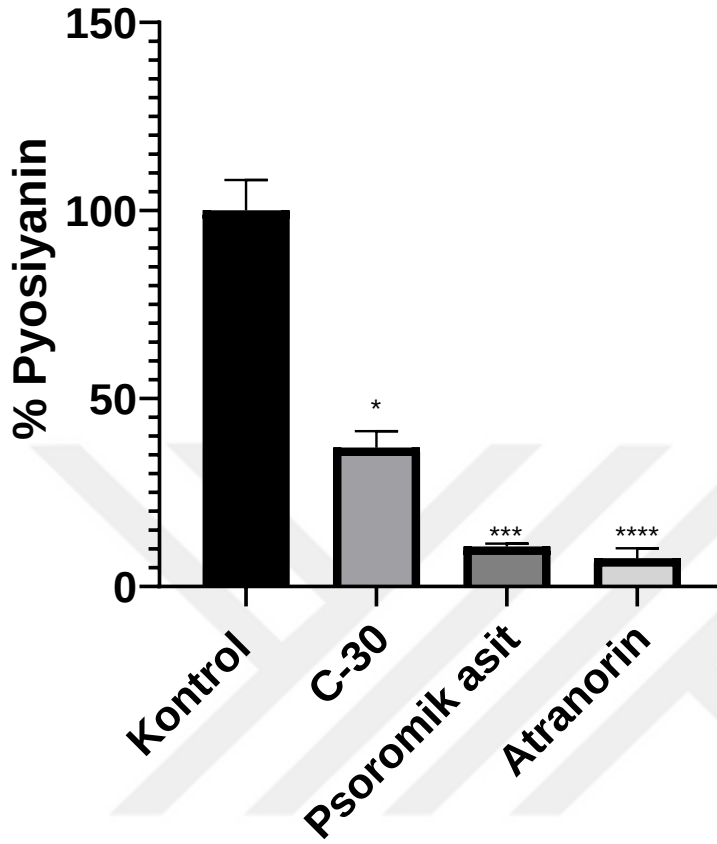
Şekil 3.24. *P. aeruginosa* klinik izolatında atranorin uygulamasına ait biyofilm yüzdeleri.

Sonuçlara göre, PAO1 referans suşu için atranorin 176 μ M konsantrasyonunda %30,17 $\pm$ 4,21 oranında biyofilm inhibisyonu göstermiştir. Uygulanan psoromik asit konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyonuna rastlanmamıştır. Klinik izolatlara yapılan uygulamada ise psoromik asit 19,5 μ M konsantrasyonunda %17,78 $\pm$ 2,56 kadar inhibisyon gösterirken atranorin için anlamlı bir inhibisyon gözlenmemiştir.

3.1.9. Virölans analizleri

Psoromik asit 78 μ M ve atranorin 176 μ M son konsantrasyonları elde edilecek şekilde en yüksek QS inhibisyonunun elde edildiği dozlar PAO1 suşuna uygulanmıştır. Sonuçlar, uygulama yapılmamış kontrol grupları ve C-30 furanon 25 μ M uygulanmış pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılarak % miktar olarak grafik haline getirilmiştir (Şekil 3.25-27).

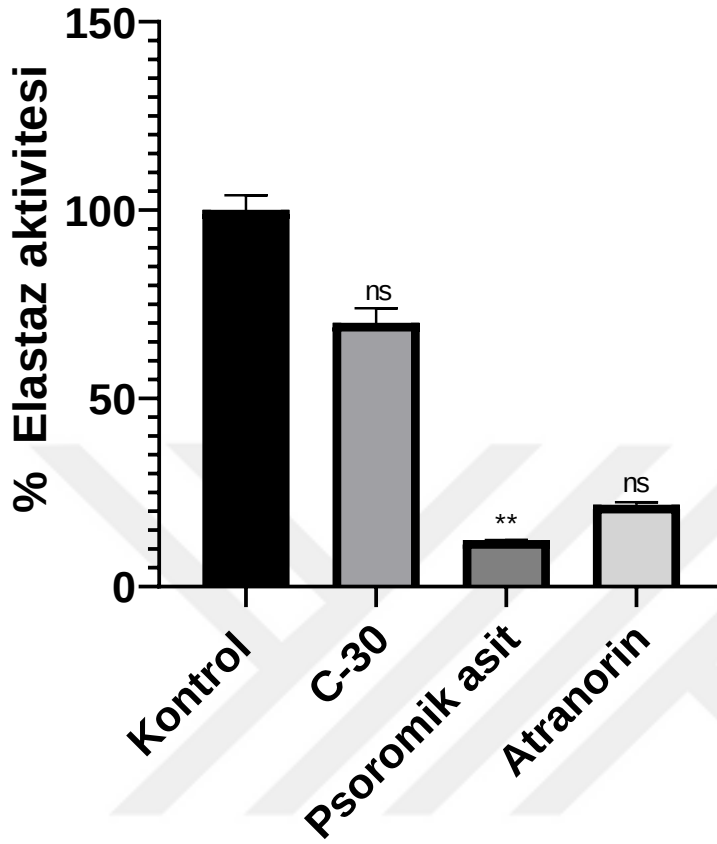
3.1.9.1. Piyosiyanin üretimi



Şekil 3.25. Uygulanan metabolitlerin kontrol grubuna göre % piyosiyanin üretimleri.

Analiz sonuçlarına göre, C-30, psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin PAO1 suşunda piyosiyanin üretimini sırasıyla %63,1 ± 4,4, %89,4 ± 0,8 ve %92,5 ± 2,7 oranlarında inhibe ettikleri belirlenmiştir.

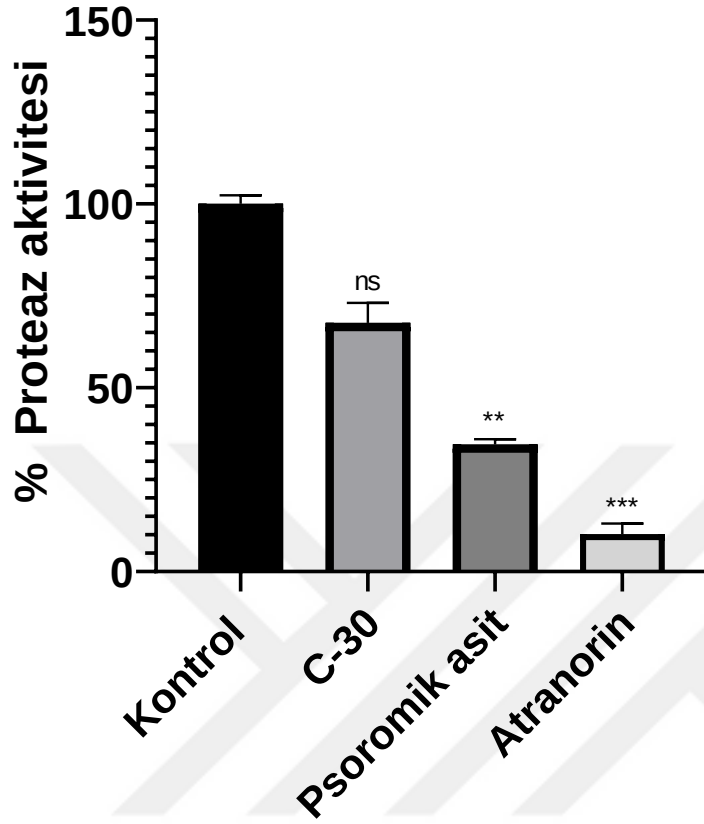
3.1.9.2. Elastaz analizi



Şekil 3.26. Uygulanan metabolitlerin kontrol grubuna göre % elastaz aktiviteleri.

Analiz sonuçlarına göre, C-30, psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin PAO1 suşunda elastaz aktivitesini sırasıyla $30 \pm 3,9$, $87,7 \pm 0,1$ ve $78,3 \pm 0,7$ oranlarında inhibe ettikleri belirlenmiştir.

3.1.9.3. Proteaz analizi

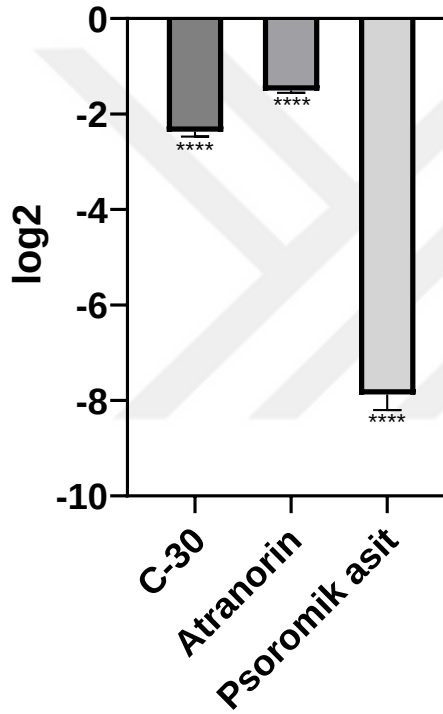


Şekil 3.27. Uygulanan metabolitlerin kontrol grubuna göre % proteaz aktiviteleri.

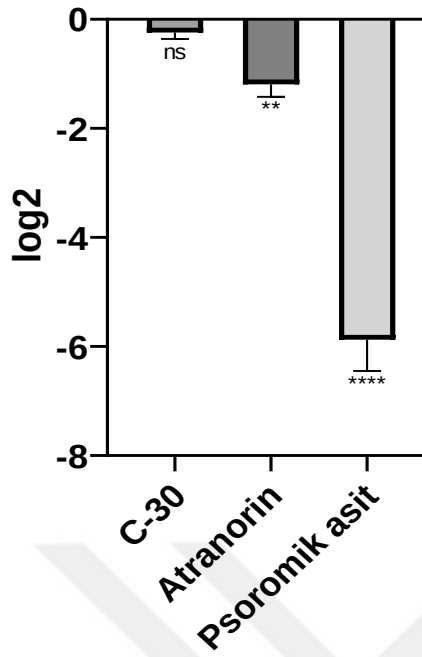
Analiz sonuçlarına göre, C-30, psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin PAO1 suşunda proteaz aktivitesini sırasıyla $32,4 \pm 5,5$, $65,4 \pm 1,4$ ve $89,8 \pm 2,8$ oranlarında inhibe ettikleri belirlenmiştir.

3.1.10. QS bağlantılı virölans gen ekspresyonu inhibisyonları

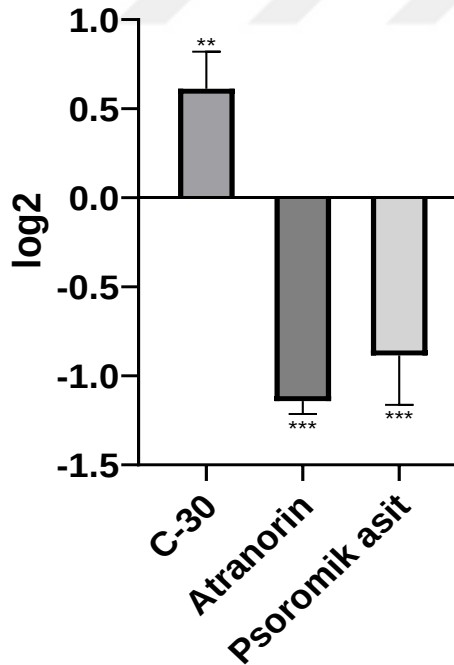
LightCycler 96 (Roche-Almanya) gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılarak yapılan çalışmada *lasB*, *rhlA* ve *pqsA* gen ekspresyonları *rpoD* geni referans alınarak incelenmiş, Cq değerleri analiz edilerek gen ekspresyon oranları PZR verimliliği göz önüne alınarak hesaplanmıştır. Psoromik asit 78 μ M, atranorin 176 μ M ve pozitif kontrol olarak C-30 25 μ M konsantrasyonlarında uygulama yapılan örneklerle ait gen ekspresyonlarındaki değişimler uygulama yapılmamış kontrole göre hesaplanmış ve log2 tabanında görselleştirilmiştir (Şekil 3.28-3.30).



Şekil 3.28. PAO1 suşuna uygulanan metabolitlerin *las* QS sistemi ile regüle edilen *lasB* gen ekspresyonuna etkisi. Psoromik asit 78 μ M, atranorin 176 μ M ve pozitif kontrol olarak C-30 25 μ M konsantrasyonlarında uygulanmıştır.



Şekil 3.29. PAO1 suşuna uygulanan metabolitlerin *rhl* QS sistemi ile regüle edilen *rhlA* gen ekspresyonuna etkisi. Psoromik asit 78 μ M, atranorin 176 μ M ve pozitif kontrol olarak C-30 25 μ M konsantrasyonlarında uygulanmıştır.

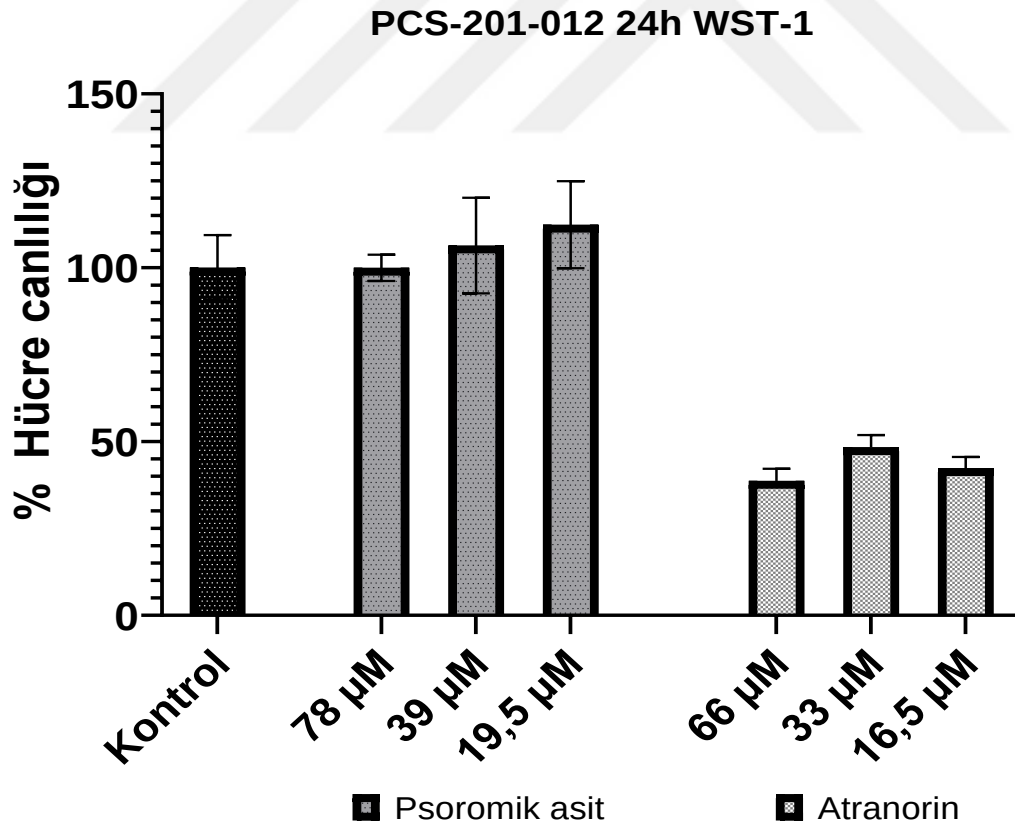


Şekil 3.30. PAO1 suşuna uygulanan metabolitlerin *pqs* QS sistemi ile regüle edilen *pqsA* gen ekspresyonuna etkisi. Psoromik asit 78 μ M, atranorin 176 μ M ve pozitif kontrol olarak C-30 25 μ M konsantrasyonlarında uygulanmıştır.

Sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan C-30 ve likenlerden elde edilen atranorin ve psoromik asit metabolitlerinin *las* sistemini sırasıyla $-2,37 \pm 0,1$, $-1,51 \pm 0,04$ ve $-7,87 \pm 0,32$ log değerlerinde aşağı-regüle ettikleri gözlenmiştir. Aynı sıra ile *rhl* sistemi için $-0,24 \pm 0,11$, $-1,19 \pm 0,23$ ve $-5,87 \pm 0,57$ aşağı-regüle ettikleri belirlenmiştir. *pqs* sistemi için C-30 furanon $0,61 \pm 0,2$ yukarı-regülasyon gösterirken, atranorin ve psoromik asit $-1,14 \pm 0,07$ ve $-0,88 \pm 0,27$ aşağı-regülasyon göstermiştir.

3.1.11. Metabolitlerin hücre kültürü yöntemi ile toksik etkilerinin araştırılması

PCS-201-012 (İnsan Dermal Fibroblast Hücre Hattı) ile gerçekleştirilen *in vitro* biyoyoumluluk testlerine göre psoromik asit $78 \mu\text{M}$ ve atranorin $176 \mu\text{M}$ metabolitlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 3.33'te gösterilmiştir. Sonuçlara göre psoromik asitin hücre canlılığına anlamlı bir etkisi yokken, atranorinin tüm dozlarının %50'den fazla inhibisyon gösterdiği gözlemlenmiştir.

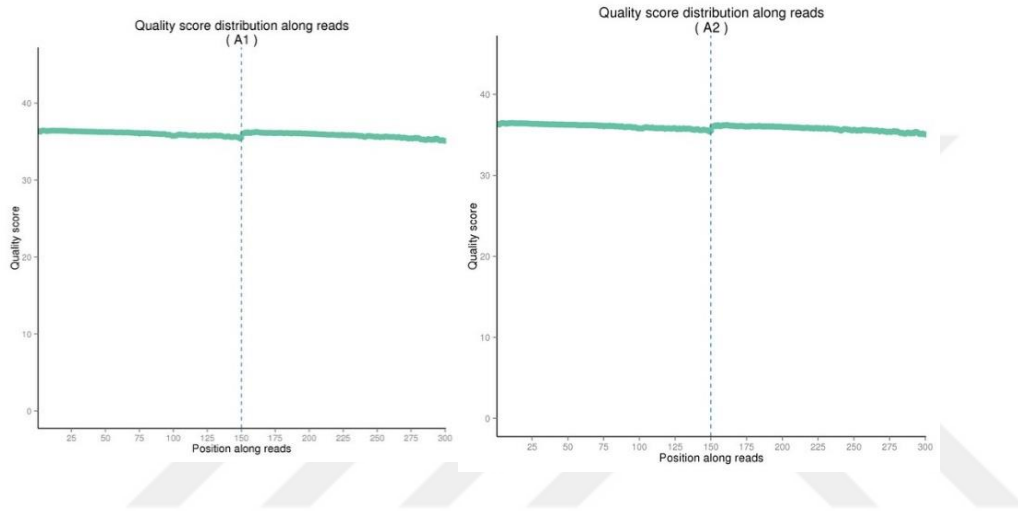


Şekil 3.31. Psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin PCS-201-012 hücre hattında farklı konsantrasyonlardaki uygulamaları sonucu hücre canlılığı yüzdeleri.

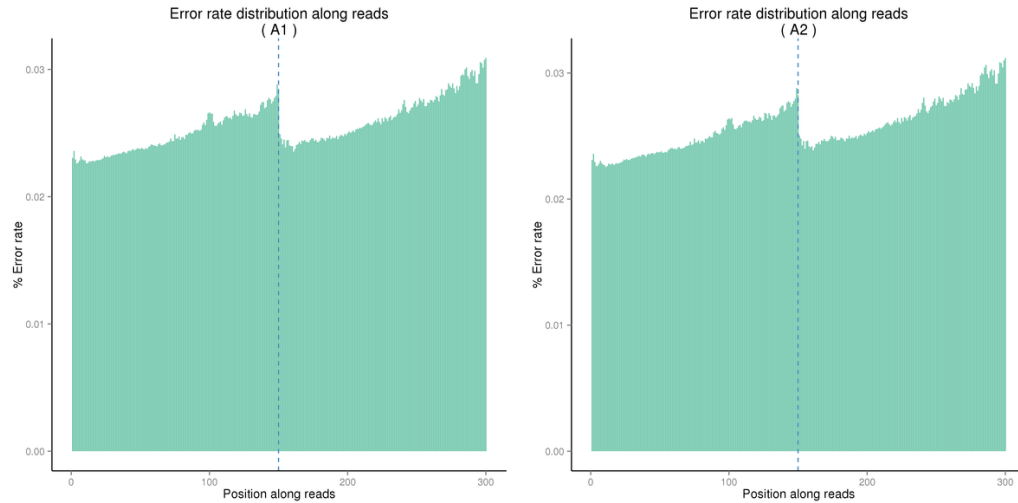
3.1.12. Yeni-nesil RNA sekanslama ve transkriptomik analizler

P. aeruginosa transkriptomunda meydana getirdiği tüm değişikliklerin araştırılması için *Bryoria sp.* liken örneklerinde tespit edilen psoromik asit metaboliti seçilmiştir. 78 μ M konsantrasyonunda uygulama yapılmış ve yapılmamış bakterilerden izole edilen RNA örnekleri Illumina™ Novaseq 6000 platformunda sekanslanmıştır.

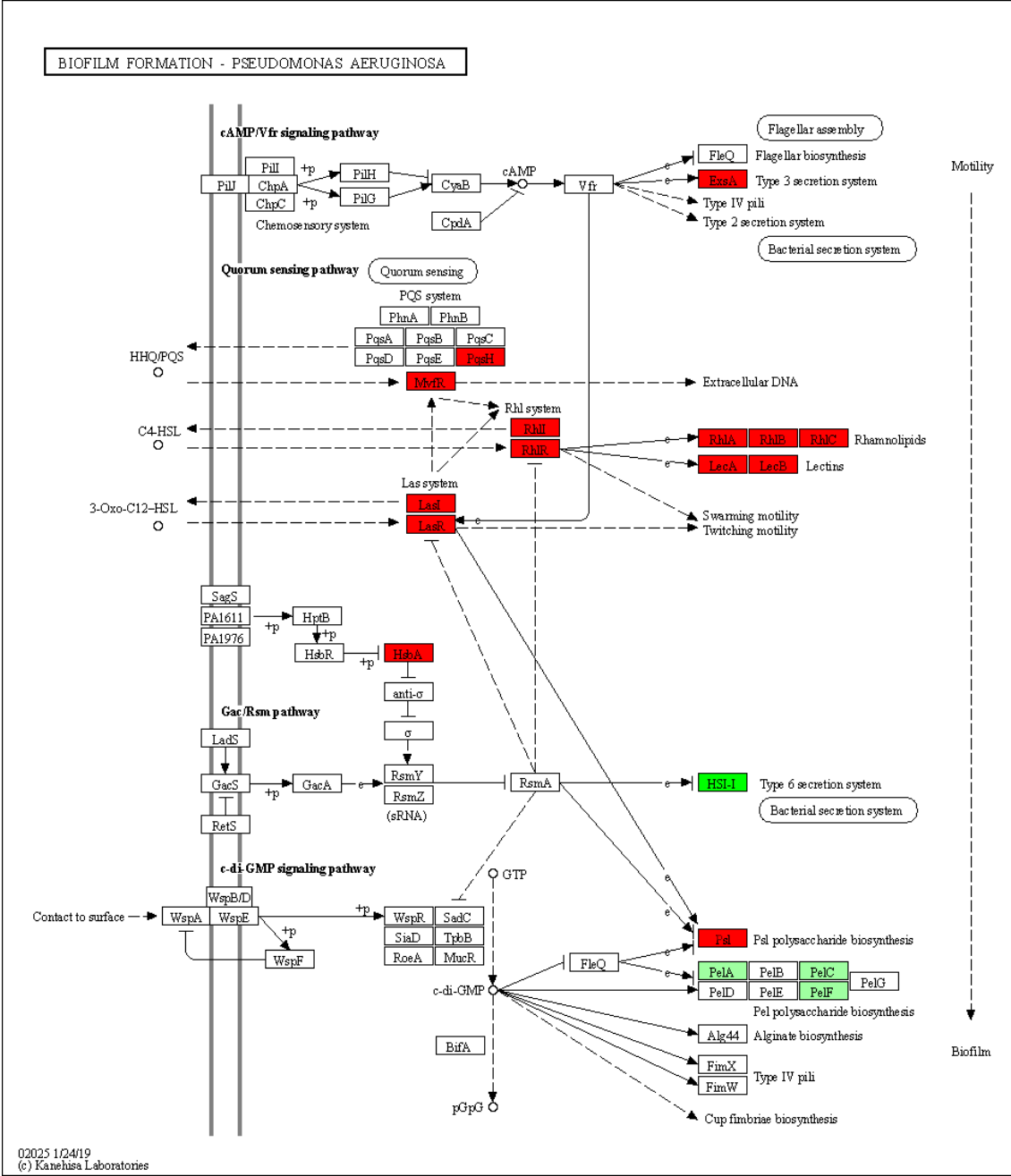
3.1.12.1. Yeni-nesil sekanslama okumalarının kalite bulguları



Şekil 3.32. Sekansların kalite skorları (Q-score). Dikey ekseninde kalite skorları ve yatay ekseninde baz pozisyonları gösterilmiştir. A1: Kontrol, A2: Psoromik asit



Şekil 3.33. Sekansların baz hata oranları. Dikey ekseninde tek baz okuma hata oranları ve yatay ekseninde baz pozisyonları gösterilmiştir. A1: Kontrol, A2: Psoromik asit



Şekil 3.35. Psoromik asit uygulaması sonucu *P. aeruginosa* biyofilm yollarında regülasyonu değişen faktörler. Kırmızı renk aşağı-regülasyonu, yeşil renk ise yukarı-regülasyonu ifade etmektedir.

Tablo 3.7. Gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile aşağı-regülasyona uğrayan genlerin KEGG veritabanına göre ait oldukları metabolik yollar.

Zenginleştirme Hatalı Keşif Oranı	Regülasyonu değişen genler	Toplam gen	Fonksiyonel kategori
5.5E-23	78	778	Metabolik yollar
4.3E-21	46	296	Farklı ortamlarda mikrobiyal metabolizma
5.6E-15	41	338	Sekonder metabolitlerin biyosentezi
3.9E-13	16	47	Valin, lösin ve izölösün yıkımı
9.0E-11	12	31	Benzoat bozulması
2.7E-10	13	42	Butanoat metabolizması
8.3E-10	24	184	ABC taşıyıcıları
2.1E-09	6	6	Siderofor grubu ribozomal olmayan peptidlerin biyosentezi
3.0E-09	12	42	Propanoat metabolizması
1.1E-08	6	7	Florobenzoat bozunması
2.0E-08	13	60	Piruvat metabolizması
2.2E-08	9	24	Geraniol bozulması
1.4E-07	17	126	Karbon metabolizması
2.3E-07	6	10	Keton cisimlerinin sentezi ve bozulması
1.1E-06	8	27	Triptofan metabolizması
1.4E-06	8	28	Tirozin metabolizması
1.5E-06	10	49	Glisin, serin ve treonin metabolizması
1.3E-05	6	18	Lizin degradasyonu
1.3E-05	7	27	Aromatik bileşiklerin bozulması
2.2E-05	5	12	Stiren bozulması
3.9E-05	7	32	Yağ asidi bozunması
4.2E-05	3	3	Toluen bozunması
4.5E-05	8	45	Bakteriyel kemotaksis

8.0E-05	6	25	Histidin metabolizması
8.8E-05	7	37	Glikoliz / Glukoneogenez
8.8E-05	8	50	Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması
1.3E-04	3	4	Ksilen degradasyonu
1.6E-04	8	55	Oksidatif fosforilasyon
1.9E-04	5	19	Aminobenzoat bozunması
1.9E-04	6	30	Fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi
2.9E-04	3	5	Klorosikloheksan ve klorobenzen bozunması
3.4E-04	7	47	Yağ asidi metabolizması
3.6E-04	6	34	Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)
7.8E-04	5	26	Fenilalanin metabolizması
2.0E-03	3	9	Limonen ve pinen bozunması
5.5E-03	4	25	beta-Alanin metabolizması
8.2E-03	10	148	Amino asitlerin biyosentezi
8.8E-03	2	5	Novobiocin biyosentezi
1.0E-02	3	16	Ubiquinone ve diğer terpenoid-kinon biyosentezi
1.0E-02	3	16	Terpenoid omurga biyosentezi
1.1E-02	11	181	İkili bileşen sistemi
1.6E-02	2	7	İnositol fosfat metabolizması
1.8E-02	3	20	Valin, lösin ve izölösin biyosentezi
2.0E-02	2	8	Kaprolaktam bozulması
3.1E-02	3	25	Metan metabolizması

Psoromik asit uygulaması sonucunda regülasyonu artan genler de tespit edilmiştir. Bu genler KEGG veritabanı ile karşılaştırıldığında çoğunlukla bakterinin hayatsal fonksiyonları ile ilgili metabolizmalarına ait oldukları belirlenmiştir (**Tablo 3.8**).

Tablo 3.8. Gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile yukarı-regülasyona uğrayan genlerin KEGG veritabanına göre ait oldukları metabolik yollar.

Zenginleştirme Hatalı Keşif Oranı	Regülasyonu değişen genler	Toplam gen	Fonksiyonel kategori
6.2E-23	31	88	Bakteriyel salgı sistemi
2.5E-11	15	42	Porfirin ve klorofil metabolizması
6.0E-11	36	296	Farklı ortamlarda mikrobiyal metabolizma
2.1E-10	62	778	Metabolik yollar
9.7E-09	12	38	Azot metabolizması
1.4E-07	23	184	ABC taşıyıcıları
1.8E-06	21	181	İkili bileşen sistemleri
1.0E-03	5	18	Fruktoz ve mannoz metabolizması
1.3E-03	4	11	Fosfonat ve fosfinat metabolizması
1.8E-03	5	21	Biyotin metabolizması
3.0E-03	4	14	C5-Dallı dibazik asit metabolizması
3.5E-03	2	2	Nitrotoluen bozunması
3.5E-03	7	51	Kükürt metabolizması
3.6E-03	5	26	Fenilalanin metabolizması
7.6E-03	4	19	Aminobenzoat bozunması
1.5E-02	4	23	Yağ asidi biyosentezi
1.9E-02	7	72	Arginin ve prolin metabolizması
2.2E-02	2	5	Bisfenol bozunması

2.2E-02	2	5	Fosfotransferaz sistemi (PTS)
3.5E-02	5	47	Yağ asidi metabolizması
3.7E-02	3	18	Nikotinat ve nikotinamid metabolizması

3.1.13. İstatiksel analizler

Özütler için Bursa-Uludağ Alaçam bölgesinden ikinci istasyondan toplanan *P. submontana* türü ile yine ikinci bölgeden toplanılan *P. sulcata* özütlerinin 60 ve 120 µg/ml dozları karşılaştırıldığında türler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,05$). Bursa-Uludağ Alaçam bölgesinden ikinci istasyondan toplanan *P. submontana* türü ile Bolu-Mudurnu ve Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *P. furfuracea* türlerinin sadece 60 ve 120 µg/ml dozları karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuca rastlanılırken ($p<0,05$), Bursa Alaçam ikinci istasyondan toplanılan *P. furfuracea* türünde ise 30, 60 ve 120 µg/ml dozlarında anlamlı bir farka rastlanılmıştır ($p<0,05$). Türler arasında biyoaktivite yönünden istatistiksel olarak fark olmasada uygulanan dozlar arasında fark gözlenmesi düşük oranda da olsa bölgesel farkın olabileceğini göstermektedir. Aynı durum Bolu-Aladağlar ve Bursa-Uludağ Alaçam birinci istasyonundan toplanan *H. tubulosa* ile tür için de gözlenmiştir. *rhl* sistemi sonuçları dikkate alındığında ise 120 µg/ml doz uygulamalarında Bursa Uludağ-Alaçam bölgesinden toplanan *H. tubulosa* türünün toplandıkları lokaliteye göre istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç verdiği gözlenmiştir ($p<0,05$). Toplanan liken türlerinin aseton özütlerinin *P. aeruginosa* las QS sistemi üzerine etkileri biyolojik aktivite etkileri karşılaştırıldığında *P. furfuracea* 'nın Bolu-Mudurnu, Bolu-Aladağlar ve Bursa Uludağ-Alaçam bölgesinden toplanan örneklerin aseton özütleri arasında bölgesel açıdan herhangi bir istatistiksel anlamlılığa rastlanılmamıştır ($p>0,05$). Aynı şekilde Bolu-Aladağlar ve Bursa- Uludağ Alaçam bölgelerinden toplanılan *H. tubulosa* türleri arasında da biyolojik aktivite bakımından istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılığa rastlanılmamıştır ($p>0,05$). Atranorin ve psoromik asit saf moleküllerinin *P. aeruginosa* las QS sistemi üzerine etkileri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı inhibisyona sahip oldukları ($p<0,05$) saptanmıştır.

Biyofilm inhibisyonu deneylerinde, sadece en yüksek konsantrasyonlardaki uygulamalar için istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). Virölans analizlerinde piyosiyanin üretimi için, uygulama yapılan örneklerin kontrol grubuna göre anlamlılıkları C-30 için $p<0,05$, psoromik asit için $p<0.001$ ve atranorin için $p<0.0001$ olarak belirlenmiştir. Elastaz aktivitesi incelendiğinde C-30, psoromik asit ve atranorin için p değerleri sırasıyla $p>0.05$, $p<0.01$ ve $p>0.05$ olarak elde edilmiştir. Aynı sırayla proteaz aktivitesinde $p>0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ olarak p değerleri hesaplanmıştır.

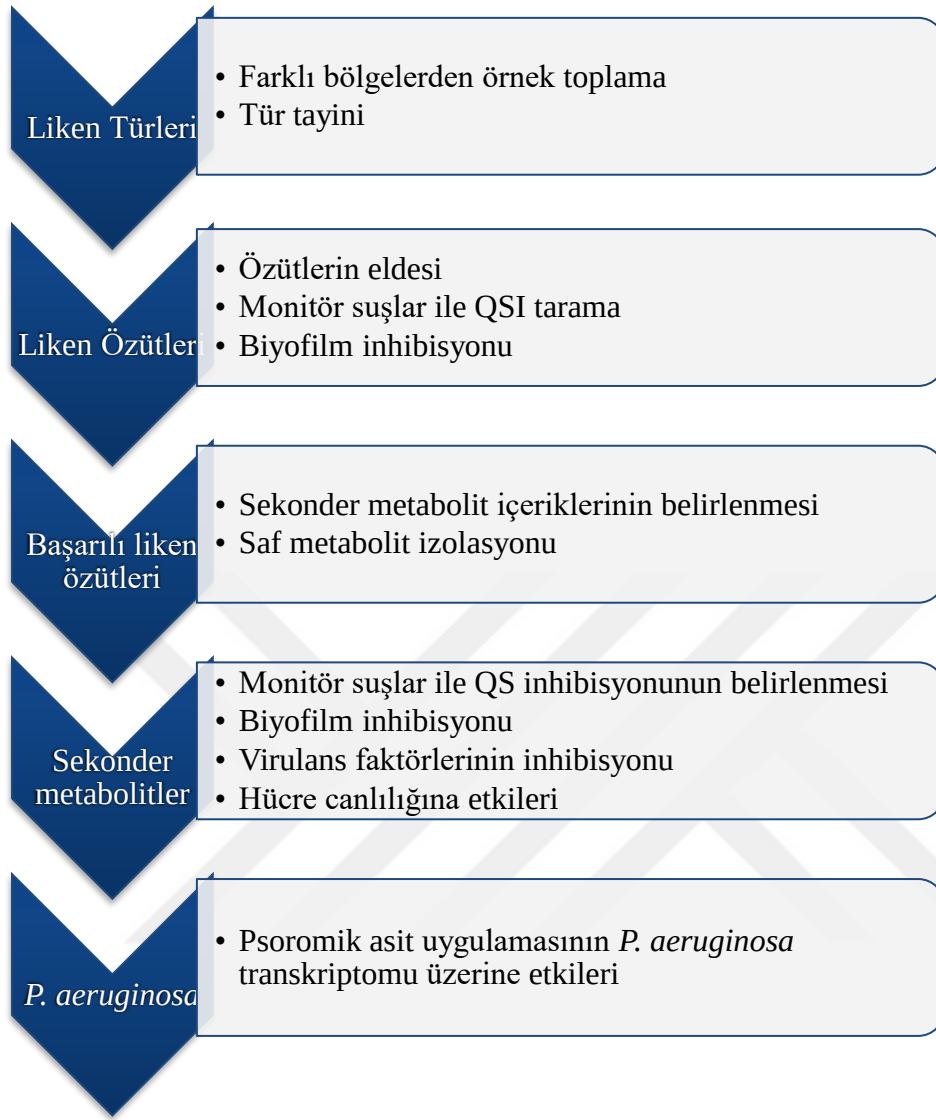
kRT-PZR deneylerinde C-30, psoromik asit ve atranorin uygulaması yapılan grupların verileri kontrol ile karşılaştırıldığında *lasB* için tüm örneklerde çok yüksek anlamlılık belirlenmiştir ($p<0,0001$). *rhIA* için C-30: $p>0.05$, atranorin: $p<0.01$ ve psoromik asit: $p<0.0001$; *pqsA* için ise C-30: $p<0.01$, atranorin: $p<0.001$ ve psoromik asit: $p<0.001$ olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Hücre canlılığı deneyleri için psoromik asit uygulamasının kontrole göre anlamlı bir farkı olmadığı, atranorin uygulaması için ise anlamlı bir inhibisyon gerçekleştiği belirlenmiştir ($p<0.0001$).

3.2. Tartışma

P. aeruginosa, bitki, nematod, böcek ve memeliler dahil olmak üzere pek çok konakta hastalıklara sebebiyet verebilmektedir (Diggle ve Whiteley, 2020). İnsanlarda, özellikle KF hastalarında, MDR *P. aeruginosa* klinik enfeksiyonları yüksek mortaliteye neden olmaktadır (Elborn, 2019). Günümüzde, *P. aeruginosa* da dahil olmak üzere MDR bakterilere karşı mücadelede yeni antibiyotik keşfi yanı sıra, alternatif olarak bakterileri öldürmeden etkisiz ve savunmasız hale getirmeyi hedefleyen anti-virülans yaklaşımlar önem kazanmaktadır (Kothari, 2019). Bakterilerin bir popülasyon içerisinde virülans faktörlerini toplu olarak kontrol etmelerini düzenleyen ve dolayısıyla patojenitelerinde önemli rol oynayan QS sistemlerinin inhibisyonu, anti-virülans yöntemler arasında önemli bir yer kaplamaktadır (Li ve ark., 2016). Bu amaçla fitokimyasallar gibi doğal metabolitler ile pek çok araştırma yapılmakta ve bakteri türleri üzerinde etkili QS inhibitörleri keşfedilmeye çalışılmaktadır. QQ etkisine sahip pek çok doğal metabolit literatürde yer almaktadır (Gökalsın ve ark., 2019). Ancak bazı QS inhibitörü metabolitlerin biyofilmleri kontrol etmedeki mekanizmaları hala belirsizdir ve etkili olduğu bilinen çoğu QS inhibitörünün toksik etkileri olduğu bilinmektedir (Zhou ve ark., 2020). Bunun yanı sıra, QS inhibisyonu ile ilgili çok az çalışmada inhibitörün ilgili bakterinin transkriptomu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmanın amacı, zengin sekonder metabolit içeriğe sahip olan likenlerden *P. aeruginosa* QS sistemleri üzerinde inhibitör etkiye sahip metabolitlerin belirlenerek izole edilmesi ve bu metabolitlerin *P. aeruginosa* transkriptomu üzerindeki tüm regülasyon etkilerinin incelenerek QS inhibisyonu mekanizmalarının açığa çıkarılmasıdır.



Şekil 3.36. Tez çalışmasına ait iş akışının görsel özeti.

3.2.1. Liken örneklerinin toplanılması ve özüt eldesi

Temel olarak mikobiyont (fungi) ve fotobiyont (alg yada siyanobakteri) ortak yaşamı ile var olan liken tallusları bir organizmadan ziyade karmaşık ekosistemler olarak kabul edilmektedir (Lumbsch, 1998). Likenlerin çok geniş çeşitlilikte sekonder metabolit üretimine sahip oldukları bilinmektedir (Turk ve ark., 2003). Fungi partneri tarafından üretilen liken sekonder metabolitleri, patojenler, UV ışığı, hava akımı ve oksidatif stres gibi aşırı koşullara karşı koruma sağlamaktadır (Ranković ve Kosanić, 2019). Liken sekonder metabolitleri, çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyebilmekte ve bu özellikleri ile önemli farmasötik potansiyele sahiptirler (Molnár ve Farkas, 2010). Dolayısıyla, bu

çalışmada likenlerin *P. aeruginosa* QS sistemleri üzerindeki olası inhibisyonu özellikleri araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında Bursa-Alaçam, Bolu-Aladağlar, Bolu-Yedigöller ve Bolu-Mudurnu bölgelerinden, özütleri çıkarılmak üzere taze liken örnekleri toplanmıştır. Toplanan liken örnekleri teşhis edildikten sonra fonksiyonel olarak çeşitli özelliklerde metabolitler elde edilmesi için aseton özütleri çıkarılmış ve toz halde saklanmışlardır. *P. aeruginosa* üzerindeki QQ etkilerinin incelenebilmesi için öncelikle organik çözücü olan DMSO ile çözülmüşlerdir. Bu aşamada tüm özütlerin aynı konsantrasyonda olmasına dikkat edilmiştir. Liken sekonder metabolitlerinin çoğunlukla hidrofobik özellikte olması sebebiyle her özüt için çözünme miktarları optimize edilerek hepsi için ortak en uygun konsantrasyon belirlenmiştir. Bakterilere uygulanacak olan özütlerin içerdiği DMSO oranlarının %1,5 ve altı olması hedeflenerek FTS ile seyreltilmişlerdir. Bu seyreltme işlemi esnasında fazla hidrofobik olan özütlerde presipitasyon olduğundan konsantrasyonlar tekrar optimize edilmiştir.

3.2.2. Özütlerin QSI özelliklerinin araştırılması

Liken özütlerinin *P. aeruginosa* QS sistemleri üzerindeki inhibisyonu etkilerinin taranması için *lasB-gfp* ve *rhlA-gfp* füzyonu içeren monitör bakteri suşları ile Jakobsen ve ark. (2011) tarafından tarif edilen yöntem kullanılmıştır. Böylelikle, GFP ekspresyonuna dayalı floresan ölçümler ile gerçek zamanlı olarak inhibisyonu miktarları belirlenmiş ve kantitatif veriler elde edilebilmiştir. 3'er seyreltme olarak bakterilere özütler uygulanmış ve örneklerin çoğunda hem *las* hem de *rhl* sistemlerinde QS inhibisyonu gerçekleştiği belirlenmiştir. Özütlerin QS inhibisyonundaki başarıları potansiyel uygulama alanları ve verimlilik açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre, özütlerin düşük konsantrasyonda yüksek inhibisyon göstermesi hedef alınmıştır. Dolayısıyla, uygulama yapılan en düşük konsantrasyonlarda en yüksek inhibisyonun belirlendiği liken özütleri daha başarılı olarak yorumlanmıştır. Uygulanan 3. seyreltme olan 30 µg/ml konsantrasyonunda diğer örneklerle göre anlamlı olarak daha yüksek QS inhibisyonu etkisine sahip olduğu belirlenen, özellikle *Bryoria* cinsine ait özütlerin yüksek QS inhibisyonu etkisine sahip sekonder metabolitlere sahip olabileceği düşünülmüştür. Aynı kıstas ile incelendiğinde başarılı bulunan diğer özütlerin *P. furfuracea*, *H. tubulosa*, *P. sulcata*, *C. rangiformis* ve *R. farinacea* gibi türlere ait olduğu

görülmektedir.

Gücin ve ark. (1997), *P. furfuracea* türünün Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu ancak Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir. *Evernia divaricata* metanol özütlerinin *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* ve *P. aeruginosa* bakteri türleri üzerinde etkili olduğu Aslan ve ark. (2006) tarafından bildirilmiştir. *A. sarmentosa*, *B. fuscescens*, *E. divaricata*, *Platismatia glauca* ve *Ramalina farinacea* aseton ve kloroform özütlerinin *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 11666 ve *Acinetobacter sp.* türüne karşı etkili olduğu ve *A. sarmentosa* türünün en yüksek antimikrobiyal etkiyi gösterdiği rapor edilmiştir (Çobanoğlu ve ark., 2010). Yapılan bu çalışmada, QS inhibisyonu hedeflendiği için, antimikrobiyal etki göstermeyen konsantrasyonlar seçilmiştir.

3.2.3. Özütlerin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine etkisi

Liken özütlerinin *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerine inhibisyonları referans suş olan PAO1 kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlara göre liken özütlerinin genel olarak biyofilm inhibisyonu gerçekleştirmediği, hatta artışına sebep olabildiği görülmektedir. Literatür incelendiğinde, sınırlı sayıda olan çalışmalarda liken özütlerinin genellikle *C. albicans* ve *S. aureus* türlerine karşı biyofilm inhibisyonu görülmektedir (Lagarde ve ark., 2018; Millot ve ark., 2017; Mitrovic ve ark., 2014; Ozyigitoglu ve ark., 2017). Bu çalışma kapsamında, *P. furfuracea*, *H. tubulosa*, *E. divericata*, *P. glauca*, *P. submontana*, *C. rangiformis*, *R. farinacea*, *U. florida* ve *B. capillaris* türlerine ait özütlerde sadece 30 µg/ml konsantrasyonunda yaklaşık olarak %15 oranında bir biyofilm inhibisyonu tespit edilmiştir. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *P. glauca* özütü için ise tüm konsantrasyonlarda yaklaşık %15’lik bir inhibisyon tespit edilmiştir.

3.2.4. Özütlerin sekonder metabolit içeriklerinin belirlenmesi

las ve *rhl* QS sistemleri ve biyofilm oluşumu üzerinde inhibisyonu belirlenen liken özütleri seçilerek sekonder metabolit içerikleri kromatografik yöntemler ile belirlenmiştir. Bu aşamada gerekli olan TLC, HPLC ve LC/MS gibi kimyasal çalışmalar Japonya’da Akita Prefectural University’de TÜBİTAK BİDEB-2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında “Likenlerdeki Fungal Topluluklar için Metabarkodlama ve Metabolit Analizleri” başlıklı araştırma ile gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik analizler sonucunda *P. furfuracea*, *H. tubulosa* ve *C. rangiformis* türlerinde ortak olarak baskın miktarda atranorin sekonder metaboliti bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *P. aeruginosa* üzerinde en başarılı QS inhibisyonu etkisine sahip olduğu gözlenmiş *B. capillaris* özütleri analiz edildiğinde, Bolu-Mudurnu ve Bolu-Aladağlar bölgesinden toplanan örnekler içinde önemli miktarda psoromik asit metabolitinin bulunduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmaya benzer bir yöntem kullanarak Ristic ve ark. (2016) yılında *R. fraxinea* ve *R. fastigiata* türleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada, HPLC-UV test ile türlerin fitokimyasal analizlerini yaptıklarında depsitler; evernik asit, obtusatik asit, sekikaik asit, atranorin ve depsidonlar; protosetrarik asit, dibenzofuran, usnik asit içerdiklerini tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Millot ve ark. (2017), *U. florida* kimyasal kompozisyonunu teorik olarak alektorialik, bourgeanik, diffraktaik asitler; skuamatik, tamnolik ve (+)-usnik asit olarak belirlenmesine rağmen aseton özütü içerisinde usnik ve tamnolik asidin olduğunu belirtmişlerdir. Balicka ve Studzińska-Sroka (2017), *P. glauca* türünün metabolit içeriğini kaperatik asit, atranorin, kloroatranorin, metil- β -orcinolkarboksilat, izoadianon, pseudoplakodiolik asit, vejakkinek asit olarak belirtmişlerdir. Gunasekaran ve ark. (2016), *U. rubroincta*, *R. dumeticola*, *C. verticillata* türlerinden elde ettikleri aseton özütlerinin kimyasal içeriğini usnik asit, barbatik asit, 8-hidroksibarbatik asit, atranorin, hiperhomosekikaik asit ve sekikaik asit olarak bildirmişlerdir.

Arazi çalışmalarında diğer liken türlerine göre daha fazla yayılım gösterdiği gözlenen ve dolayısıyla daha yüksek miktarda örnek toplanan *P. furfuracea* türlerinden atranorin izolasyonunun gerçekleştirilmesi kararlaştırılmıştır. *P. furfuracea* türüne göre daha az ve yüksek rakımlarda yayılış gösteren ve özüt verimliliği düşük olan *B. capillaris* özütlerinden metabolit izolasyonu gerçekleştirilmesi mümkün olmamıştır. Bu sebeple saf psoromik asit metaboliti ticari olarak temin edilmiştir. *P. furfuracea* özütleri kolon kromatografisi ve daha sonra preparatif HPLC ile fraksiyonlanarak saf atranorin molekülü elde edilmiştir. Fakat, yüksek miktarda özüt kullanılmasına rağmen sadece 2 mg saf atranorin izole edilebilmiştir. Bu bilgi de *Bryoria* özütlerinden deneyler için yeterli miktarda saf metabolit izole edilemeyeceğini doğrulamıştır.

3.2.5. Sekonder metabolitlerin *P. aeruginosa* QS sistemleri, biyofilm oluşumu ve virölans faktörleri üzerine etkileri

Psoromik asit ve atranorin molekülleri saf olarak uygulandıklarında, monitör suşlarda yüksek miktarlarda QQ etkisi gösterdiği anlaşılmaktadır. Uygulanan molarite miktarları göz önüne alınarak literatür ile karşılaştırıldığında bu metabolitlerin QS inhibitörü olarak kullanılma potansiyellerinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle *P. aeruginosa* QS sistemine karşı aktif liken maddeleri ile ilgili çok az sayıda çalışma karşımıza çıkmaktadır. Scoffone ve ark. (2019), KF patojenlerinin QS ve antivirölans hedefleri başlıklı derlemesinde *P. aeruginosa* QS sistemine karşı aktif kumarin ve baisalin gibi çok sayıda doğal bileşiklerin yer aldığı ifade edilmektedir. Jakobsen ve ark. (2012), bitkisel kaynaklardan elde edilen moleküllerin *P. aeruginosa* *rhlA* ve *lasB* suşları üzerindeki QSI potansiyelini incelemişlerdir. Özellikle yaban turpundan izole edilen iberin molekülünün yüksek QSI potansiyeline sahip olduğunu ve *lasB-gfp* füzyonunu tamamen, *rhlA-gfp* füzyonunu ise %50 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Riedel ve ark. (2008) liken sekonder metabolitleri ile yaptıkları çalışmada, laktonik liken bileşiklerinin *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cenocepacia* bakterileri üzerinde QSI etkisi gösterdiklerini bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada, liken sekonder metabolitlerinden biri olan vulpinik asidin *C. violaceum* bakterisinin QS mekanizması tarafından kontrol edilen mor pigment üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Gokalsin ve Sesal (2016) *E. divaricata* sekonder metabolitlerinden biri olan evernik asitin *P. aeruginosa* QS mekanizması üzerine olan etkisini inceledikleri çalışmada, evernik asitin 116 µM'lık konsantrasyonunun *P. aeruginosa*'nın *las* ve *rhl* QS sistemlerini yaklaşık %50 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

QS sistemlerinin biyofilm oluşumu için gerekli olan ve bu sebeple en çok incelenen sinyal mekanizmalarından olduğu bilinmektedir. Fakat, günümüzdeki görüş, biyofilm oluşumunu ve gelişimini düzenlemek için QS ile birlikte çalışan daha kapsamlı sinyallerin ve yolakların olduğu yönündedir (Kim ve Lee, 2016). Örneğin, indol molekülünün *P. aeruginosa* tarafından üretilmediği bilinmektedir. Ancak indol varlığında *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu artırdığı belirlenmiştir. Bu da doğada indol üreten komşuların, karışık bir popülasyonda türler arası iletişim yoluyla *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu etkileyebileceğini öne sürmektedir (Kim ve Park, 2015).

PAO1 ve klinik izolat ile yapılan biyofilm inhibisyonu deneylerinde atranorin ve psoromik asit metabolitlerinin çok yüksek miktarda etki göstermediği gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan sekonder metabolitlerin QS sinyal moleküllerini taklit edip antagonist bir etki yaptığı tahmin edilmektedir. Fakat bu moleküllerin farklı sinyal mekanizmalarında agonistik bir etki oluşturabilme ihtimali de bulunmaktadır. Bu sebeple psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin, aynı indol gibi farklı sinyal ve stres mekanizmalarını aktive ederek biyofilm oluşumunu indüklemiş olabileceği düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra *P. aeruginosa* biyofilm formunun hidrofobik ve süperhidrofobik yüzeylerde tip IV pili yardımıyla hidrofobik yüzeylere göre daha etkili bir şekilde oluştuğu belirtilmektedir (Bruzard ve ark., 2015). Liken sekonder metabolitlerinin hidrofobik yapılarından dolayı zamanla besiyeri içerisinde presipitasyona sebep olabileceği ve kuyucuk duvarlarına yapışabileceği düşünüldüğünde, hidrofobik özellikleri değişen bu yüzeylerde bakterilerin strese girerek farklı yollar aracılığı ile biyofilm oluşumunu artırması mümkün olabilmektedir.

Virülans deneyleri incelendiğinde psoromik asit ve atranorin moleküllerinin yüksek miktarda inhibisyon etkilerinin olduğu görülmektedir. İki metabolitin de *las* sistemi ile regüle edilen elastaz aktivitesini %75'ten fazla miktarda inhibe ettikleri belirlenmiştir. Proteaz deneylerinde ise psoromik asit, atranorine göre daha yüksek bir inhibisyon sergilemiştir. Ayrıca piyosyanin üretimini iki metabolitin de yaklaşık %90 oranında inhibe ettikleri tespit edilmiştir. İlgili QS sistemleri ile regüle edilen virülans faktörleri için gerçekleştirilen biyokimyasal deneyler ile metabolitlerin *P. aeruginosa* üzerindeki QS inhibisyon etkileri doğrulanmaktadır. Böylelikle iki molekülün de moleküler olarak sırasıyla *las*, *rhl* ve PQS sistemleri ile kontrol edilen *lasB*, *rhlA* ve *pqsA* gen ekspresyonlarının kantitatif olarak incelenmesine karar verilmiştir.

3.2.6. kRT-PZR deneyleri

Gerçek zamanlı PZR kullanılarak gerçekleştirilen kRT-PZR deneyleri sonucunda iki metabolitin de 3 gen üzerinde aşağı-regülasyona sebep olduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan, *las* sistemini inhibe ettiği belirtilen C-30 furanonun PQS sisteminde yukarı regülasyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Psoromik asit ve atranorinin QS ile regüle edilen *lasB*, *rhlA* ve *pqsA* ekspresyonuna olan etkileri karşılaştırıldığında,

psoromik asitin daha yüksek bir inhibisyona sebep olduğu anlaşılmaktadır. Fakat virülans deneylerine bakıldığında iki molekülün de yaklaşık miktarda elastaz, proteaz ve piyosiyanin inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Gen ekspresyonlarında bu iki molekül arasındaki fark virülans deneylerinde fenotipik olarak görülmemiştir.

Buradaki olası çelişki iki şekilde yorumlanabilir. İlk olarak, kPZR yönteminde transkripsiyonu az miktarda gerçekleşmiş genler ile yapılan deneylerde c_q değerlerinin yüksek olması beklenmektedir. Fakat, karşılaştırma yapılması istendiğinde, bu düşük miktardaki örnek kopyalarının algılanma ve kantifikasyon kaliteleri düşmektedir (Forootan ve ark., 2017). Bu da yöntemin stokastik yapısından, yani düşük konsantrasyonlarda örneklerin rasgele dağılım eşitsizliğinden kaynaklanmaktadır. Bunu üstesinden gelmenin yollarından biri, örneklerin Poisson dağılımına uygun olarak çok fazla miktarda tekrarlar ile gerçekleştirilmesidir. Fakat, bu çalışmada elde edilen istatistiksel anlamlılık ve hata oranının düşük olmasından dolayı bu ihtimalin düşük olduğu düşünülmüştür.

İkinci olarak daha olası olduğu düşünülen ihtimal ise *pqs* sisteminin inhibisyonu ile ilgilidir. Atranorin molekülünün *lasB* ve *rhlA* transkripsiyonunda psoromik asite göre daha düşük inhibisyon gösterdiği fakat *pqsA* geni için daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. PQS sisteminin hiyerarşik olarak *las* ve *rhl* sistemlerine aracılık ederek bir denge kurduğu düşünüldüğünde, bu sistemin inhibisyonu ve diğer sistemlerde olan düşük inhibisyonların birleşerek QS sistemlerinin otoindüksiyonunu engellediği var sayılabilir. Ayrıca atranorin, psoromik asite göre daha küçük ve aktif bir molekül yapısında olduğu için, diğer ikili komponent sistemlerini veya bağlantılı global regülatörleri inhibe edebilme potansiyeline de sahiptir.

Gerçekleştirilen hücre canlılık deneylerinde, psoromik asitin 78, 39 ve 19,5 µM konsantrasyonunda PCS-201-012 insan dermal fibroblast hücre hattı üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir. Fakat atranorinin hücre canlılığını 176, 88 ve 44 µM konsantrasyonlarının tümünde yaklaşık %50 kadar azalttığı belirlenmiştir. Bu sebeple, terapötik uygulama alanları göz önüne alınarak yeni-nesil RNA sekanslama analizleri için psoromik asit molekülü seçilmiştir.

Psoromik asit molekülünün 78 µM konsantrasyonunda, *P. aeruginosa* QS sistemlerini inhibe edebildiği, virülans faktörlerini azalttığı, QS ile ilgili temel genlerin

ekspresyonlarını aşağı-regüle ettiği ve hücre kültürü deneylerinde canlılığa bir etkisi bulunmadığı önceki deneylerle belirlenmiştir. Psoromik asit, özellikle *Usnea*, *Psoroma* ve *Alectoria* liken cinslerinde bulunan, β -orcinol depsidonlara ait doğal bir metabolittir. Psoromik asitin biyolojik aktiviteleri ile ilgili önemli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalara göre psoromik asit, antibakteriyel, antitümör, antigenotoksik, antioksidan, antiherpetik ve anti-osteoporotik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Behera ve ark., 2012; Deraeve ve ark., 2012; Emsen ve ark., 2016; Hassan ve ark., 2018; Hassan ve ark., 2019; Sweidan ve ark., 2017). Fakat bu metabolitin QS sistemleri dışında *P. aeruginosa* için hangi metabolizmalarda nasıl etkilere sahip olduğu bilinmemektedir. Bu sebeple uygulama yapılan *P. aeruginosa* örneklerinin tüm gen ifadelerindeki değişikliklerin belirlenmesi için yeni-nesil RNA sekanslama teknolojilerinden yararlanılması ve biyoinformatik analizler sonucunda transkriptomda gerçekleşen değişikliklerin açığa çıkarılması hedeflenmiştir.

3.2.7. RNAseq analizleri

RNAseq yöntemi ile 78 μ M konsantrasyonunda uygulama yapılan PAO1 suşuna ait total RNA izole edildikten sonra mRNAlar saflaştırılarak sekanslanılmışlardır. Bu yöntem ile örneklerde bulunan tüm mRNA kopyaları sayılarak diferansiyel ekspresyon miktarları hesaplanmıştır. Anlamlı olarak aşağı ve yukarı regüle olan genler ($\log_2$ tabanında $\pm 1,5$) listelenmiş ve gen ontolojisi analizleri ile psoromik asit uygulaması sonucunda hangi metabolizmalarda değişiklikler meydana geldiği incelenmiştir. Elde edilen verilere göre 3 temel QS sisteminde inhibisyon gerçekleştiği belirlenmiştir. QS sistemleri ile regüle edilen pek çok genin ekspresyonlarının aşağı-regüle olduğu gözlenmiştir. Literatürde *P. aeruginosa* QS inhibisyonu ile ilgili gerçekleştirilen transkriptom analizlerinde de benzer metabolizma ve genlerin regülasyon değişimlerine rastlanmaktadır (Hentzer ve ark., 2003; Li ve ark., 2019). Huang ve ark. (2019), virülans rol oynayan en önemli 20 transkripsiyon faktörü ve regülasyon ağlarını incelemişlerdir. Bu çalışma ile psoromik asit uygulaması sonucunda bu transkripsiyon faktörlerinden *lasR*, *rhlR*, *mvfR*, *vqsR*, *soxR*, *gbdR*, *pchR* ve *rsaL* ekspresyonlarının aşağı-regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonlarındaki azalma ile piliyosinin, motilite, fosfataz, ramnolipit, gibi virülans faktörlerinin inhibisyonu arasında önemli bir bağlantı bulunmaktadır..

Biyofilm oluşumunda inhibe edici önemli bir etkisi olmadığı bu çalışmada gösterilmiş olan psoromik asitin *P. aeruginosa* salgı metabolizmasına ait 31 gende yukarı-regülasyona sebep verdiği görülmüştür. Biyofilm oluşumunda önemli *las* sistemi ile regüle edilen Psl polisakkarit biyosentezinin inhibe olduğu belirlense de Tip VI salgı sistemi genlerinin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Bu da sadece QS ile regüle edilmediği bilinen biyofilm oluşumunda, çevresel stres ile aktive olan Gac/Rsm ve c-di-GMP yollarının bu uygulama ile engellenemeyebileceğini göstermektedir. Daha önce tartışılan sebeplerden dolayı, ileride statik biyofilm yerine dinamik akışkan biyofilm deneyleri içeren araştırmaların farklı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

3.2.7.1. Psoromik asitin QS bağlantısı olmayan metabolizmalar üzerine etkileri

Psoromik asit metabolitinin *P. aeruginosa* QS bağlantılı sistemler dışındaki metabolik süreçlerine olan etkileri incelendiğinde ilgi çekici sonuçlar göze çarpmaktadır. Bu sonuçlara örnek olarak florobenzoat ve nitrotoluen degradasyonu metabolizmaları verilebilir. Florobenzoat olarak isimlendirilen florlu aromatik bileşiklerin ve nitrotoluen organik bileşiklerinin herbisit, insektisit ve anestetiklerin içeriklerinde bulunabildiği bilinmektedir (Key ve ark., 1997). İnsana ve doğaya zararlı bu bileşiklerin uzaklaştırılması için bakteri uygulamalarının da dahil olduğu biyoremediasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin bakteriler tarafından yıkımları bu açıdan önem taşımaktadır (Murphy, 2016).

Bu çalışmada psoromik asit uygulaması yapılan *P. aeruginosa* florobenzoat yıkımı metabolizmasında bulunan 7 genden 6'sının aşağı-regüle olduğu saptanmıştır. Psoromik asit uygulamasının bu degradasyonu engellemesinin belirlenmesi, bu tarz bileşiklerin bulunduğu doğal ortamlarda biyoremediasyon açısından kullanımının uygun olmayabileceğini göstermektedir. Fakat öte yandan, psoromik asitin bakterilerin florobenzoat degradasyonunu inhibe etmesi ile pestisit uygulanan alanlarda bileşiklerin bakteriler tarafından parçalanmasının azaltılabileceğini göstermektedir. Bu da psoromik asit ile birlikte uygulanabilecek pestisitlerin etkenliğini artırabilme potansiyeline işaret etmektedir. Böylelikle florobenzoat içeren pestisitlerin daha düşük konsantrasyonda kullanılarak doğaya zararının azaltılabileceği ihtimalini doğurmaktadır. Biyoinformatik analizlerde psoromik asitin nitrotoluen degradasyonunu ise artırdığı

görülmektedir. Bu da yukarıda belirtilen yorumların nitrotoluen bileşikleri aktif madde olarak kullanan pestisitler için florobenzoat bulunduranlara göre tam ters şekilde sunulabileceği anlamına gelmektedir.

Analizler psoromik asit uygulaması sonucunda, benzoat, propanoat, pirüvat, geraniol, ksilen ve yağ asidi bozunması gibi katabolik yolların yanı sıra sekonder metabolit sentezi, aminoasit sentezi ve bakteriyel kemotaksis metabolizmalarında pek çok genin aşağı-regüle edildiği belirlenmiştir.



4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, fırsatçı patojen *P. aeruginosa* ile mücadelede anti-virülans ajan olarak kullanılabilecek doğal metabolitlerin bulunması hedefiyle, çeşitli bölgelerden liken türleri toplanarak test edilmiş ve saf metabolitler izole edilerek QS inhibisyon mekanizmaları incelenmiştir. Ayrıca *Bryoria* türlerinde tespit edilen psoromik asit molekülünün *P. aeruginosa* transkriptomunda meydana getirdiği değişiklikler sunulmuştur. Tez çalışması kapsamında öncelikle QS inhibisyonu için genelden özele, yani liken türlerinin taranmasından bulundurdukları saf metabolitlerin belirlenerek seçimine; daha sonra moleküler yöntemler ile özelden genele, yani belirlenen QS inhibitörünün özel QS genleri dışında tüm *P. aeruginosa* gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini araştıran bir yaklaşım izlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, farklı bölgelerden toplanılan aynı türe ait liken örneklerinin farklı oranlarda etki gösterdikleri gözlemlenmiştir. Etkenliği belirlenen *B. capillaris* türlerine ait 3 örnekten sadece 2'sinde psoromik asit molekülü yoğun olarak belirlenmiştir. Böylelikle, ortam şartlarının liken sekonder metabolit üretimindeki etkilerinin önemi anlaşılmıştır. Atranorin ve psoromik asit sekonder metabolitlerinin *P. aeruginosa* QS inhibisyonunda ve virülansının azaltılmasında oldukça etkili oldukları ve özellikle psoromik asit molekülünün hücre canlılığına olan etkisinin düşük olmasından ötürü alternatif tedavi yöntemlerinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu kanısına varılmıştır. Araştırmaları gerçekleştirilen liken sekonder metabolitleri ile elde edilen başarılı sonuçlar, diğer belirlenen fakat bu çalışma kapsamında araştırılmamış liken sekonder metabolitlerinin de anti-virülans açısından önemli potansiyele sahip olabileceklerini düşündürmüştür.

RNAseq teknolojisi ile psoromik asit molekülünün *P. aeruginosa* üzerindeki etkilerinin detaylı olarak incelenmesi mümkün olmuştur. Böylelikle, bu metabolitin QS inhibisyonu üzerine olan etkileri açıkça ortaya çıkarılmış ve diğer metabolizmalarda meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi ile önemli veriler elde edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler ve yapılan araştırmalar sonucunda 1 makale ve 1 kitap bölümü yayımlanmıştır. Ayrıca, metabolitler ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar için saygıdeğer dergilere gönderilmek üzere kapsamlı yayımlar hazırlanmaktadır.

Bir sonraki aşamada, QS inhibitörü olarak belirlenen metabolitlerin ilgili alanlarda kullanılabilmeleri için spesifik çalışmalar gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Sağlık alanında hayvan deneyleri, klinik deneyler vb. ve nanoteknoloji alanında enkapsülasyon, nano-kaplama, hedefleme gibi yöntemler ile sürdürülebilecek araştırmalar, psoromik asit ve atranorin metabolitlerinin sağlık ve endüstriyel alanlarda kullanılması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma ile elde edilen verilerin uygulama alanlarındaki araştırmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

Açıkgöz, B., Karaltı, İ., Ersöz, M., Coşkun, Z. M., Çobanoğlu, G., Sesal, C. (2013) Screening of antimicrobial activity and cytotoxic effects of two *Cladonia* species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(5-6), 191-197.

Alzoreky, N., Nakahara, K. (2003) Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food microbiology*, 80(3), 223-230.

Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Sahin, F., Özkan, H. (2006) Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea*., *Dermatocarpon miniatum*., *Evernia divaricata*., *Evernia prunastri*., and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology*, 44(4), 247-252.

Balicka, N., Studzińska-Sroka, E. (2017) *Platismatia glauca*—chemical composition and biological activity. *Postępy Fitoterapii*.

Behera, B. C., Mahadik, N., Morey, M. (2012) Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharmaceutical Biology*, 50(8), 968-979.

Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(2), 409-414.

Bjarnsholt, T., van Gennip, M., Jakobsen, T. H., Christensen, L. D., Jensen, P. O., Givskov, M. (2010) *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature Protocols*, 5(2), 282-293. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.205>

Borges, A., Simões, M. (2019) Quorum sensing inhibition by marine bacteria. *Marine drugs*, 17(7), 427.

Bruzaud, J., Tarrade, J., Coudreuse, A., Canette, A., Herry, J.-M., de Givenchy, E. T., Darmanin, T., Guittard, F., Guilbaud, M., Bellon-Fontaine, M.-N. (2015) Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 59-66.

Cankili, M. Y. (2017) Screening of antibacterial, antituberculosis and antifungal effects of lichen *Usnea florida* and its thamnolic acid constituent.

Chifiriuc, M. C., Dițu, L. M., Oprea, E., Lițescu, S., Bucur, M., Măruțescu, L., Enache, G., Saviuc, C., Burlibașa, M., Trăistaru, T. (2009) In vitro study of the inhibitory activity of usnic acid on dental plaque biofilm. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 68(4), 215-222.

Çobanoğlu, G., Sesal, C., Gökmen, B., Çakar, S. (2010) Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South Western Journal of Horticulture*, 1(2), 153-158.

Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 28(3), 261-289.

Deraeve, C. I., Guo, Z., Bon, R. S., Blankenfeldt, W., DiLucrezia, R., Wolf, A., Menninger, S., Stigter, E. A., Wetzel, S., Choidas, A. (2012) Psoromic acid is a selective and covalent Rab-prenylation inhibitor targeting autoinhibited RabGGTase. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17), 7384-7391.

Diggle, S. P., Whiteley, M. (2020) Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30.

Diggle, S. P., Whiteley, M. (2020, Jan) Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*, 166(1), 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>

Dong, Y. H., Wang, L. Y., Zhang, L. H. (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>

Dunny, G. M., Leonard, B. A. (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 51, 527-564. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.527>

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H.,

Oppenheimer, N. J. (1981, 1981/04/01) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20(9), 2444-2449. <https://doi.org/10.1021/bi00512a013>

Elborn, J. S. (2019, Dec) Adult Care in Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 40(6), 857-868. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400289>

El-Mowafy, S. A., Abd El Galil, K. H., El-Messery, S. M., Shaaban, M. I. (2014) Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 74, 25-32.

Emsen, B., Aslan, A., Togar, B., Turkez, H. (2016) *In vitro* antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1748-1762.

Essar, D., Eberly, L., Hadero, A., Crawford, I. (1990) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 884-900.

Fernandez-Moriano, C., Gomez-Serranillos, M. P., Crespo, A. (2016, Jan 2) Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 1-17. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1003354>

Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M. (2017) Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular detection and quantification*, 12, 1-6.

Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S. J., Boyle, B., Levesque, R. C. (2019) The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome biology and evolution*, 11(1), 109-120.

Fuqua, C., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 35, 439-468. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>

Furmanek, Ł., Czarnota, P., Seaward, M. (2019) Antifungal activity of lichen

compounds against dermatophytes: A review. *Journal of applied microbiology*, 127(2), 308-325.

Galloway, W. R., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., Spring, D. R. (2011, Jan 12) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev*, 111(1), 28-67. <https://doi.org/10.1021/cr100109t>

Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., Bačkor, M. (2020) Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential. *Co-evolution of secondary metabolites*, 175-209.

Gökalsın, B., Berber, D., Sesal, N. C. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Inhibition. In *Quorum Sensing* (pp. 227-256). Elsevier.

Gokalsin, B., Sesal, N. C. (2016, Sep) Lichen secondary metabolite evernic acid as potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(9). <https://doi.org/UNSP 15010.1007/s11274-016-2105-5>

Gücin, F., Dülger, B., Aslan, A. (1997) *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf likeninin antimikrobiyal aktivitesi. *Ekoloji*, 7(25), 22-24.

Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., Seber, E. (2004) Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Seftazidime Duyarlılığın E-Test ve Disk Diffüzyon Yöntemleri İle Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34(1), 33-36.

Gunasekaran, S., Rajan, V. P., Ramanathan, S., Murugaiyah, V., Samsudin, M. W., Din, L. B. (2016) Antibacterial and antioxidant activity of lichens *Usnea rubroincta*, *Ramalina dumeticola*, *Cladonia verticillata* and their chemical constituents. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20(1), 1-13.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004, Feb) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

Hassan, S. T., Šudomová, M., Berchová-Bímová, K., Gowrishankar, S., Rengasamy, K. R. (2018) Antimycobacterial, enzyme inhibition, and molecular interaction studies of psoromic acid in *Mycobacterium tuberculosis*: Efficacy and safety

investigations. Journal of clinical medicine, 7(8), 226.

Hassan, S. T., Šudomová, M., Berchová-Bímová, K., Šmejkal, K., Echeverría, J. (2019) Psoromic acid, a lichen-derived molecule, inhibits the replication of HSV-1 and HSV-2, and Inactivates HSV-1 DNA polymerase: shedding light on antiherpetic properties. *Molecules*, 24(16), 2912.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87-102.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*, 22(15), 3803-3815.

Hikari, S., Kojiro, H., Masashi KOMINE, Y. Y. (2011) Analysis of lichen substances including triterpenoids by high performance liquid chromatography with a differential refractive index detector and a photodiode array detector. *菌物学报*, 30(6), 944-949.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Jensen, P. Ø., Kolpen, M., Qvist, T., Aanæs, K., Pressler, T., Skov, M., Ciofu, O. (2017) Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *Apmis*, 125(4), 339-343.

Huang, H., Shao, X., Xie, Y., Wang, T., Zhang, Y., Wang, X., & Deng, X. (2019) An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature communications*, 10(1), 1-13.

Ingolfssdottir, K. (2002) Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7), 729-736.

Jakobsen, T. H., Bragason, S. K., Phipps, R. K., Christensen, L. D., van Gennip, M., Alhede, M., Skindersoe, M., Larsen, T. O., Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2012, Apr) Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 78(7), 2410-2421. <https://doi.org/10.1128/AEM.05992-11>

Jakobsen, T. H., van Gennip, M., Christensen, L. D., Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2011). Qualitative and Quantitative Determination of Quorum Sensing Inhibition In Vitro. In K. P. Rumbaugh (Ed.), *Quorum Sensing: Methods and Protocols* (pp. 253-263). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_18

Kalia, V. C., Purohit, H. J. (2011, May) Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Crit Rev Microbiol*, 37(2), 121-140. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532479>

Kanivebaguli, V. S., Mesta, A. R. (2020) Lichens: A Novel Group of Natural Biopesticidal Sources. *Plant Pathogens: Detection and Management for Sustainable Agriculture*, 231.

Key, B. D., Howell, R. D., Criddle, C. S. (1997) Fluorinated organics in the biosphere. *Environmental science & technology*, 31(9), 2445-2454.

Kim, J., Park, W. (2015) Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *Journal of Microbiology*, 53(7), 421-428.

Kim, S.-K., Lee, J.-H. (2016) Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 54(2), 71-85.

Koch, C., Høiby, N. (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *The Lancet*, 341(8852), 1065-1069.

Kothari, V. (2019) Adopting an Anti-virulence (anti-pathogenicity) Approach for Dealing with the Problem of Antimicrobial Resistance. *Recent Pat Biotechnol*, 13(4), 252-255. <https://doi.org/10.2174/187220831304191025092737>

Lagarde, A., Jargeat, P., Roy, M., Girardot, M., Imbert, C., Millot, M., Mambu, L. (2018) Fungal communities associated with *Evernia prunastri*, *Ramalina fastigiata* and *Pleurosticta acetabulum*: Three epiphytic lichens potentially active against *Candida* biofilms. *Microbiological research*, 211, 1-12.

LaSarre, B., Federle, M. J. (2013, Mar) Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(1), 73-111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>

Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., Beloin, C. (2013) From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, 2(2), 288-356.

Lee, J., Zhang, L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26-41.

Lee, K., Yoon, S. S. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(6), 1053-1064.

Li, T., Cui, F., Bai, F., Zhao, G., Li, J. (2016, Jul 13) Involvement of Acylated Homoserine Lactones (AHLs) of *Aeromonas sobria* in Spoilage of Refrigerated Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Sensors (Basel)*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/s16071083>

Li, W.-R., Ma, Y.-K., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Wen, X., Sun, T.-L., Peng, H. (2019) Diallyl disulfide from garlic oil inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems and corresponding virulence factors. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3222.

Li, Y. H., Tian, X. (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*, 12(3), 2519-2538. <https://doi.org/10.3390/s120302519>

Lumbsch, H. T. (1998) Taxonomic use of metabolic data in lichen-forming fungi. *Chemical fungal taxonomy*. Marcel Dekker, New York, 345-387.

Maurer, C. K., Lu, C., Empting, M., Hartmann, R. W. (2015). Synthetic Quorum Sensing Inhibitors (QSIs) Blocking Receptor Signaling or Signal Molecule Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight* (pp. 303-317). Springer.

McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703-3711.

Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

Millot, M., Girardot, M., Dutreix, L., Mambu, L., Imbert, C. (2017) Antifungal and anti-biofilm activities of acetone lichen extracts against *Candida albicans*. *Molecules*, 22(4), 651.

Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., Topuzovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Vasic, S. (2014) *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. EXCLI journal, 13, 938.

Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Đačić, D., Ćurčić, M. (2011) Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. International journal of molecular sciences, 12(8), 5428-5448.

Molnár, K., Farkas, E. (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Zeitschrift für Naturforschung C, 65(3-4), 157-173.

Murphy, C. D. (2016) Microbial degradation of fluorinated drugs: biochemical pathways, impacts on the environment and potential applications. Applied microbiology and biotechnology, 100(6), 2617-2627.

Nayaka, S., Haridas, B. (2020) Bioactive Secondary Metabolites from Lichens. In Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects (pp. 255-290). Springer.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. (2013, Jun 17) Quorum sensing and phytochemicals. Int J Mol Sci, 14(6), 12607-12619. <https://doi.org/10.3390/ijms140612607>

Odimegwu, D. C., Ngwoke, K., Ejikeugwu, C., Esimone, C. O. (2019). Lichen secondary metabolites as possible antiviral agents. In *Lichen secondary metabolites* (pp. 199-214). Springer.

Ohman, D., Cryz, S., Iglewski, B. (1980) Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. Journal of Bacteriology, 142(3), 836-842.

O'Toole, G. A. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of visualized experiments: JoVE(47).

Özyiğitoğlu, G. Ç., Açıkgöz, B., Sesal, C. (2017) Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. Acta Biologica Turcica, 29(4), 150-163.

Ozyigitoglu, G., Acikgoz, B., Tahiroglu, G., Sesal, N. (2017) Comparison of

antibacterial and antibiofilm activity properties of *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. lichen extracts from different locations in Turkey.

Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Proesmans, M., Vermeulen, F., Boulanger, L., Verhaegen, J., De Boeck, K. (2013) Comparison of two treatment regimens for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(1), 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.06.001>

Ranković, B., Kosanić, M. (2019). Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In *Lichen secondary metabolites* (pp. 1-29). Springer.

Ranković, B., Kosanić, M. (2019). Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In *Lichen secondary metabolites* (pp. 1-29). Springer.

Ranković, B., Mišić, M., Sukdolak, S. (2009) Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia*, 64(1), 53-58.

Riedel, K., Boustie, J., Eberl, L., Berg, G., Grube, M. (2008) Effects of lichen secondary metabolites on bacterial functions and biofilm formation. *Planta Medica*, 74(09), PA85.

Ristic, S., Rankovic, B., Stamenkovic, S. (2016) Biopharmaceutical potential of two Ramalina lichens and their metabolites. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(7), 651-658.

Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Hamood, A. N. (2000) The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and infection*, 2(14), 1721-1731.

Rutherford, S. T., Bassler, B. L. (2012, Nov 01) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>

Scoffone, V. C., Trespidi, G., Chiarelli, L. R., Barbieri, G., Buroni, S. (2019) Quorum sensing as antivirulence target in cystic fibrosis pathogens. *International journal*

of molecular sciences, 20(8), 1838.

Shukla, V., Joshi, G. P., Rawat, M. (2010) Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9(2), 303-314.

Smith, R. S., Iglewski, B. H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current opinion in microbiology*, 6(1), 56-60.

Stocker-Wörgötter, E. (2008) Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural product reports*, 25(1), 188-200.

Sweidan, A., Chollet-Krugler, M., Sauvager, A., Van de Weghe, P., Chokr, A., Bonnaure-Mallet, M., Tomasi, S., Bousarghin, L. (2017) Antibacterial activities of natural lichen compounds against *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. *Fitoterapia*, 121, 164-169.

Tanas, S., Odabasoglu, F., Halici, Z., Cakir, A., Aygun, H., Aslan, A., Suleyman, H. (2010) Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *Journal of natural medicines*, 64(1), 42-49.

Tay, T., Türk, A. Ö., Yılmaz, M., Türk, H., Kıvanç, M. (2004) Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(5-6), 384-388.

Turk, A. O., Yilmaz, M., Kivanc, M., Turk, H. (2003, Nov-Dec) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Z Naturforsch C J Biosci*, 58(11-12), 850-854. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1219>

Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P. (2009, Jul 13) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>

Yan, S., & Wu, G. (2019) Can biofilm be reversed through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? *Frontiers in microbiology*, 10, 1582.

Yang, L., Rybtke, M. T., Jakobsen, T. H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2009, Jun) Computer-Aided Identification of Recognized Drugs as *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2432-2443. <https://doi.org/10.1128/Aac.01283-08>

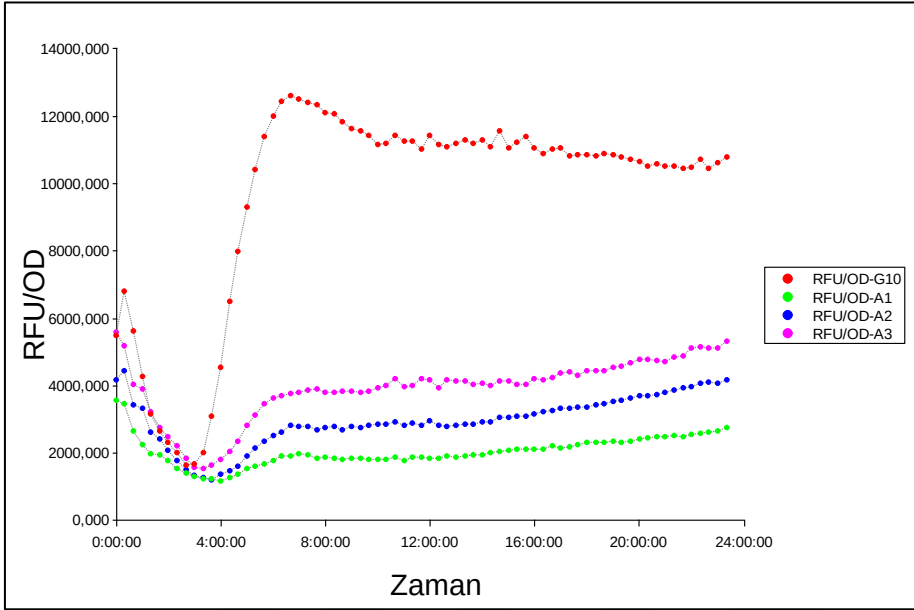
Yılmaz, M., Tay, T., Kıvanç, M., Türk, H., Türk, A. Ö. (2005) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(1-2), 35-38.

Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., Pan, J. (2020, 2020-October-15) Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 11(2558). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>

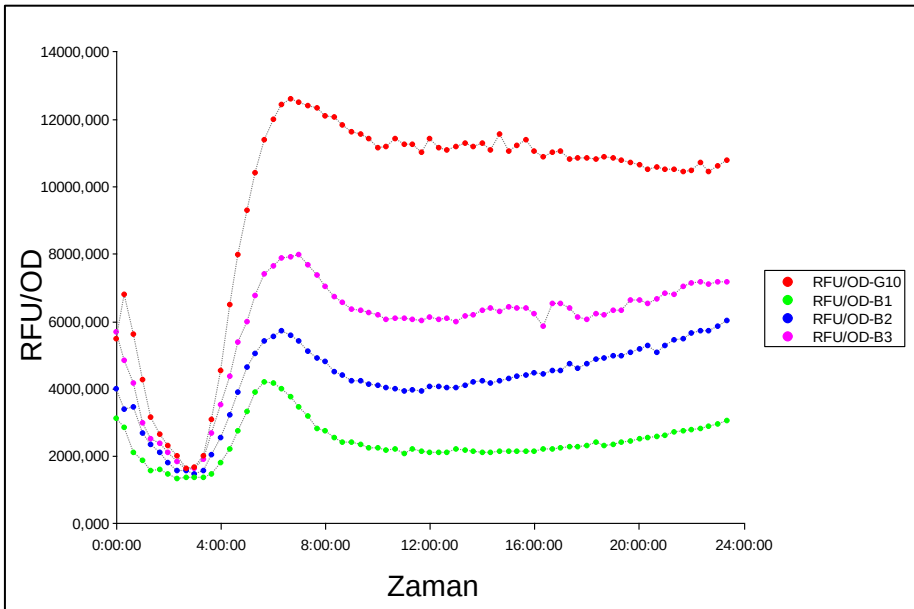
Zraik, M., Booth, T., Piercey-Normore, M. D. (2018) Relationship between lichen species composition, secondary metabolites and soil pH, organic matter, and grain characteristics in Manitoba. *Botany*, 96(4), 267-279.

EKLER

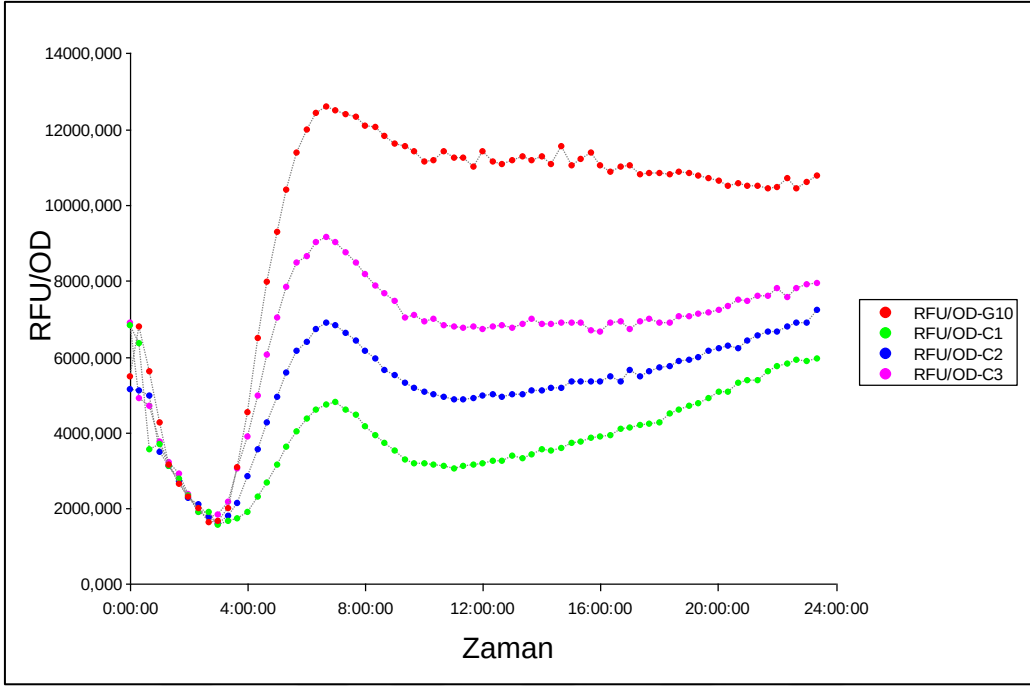
EK-1



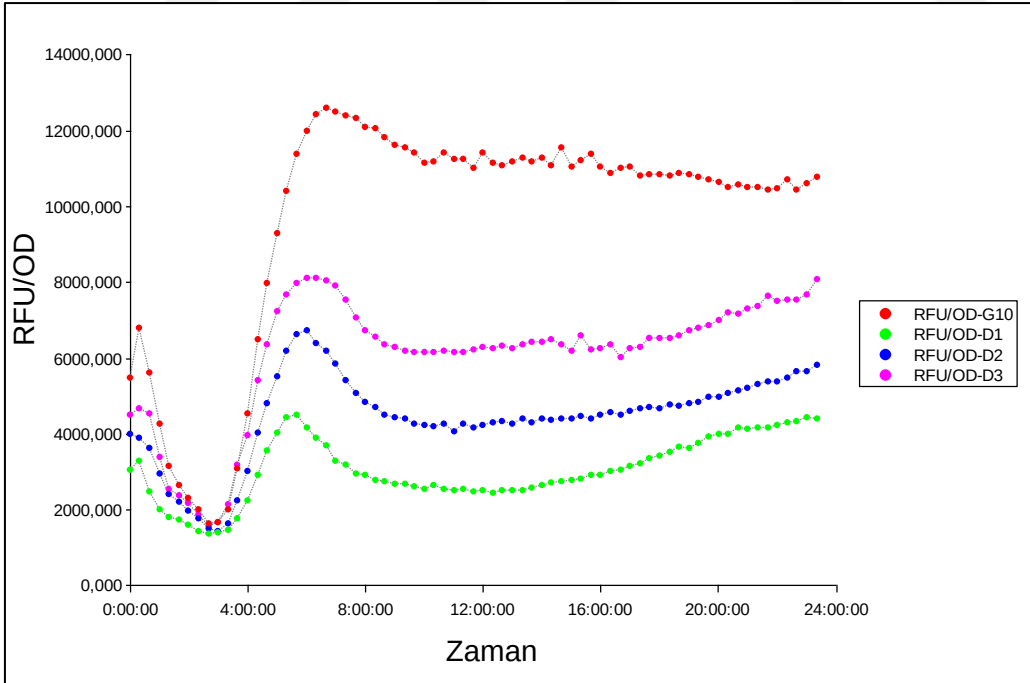
Şekil Ek 1.1. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A1, A2, A3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: kontrol).



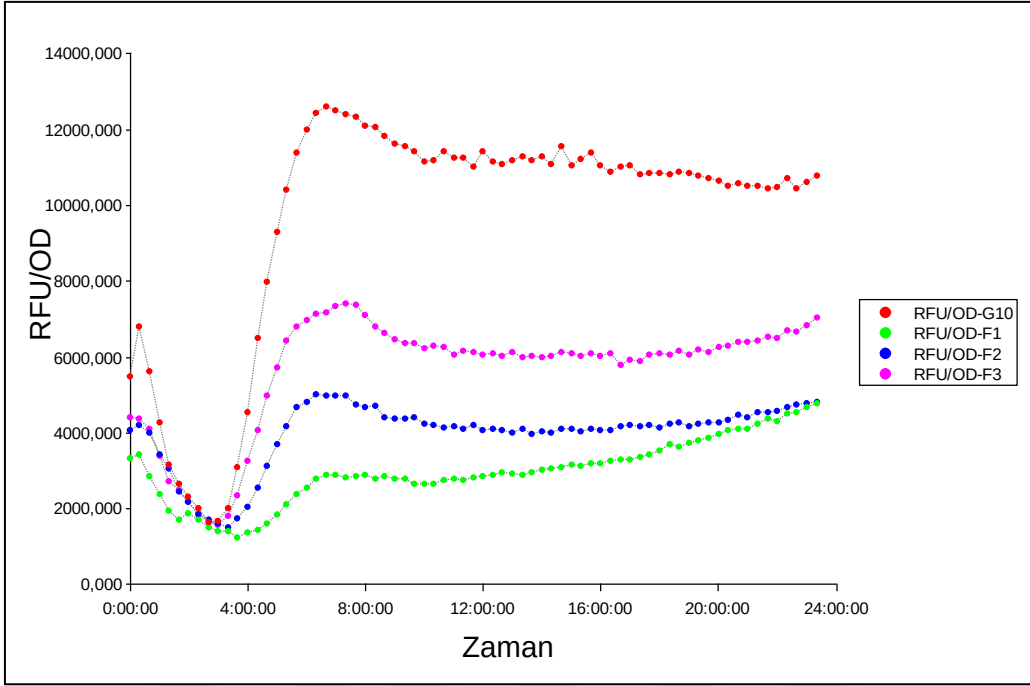
Şekil Ek 1.2. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Ramalina farinacea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B1, B2, B3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



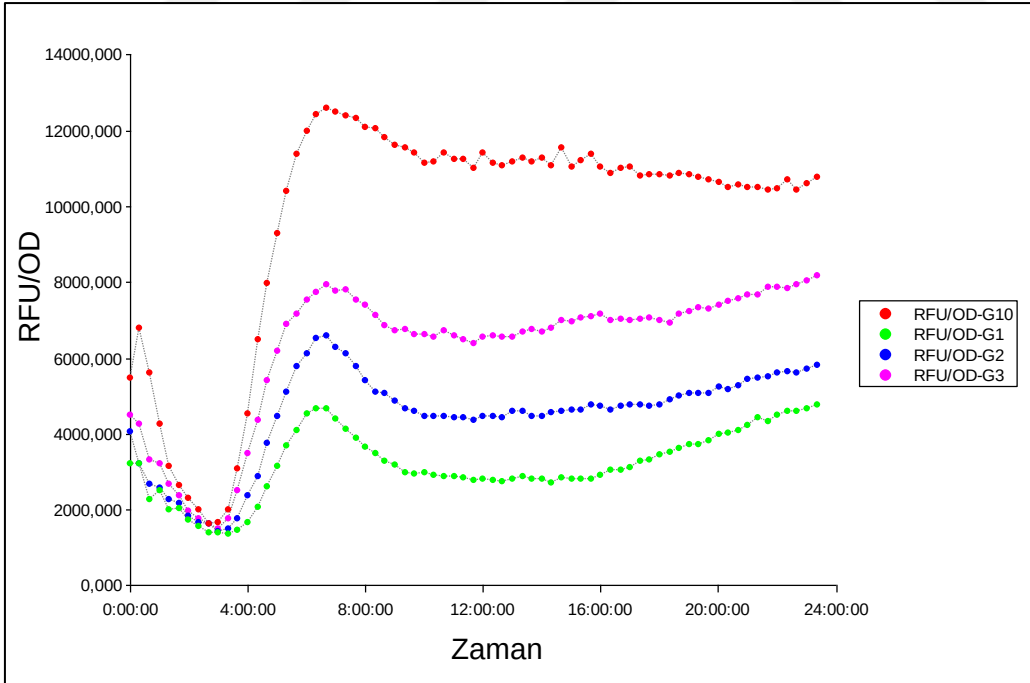
Şekil Ek 1.3. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (C1, C2, C3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



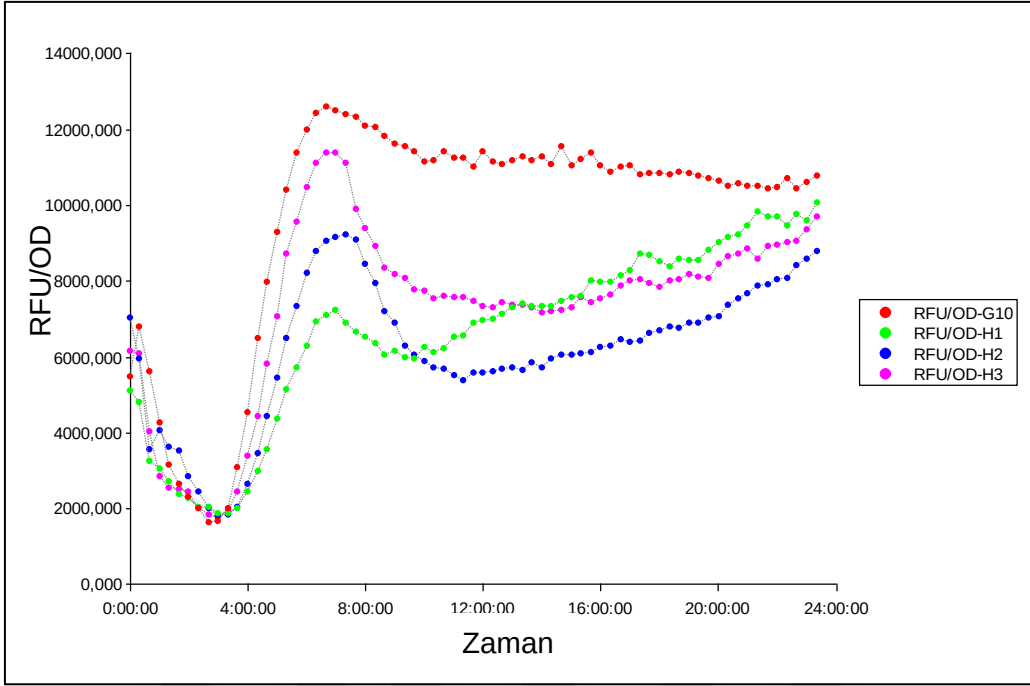
Şekil Ek 1.4. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Usnea florida* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (D1, D2, D3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



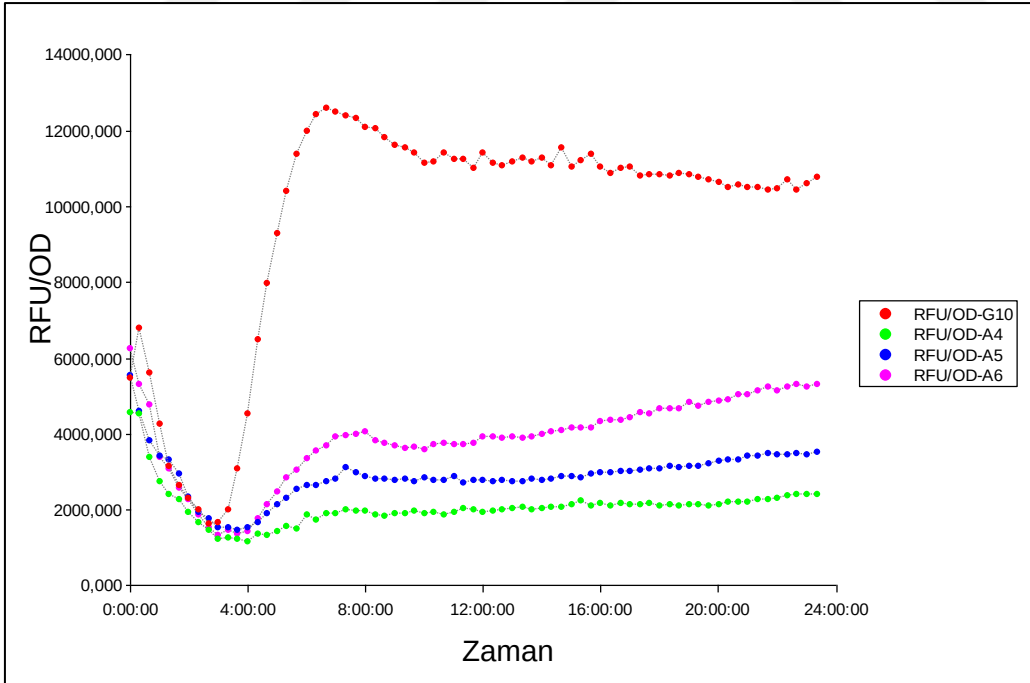
Şekil Ek 1.5. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F1, F2, F3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



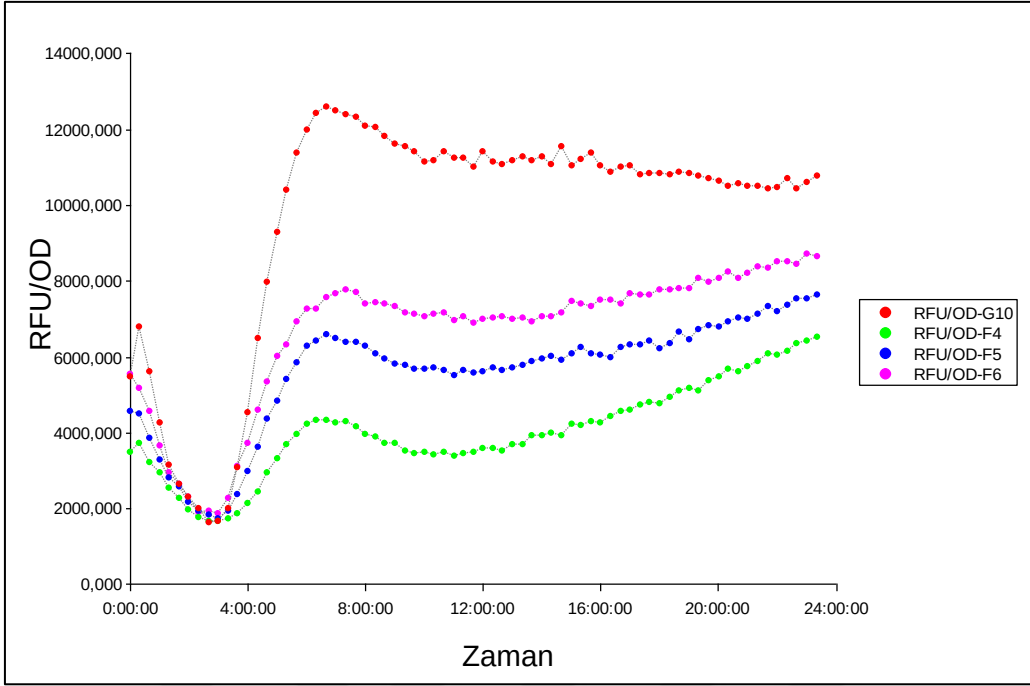
Şekil Ek 1.6. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G1,G2, G3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



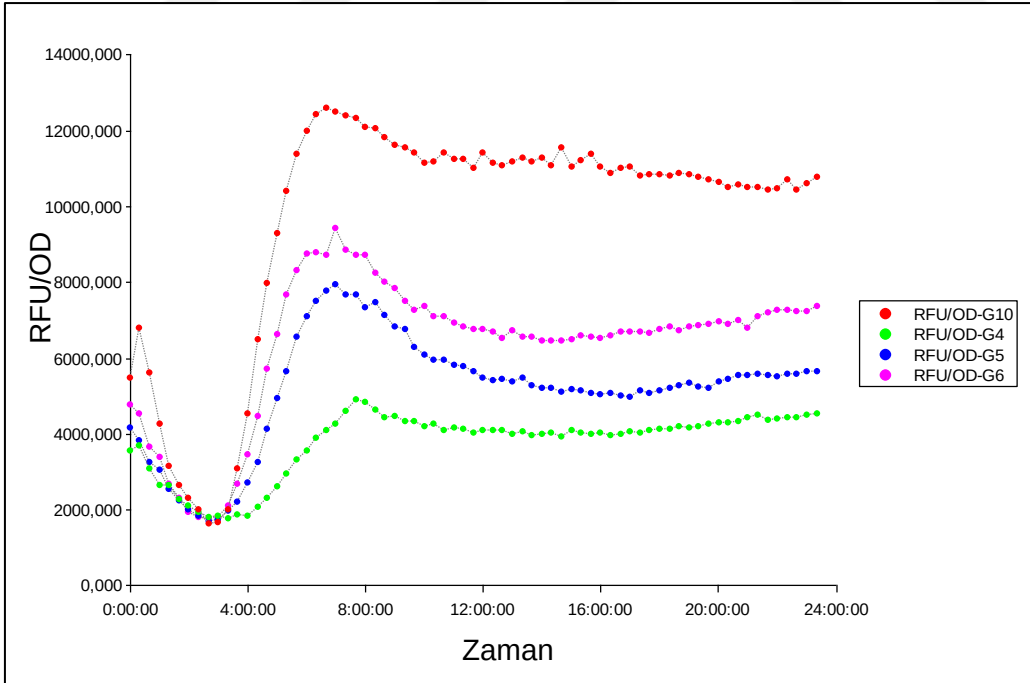
Şekil Ek 1.7. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Evernia divaricata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (H1, H2, H3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



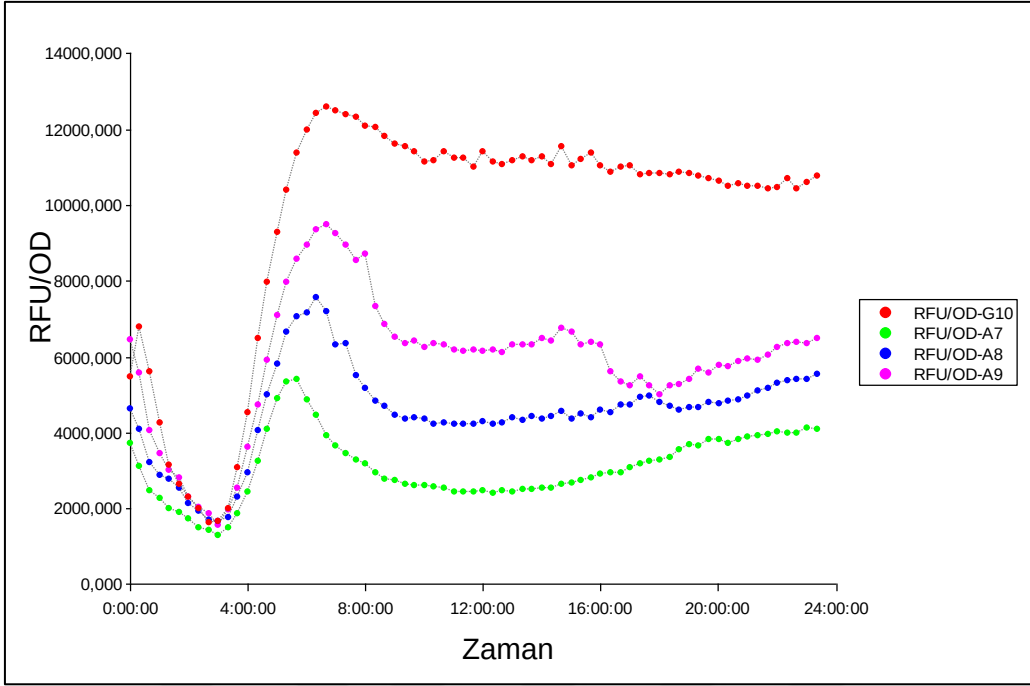
Şekil Ek 1.8. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A4, A5, A6) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



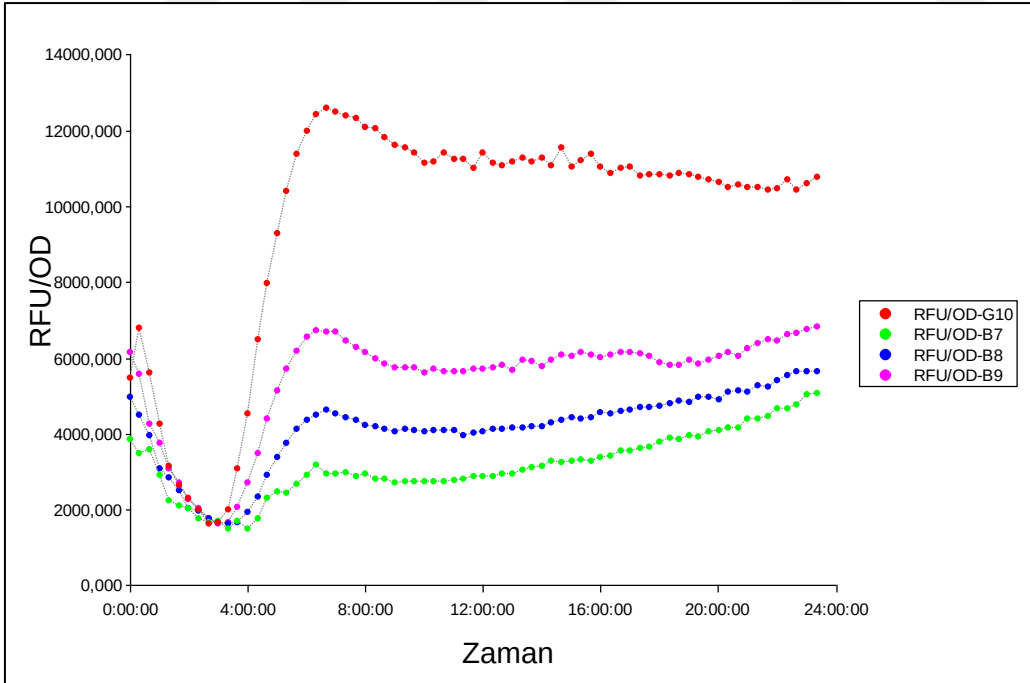
Şekil Ek 1.9. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F4, F5, F6) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



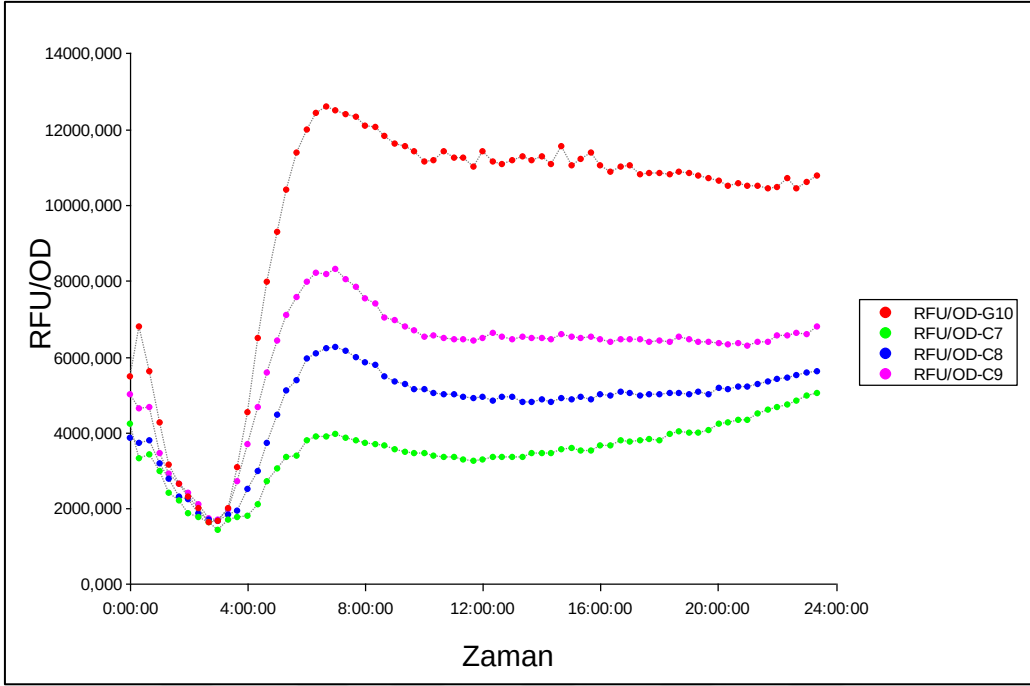
Şekil Ek 1.10. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Evernia prunastri* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G4, G5, G6) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



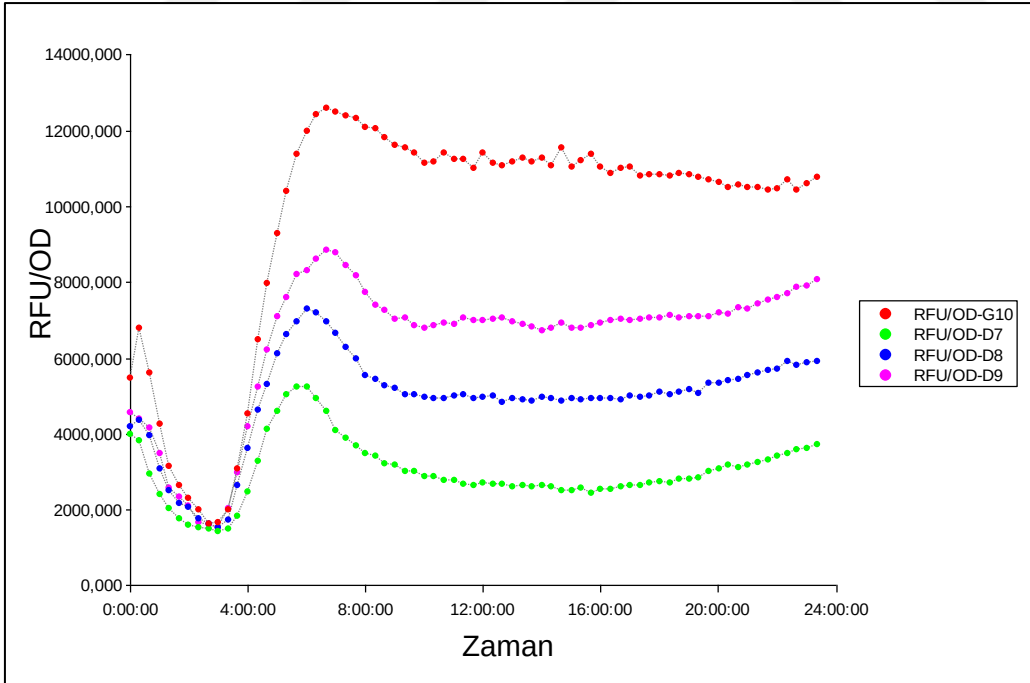
Şekil Ek 1.11. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Evernia divaricata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A7, A8, A9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



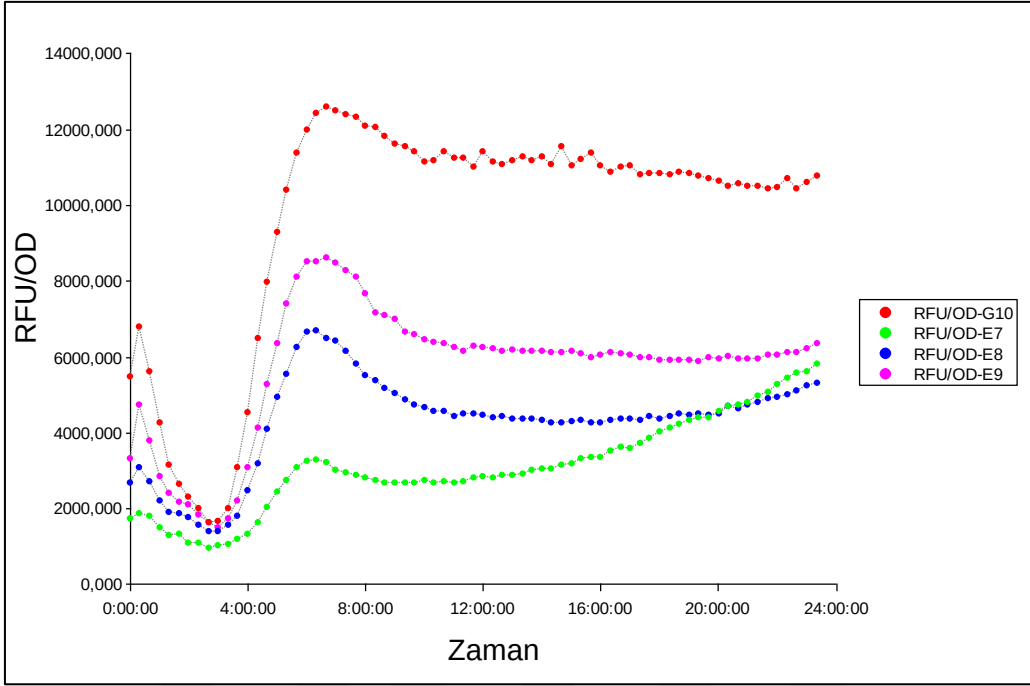
Şekil Ek 1.12. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B7, B8, B9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



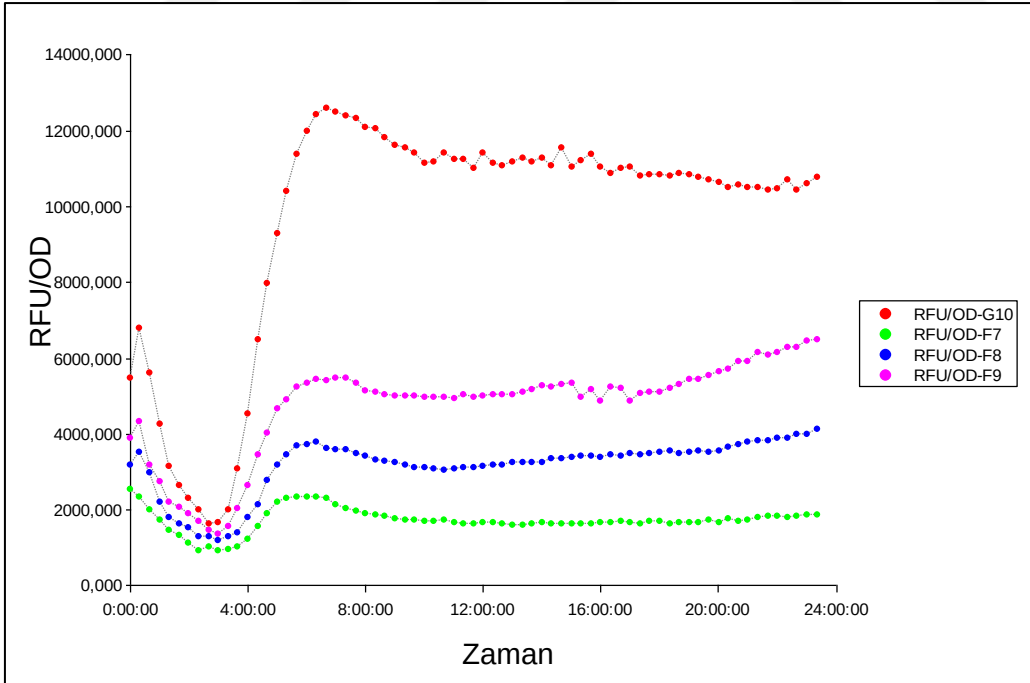
Şekil Ek 1.13. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (C7, C8, C9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



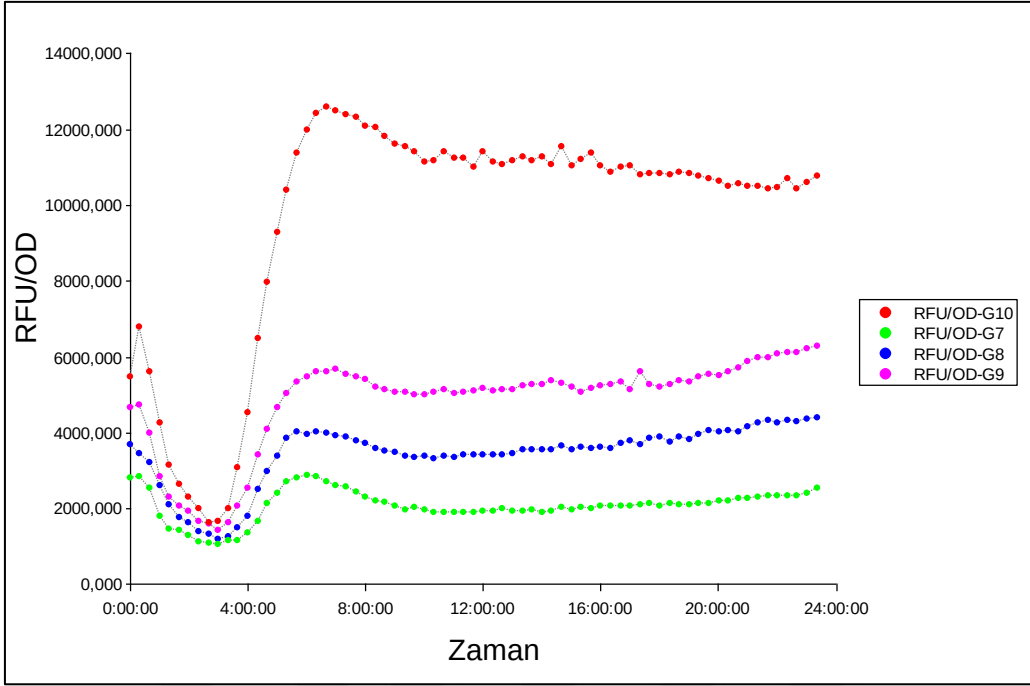
Şekil Ek 1.14. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (D7, D8, D9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



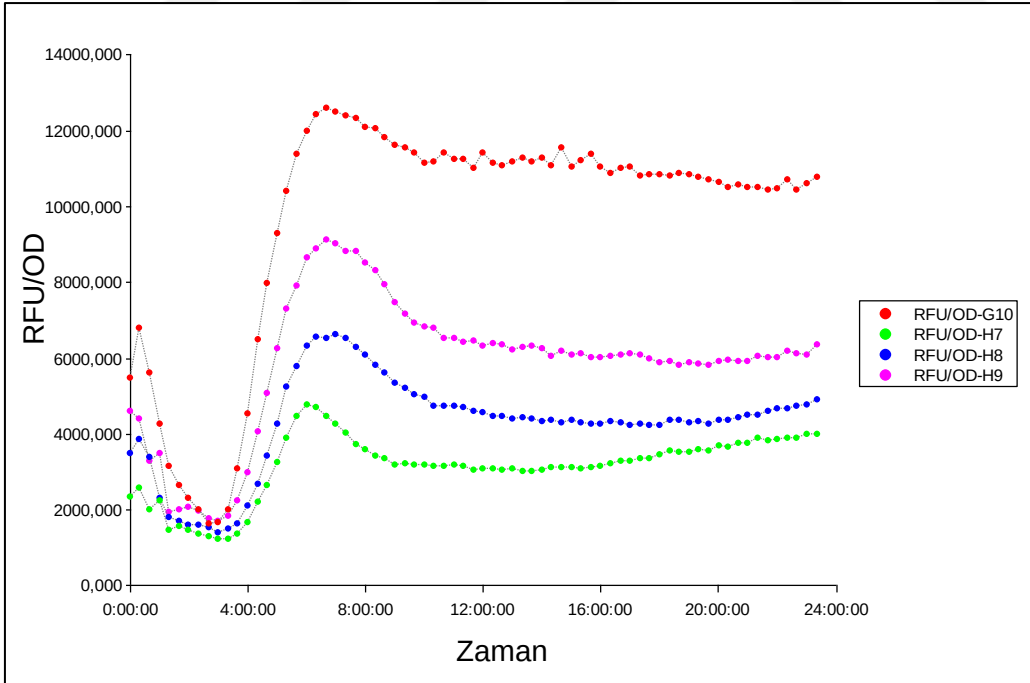
Şekil Ek 1.15. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Usnea barbata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (E7, E8, E9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



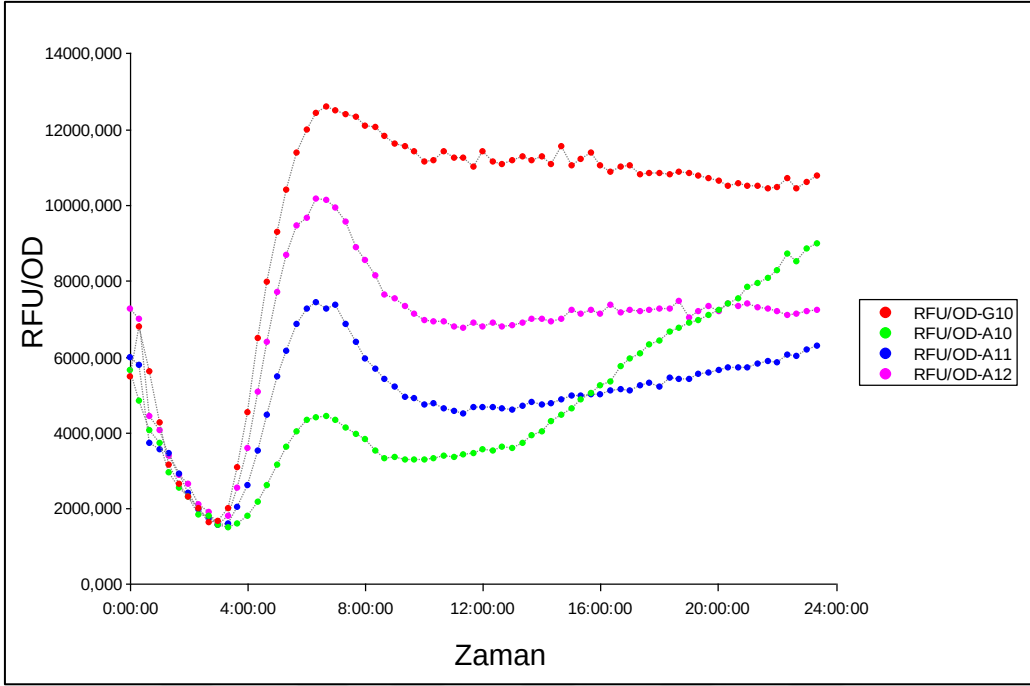
Şekil Ek 1.16. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F7, F8, F9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



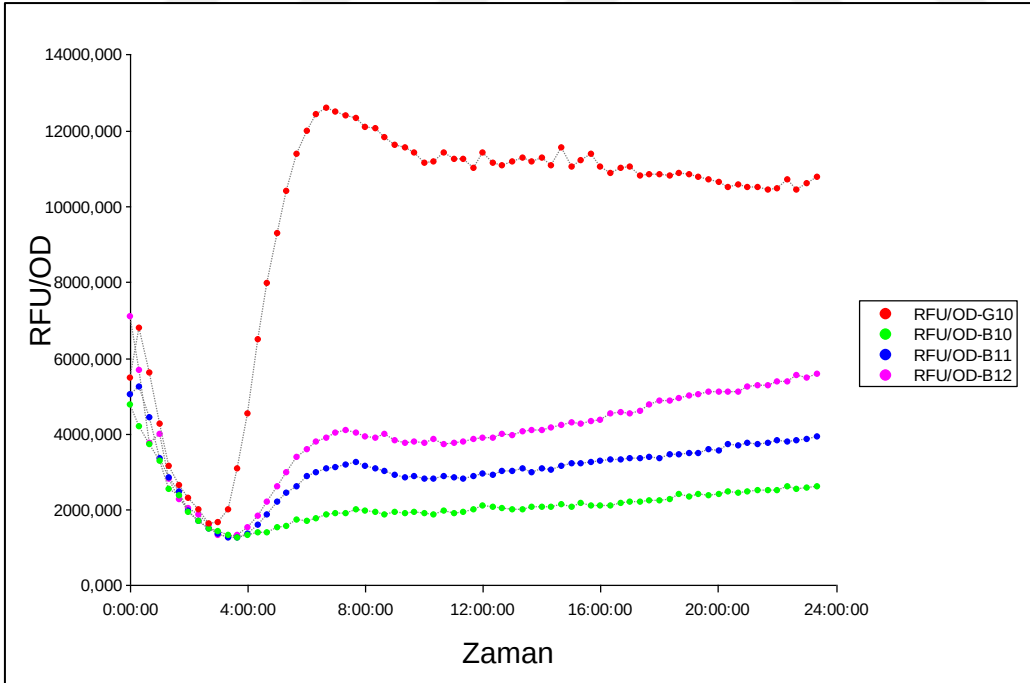
Şekil Ek 1.17. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Parmelia submontana* aseton özütüne 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G7, G8, G9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



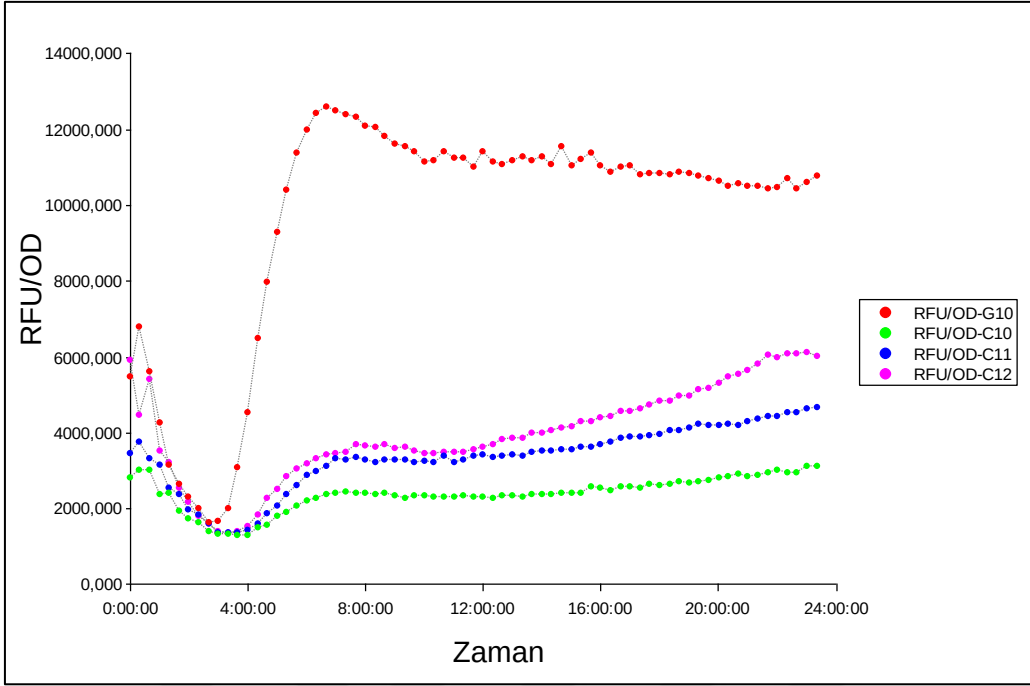
Şekil Ek 1.18. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (H7, H8, H9) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



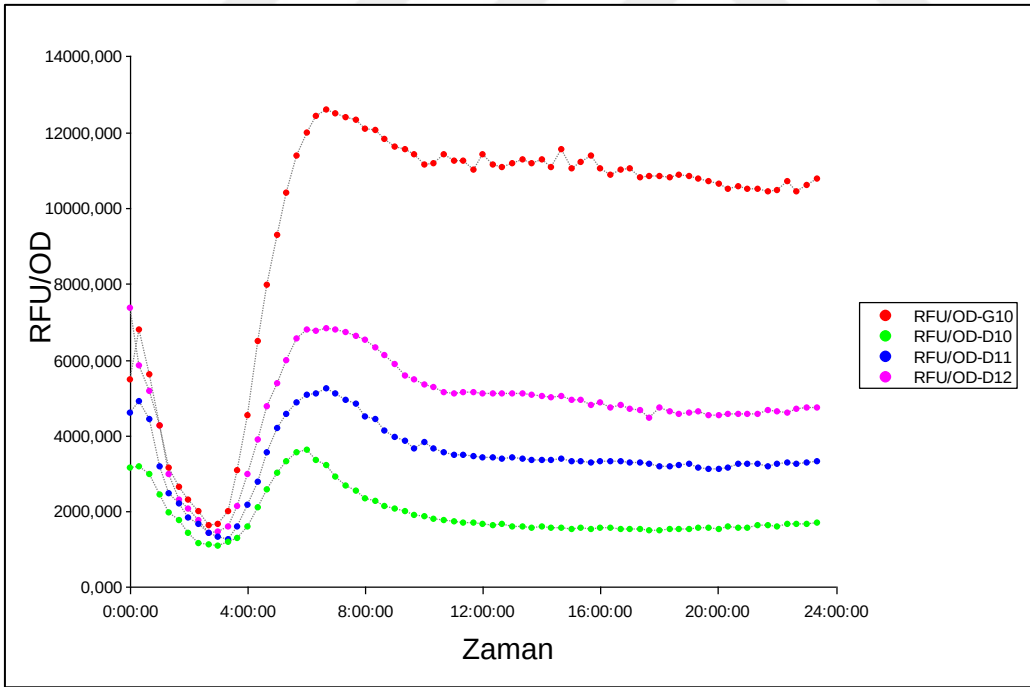
Şekil Ek 1.19. Bursa-Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Melanohalea exasperata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A10, A11, A12) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



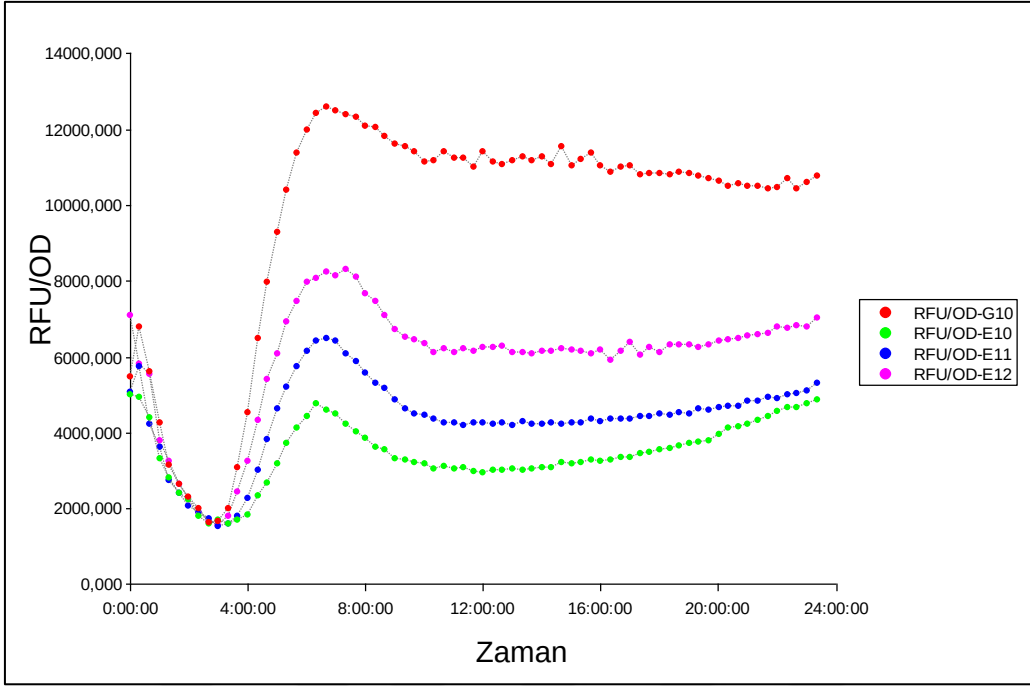
Şekil Ek 1.20. Bursa-Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B10,B11, B12) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



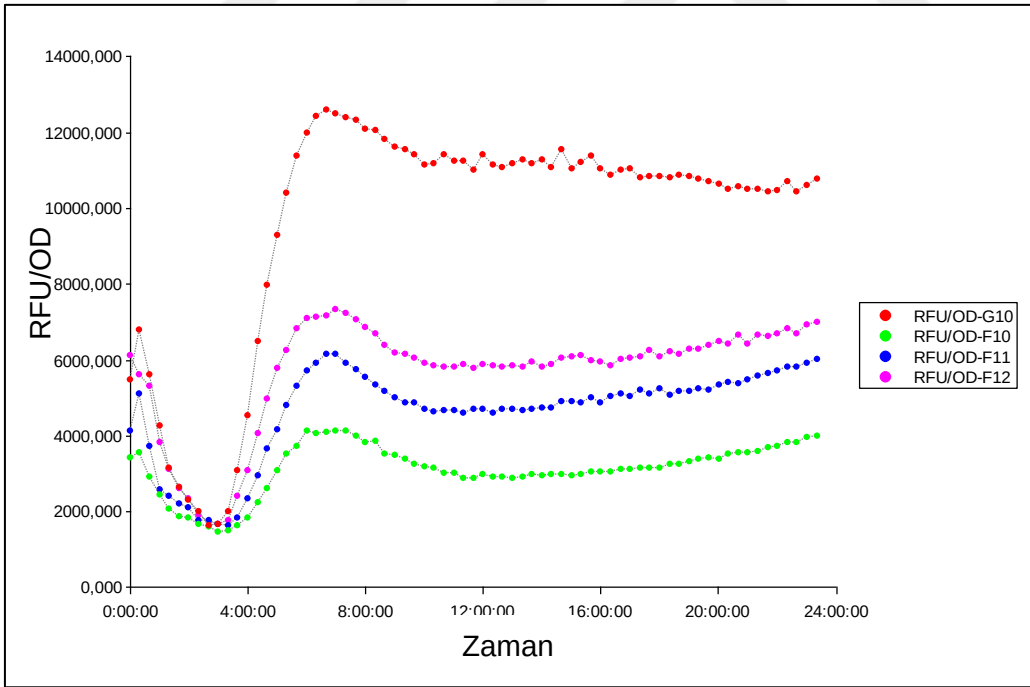
Şekil Ek 1.21. ABA03 kodlu *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (C10, C11, C12) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



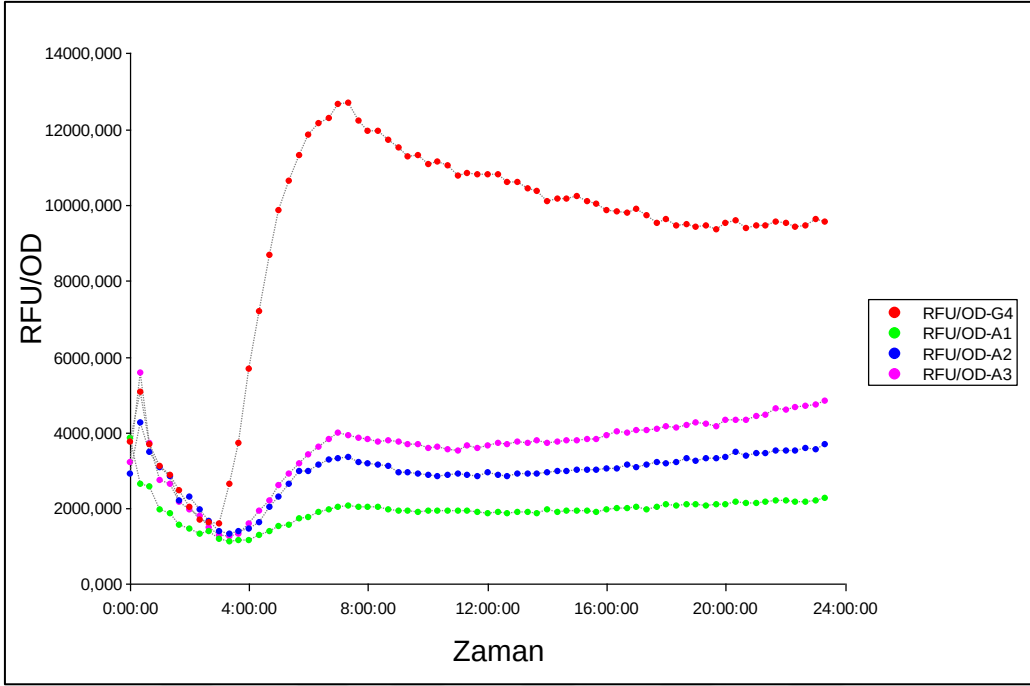
Şekil Ek 1.22. ALA01 kodlu *Lobaria pulmonaria* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (D10, D11, D12) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol)



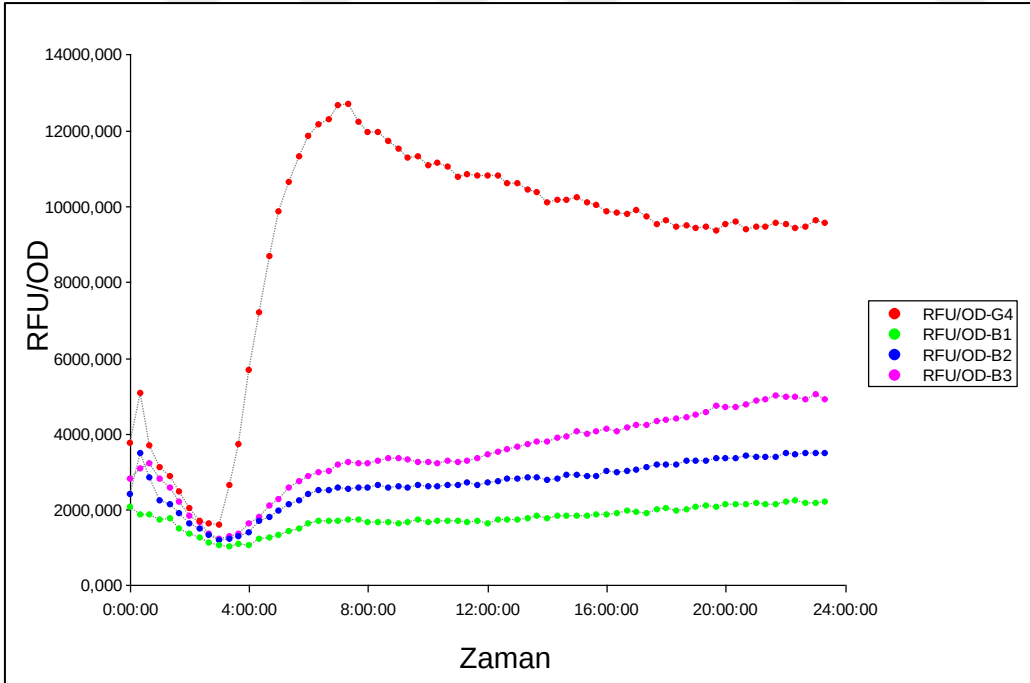
Şekil Ek 1.23. YG01 *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (E10, E11, E12) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



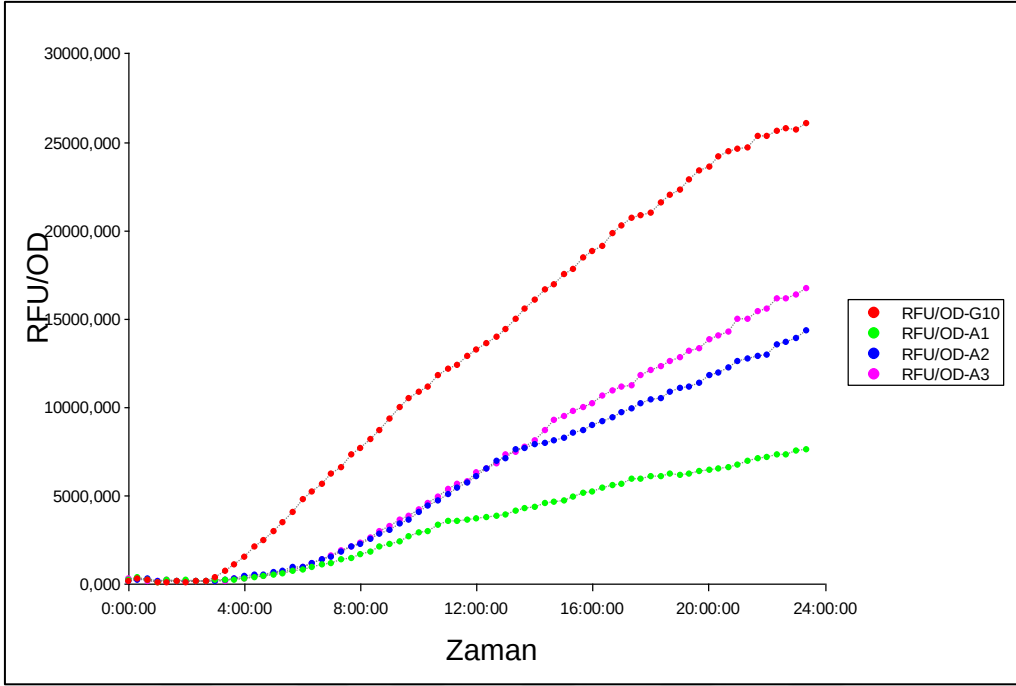
Şekil Ek 1.24. ALA02 kodlu *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (F10, F11, F12) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



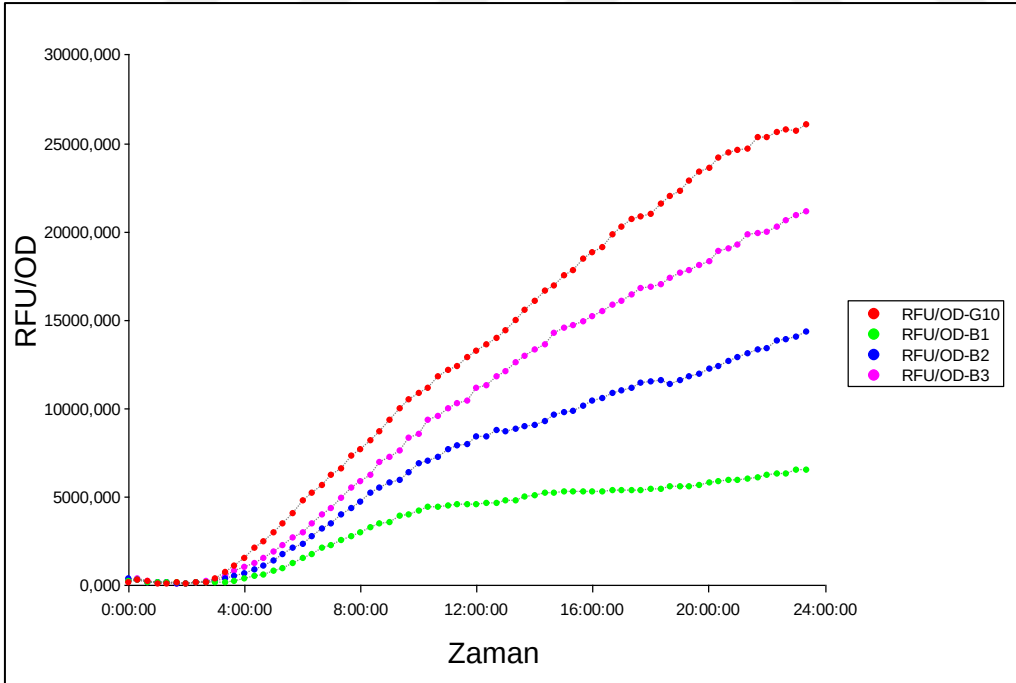
Şekil Ek 1.25. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Hypogymnia physodes* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A1, A2, A3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G4: Kontrol).



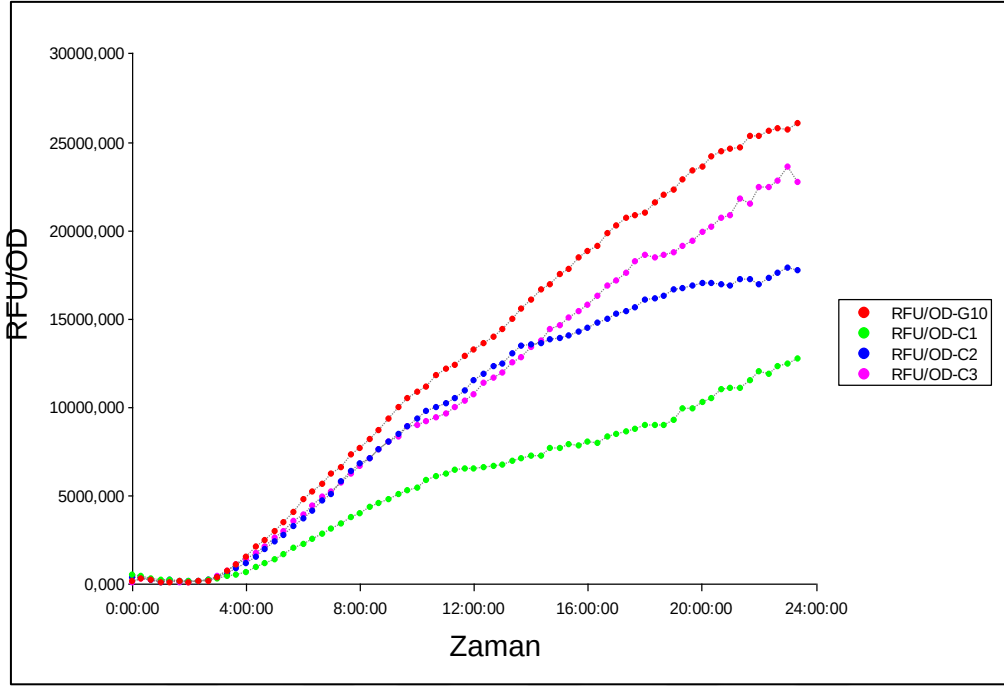
Şekil Ek 1.26. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B1, B2, B3) dozlarının *lasB* sistemi üzerindeki QS etkisi (G4: Kontrol).



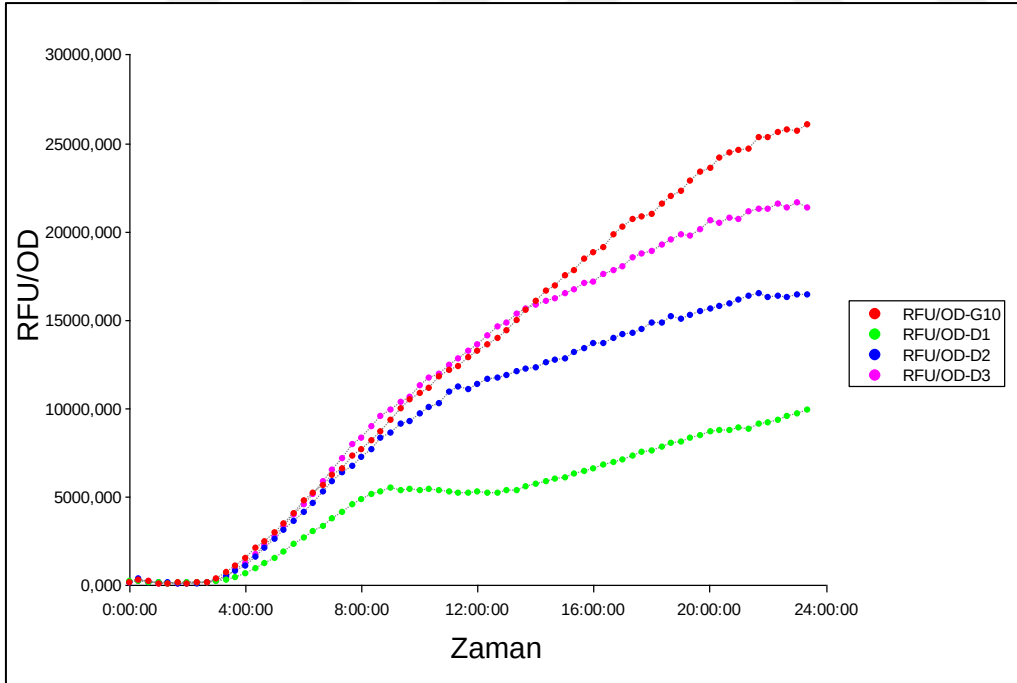
Şekil Ek 1.27. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A1, A2, A3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



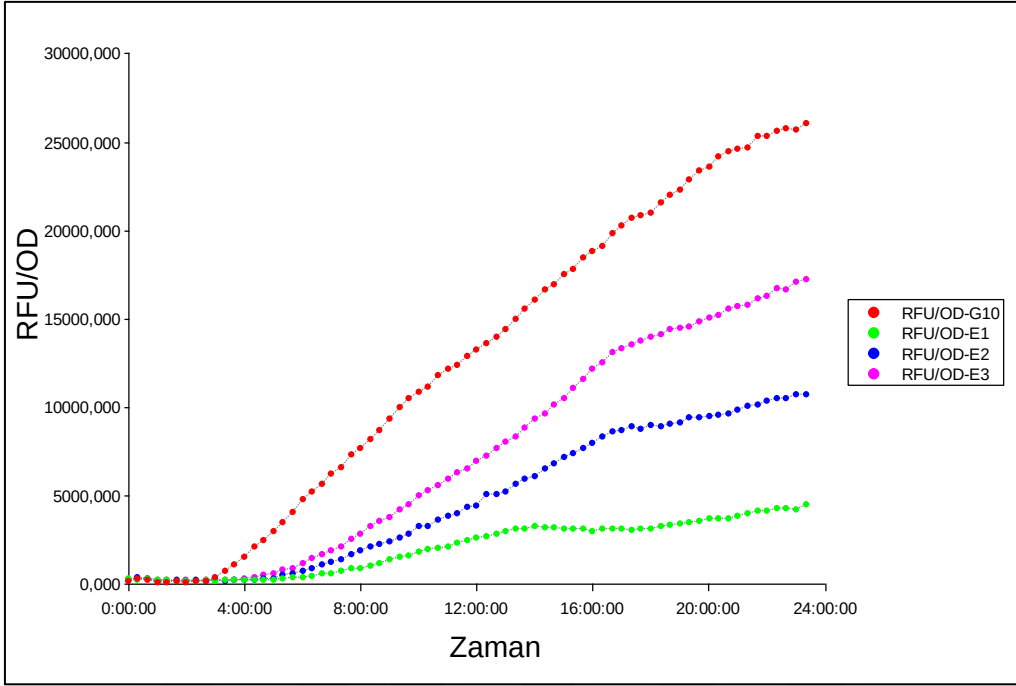
Şekil Ek 1.28. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Ramalina farinacea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B1, B2, B3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



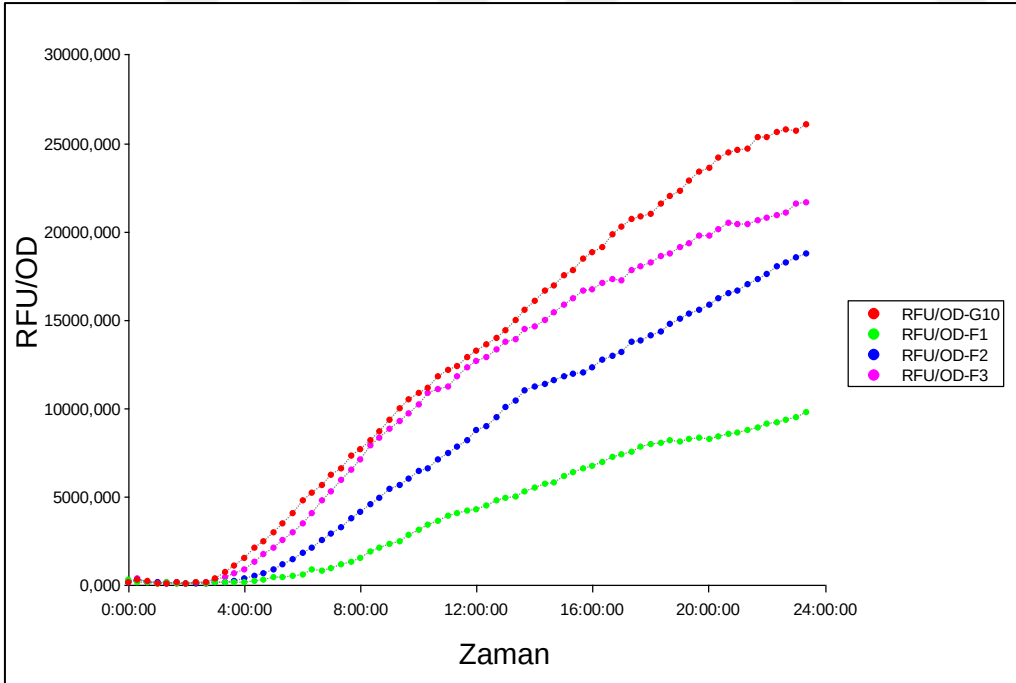
Şekil Ek 1.29. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (C1, C2, C3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



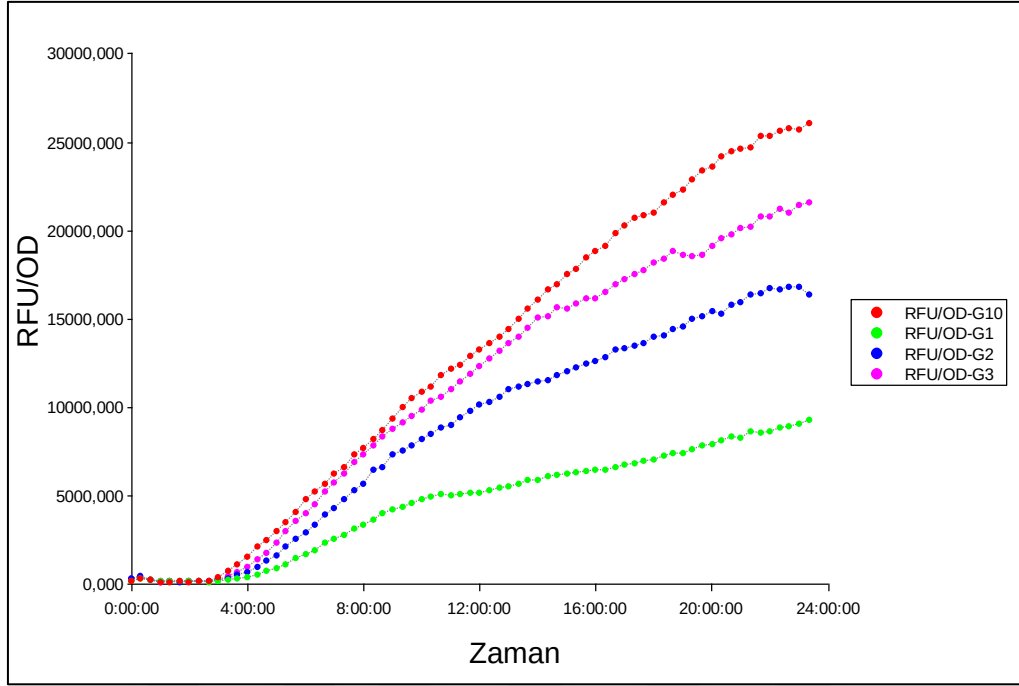
Şekil Ek 1.30. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Usnea florida* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (D1, D2, D3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol)



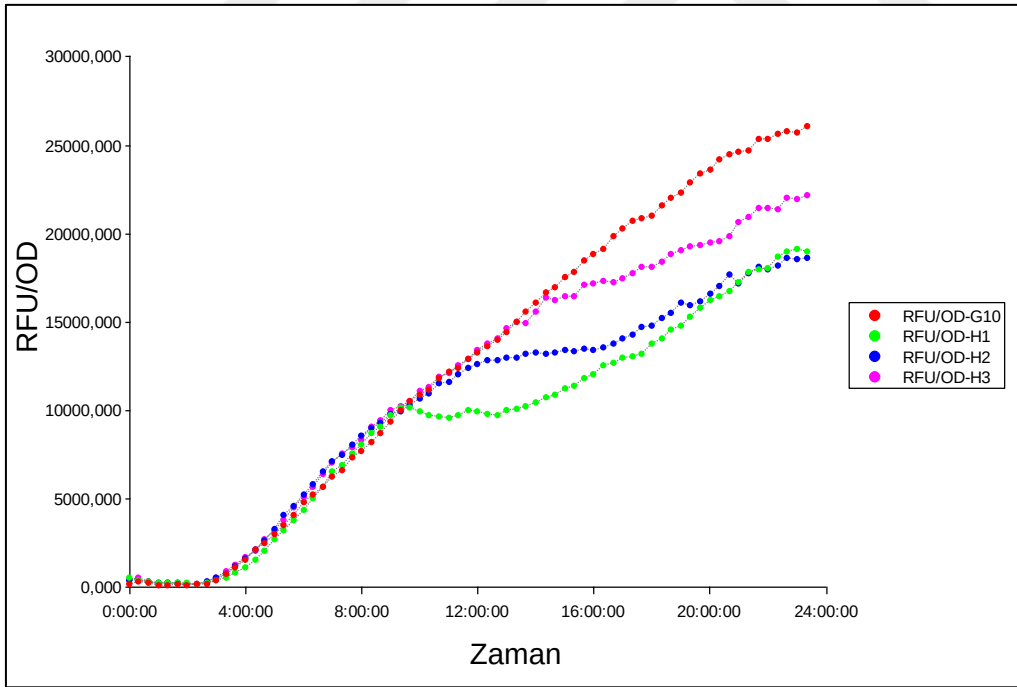
Şekil Ek 1.31. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Bryoria capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (E1, E2, E3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



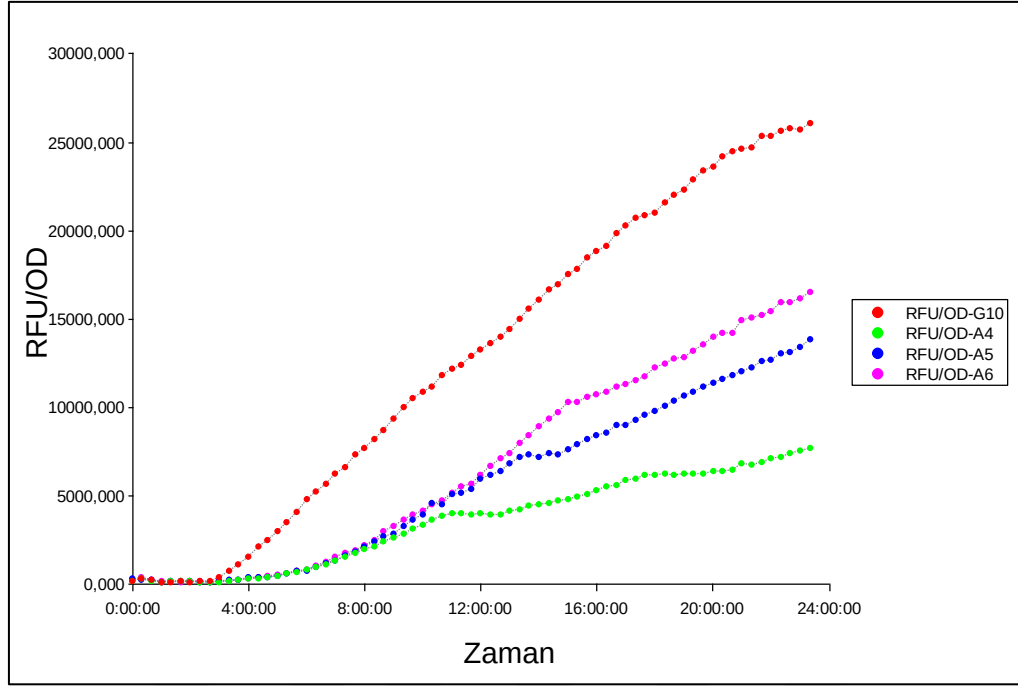
Şekil Ek 1.32. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F1, F2, F3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



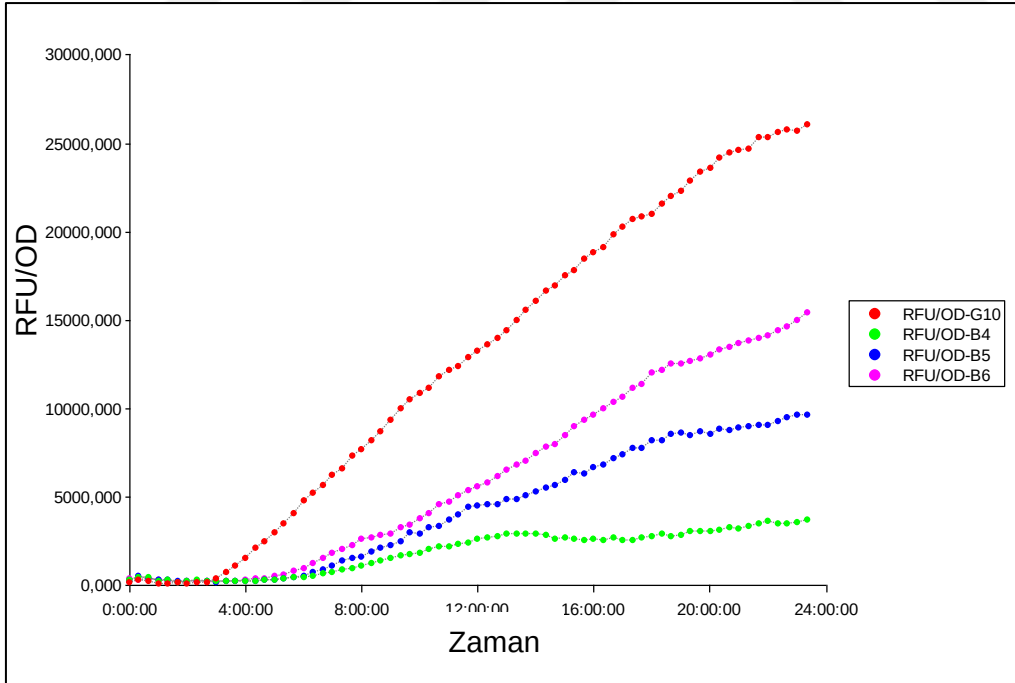
Şekil Ek 1.33. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G1, G2, G3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



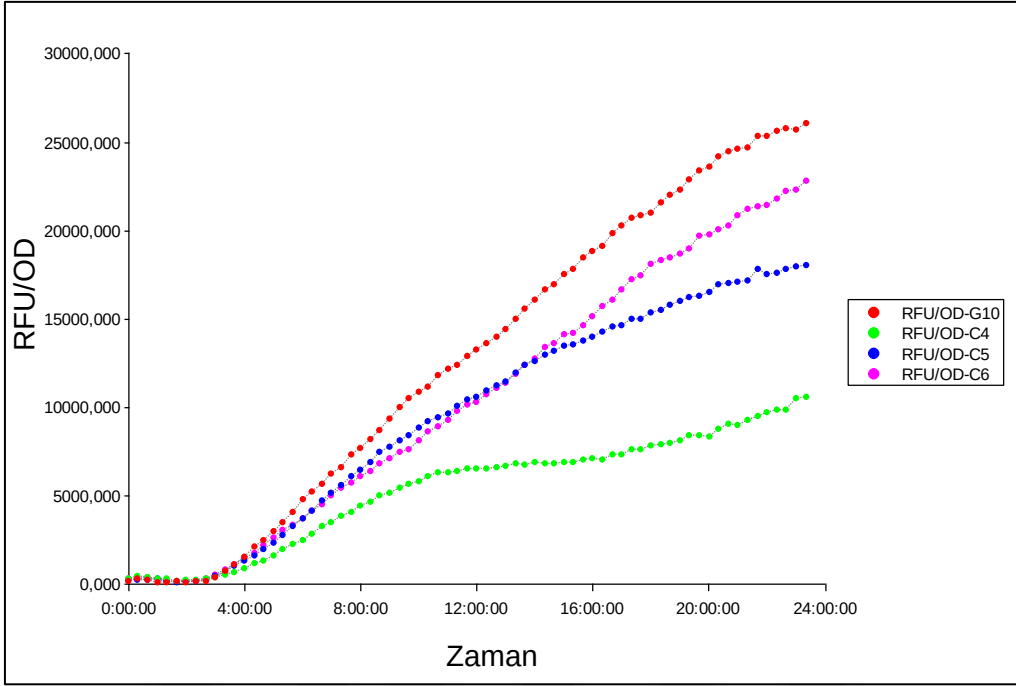
Şekil Ek 1.34. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Evernia divaricata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (H1, H2, H3) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



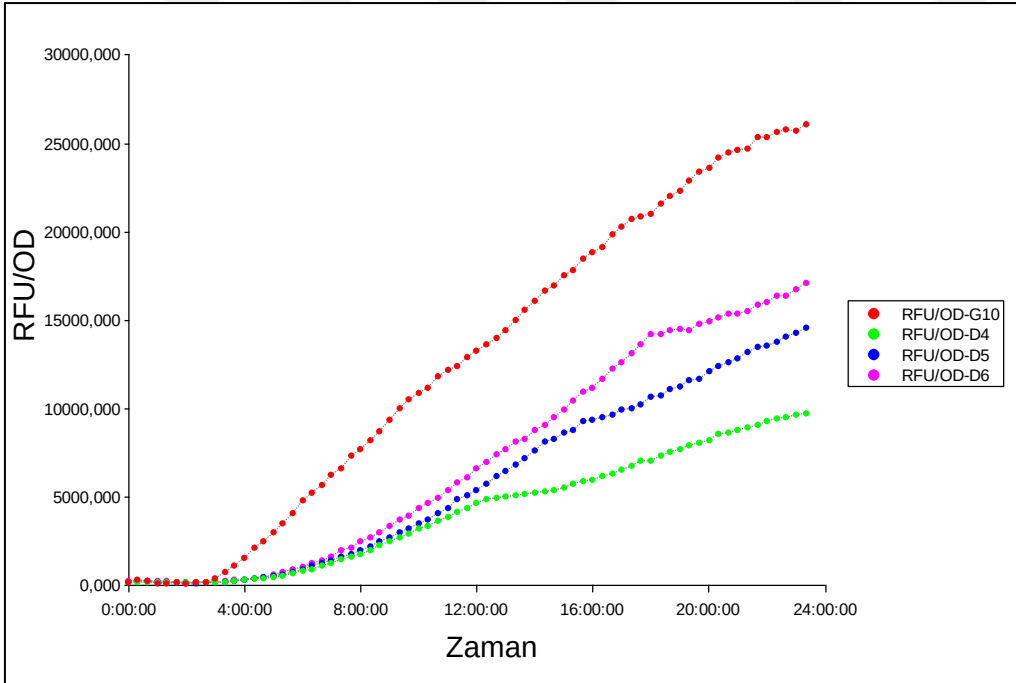
Şekil Ek 1.35. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A4, A5, A6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



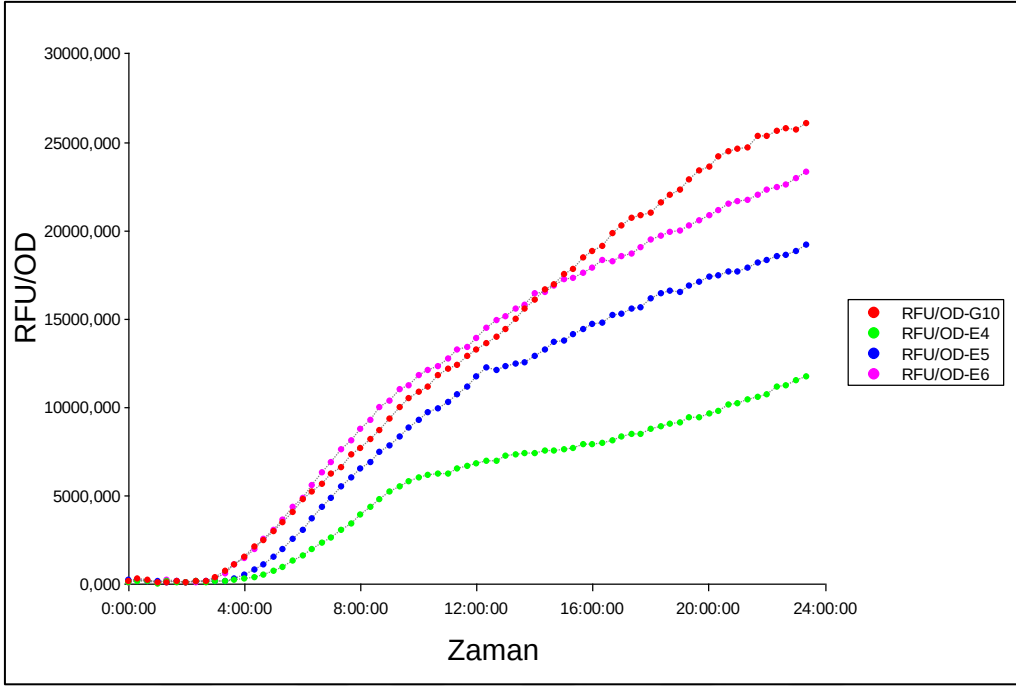
Şekil Ek 1.36. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Bryoria capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B4, B5, B6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



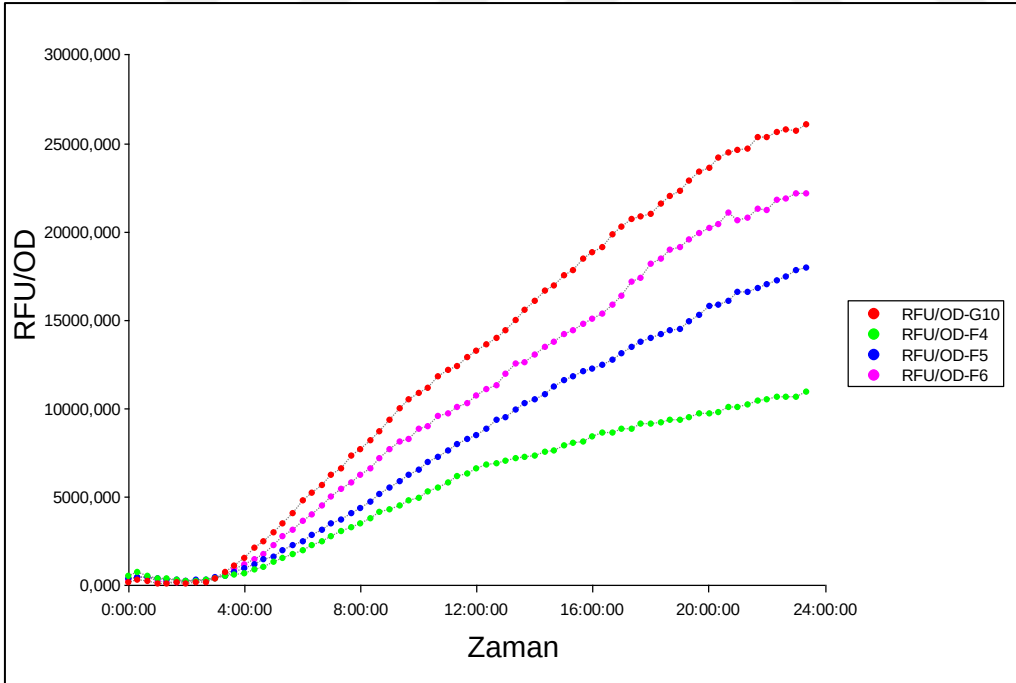
Şekil Ek 1.37. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (C4, C5, C6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



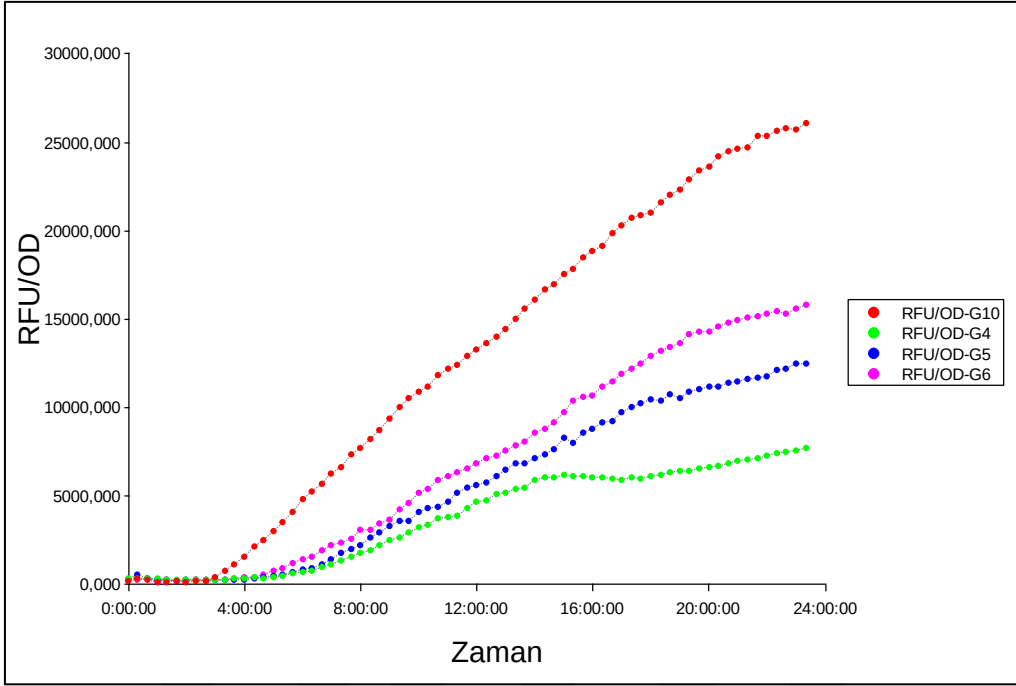
Şekil Ek 1.38. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (D4, D5, D6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



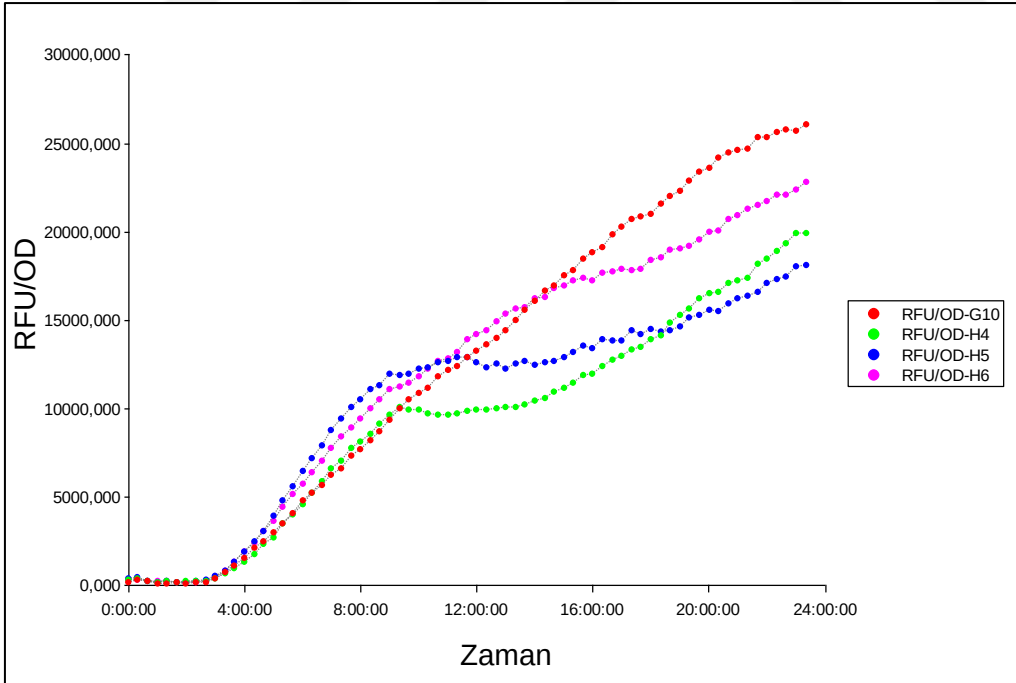
Şekil Ek 1.39. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (E4, E5, E6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



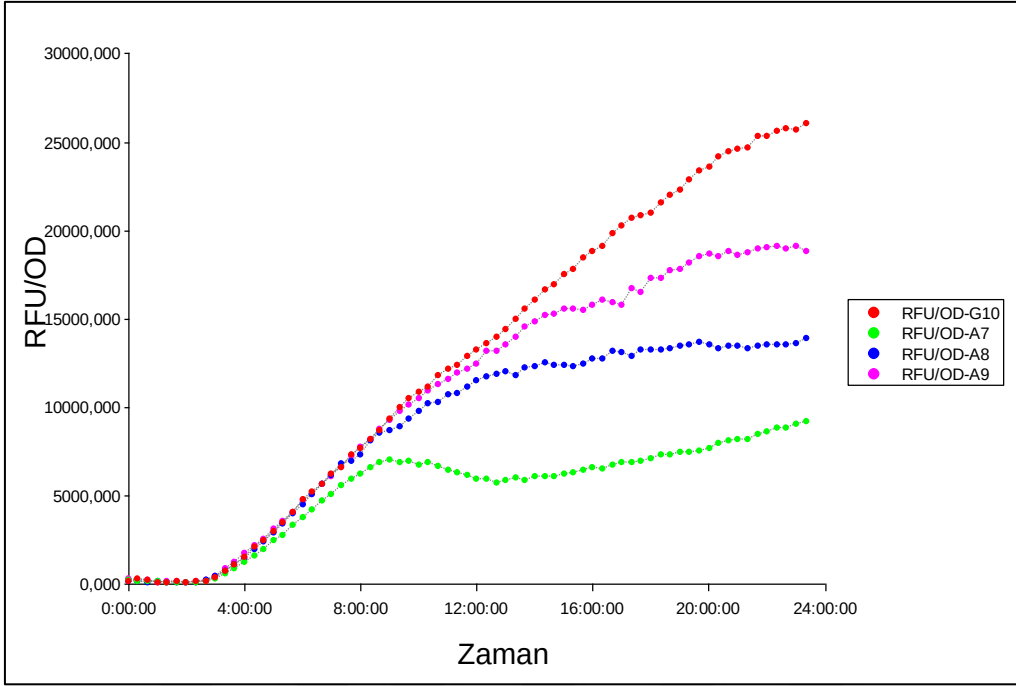
Şekil Ek 1.40. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Evernia prunastri* aseton özütüne 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F4, F5, F6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



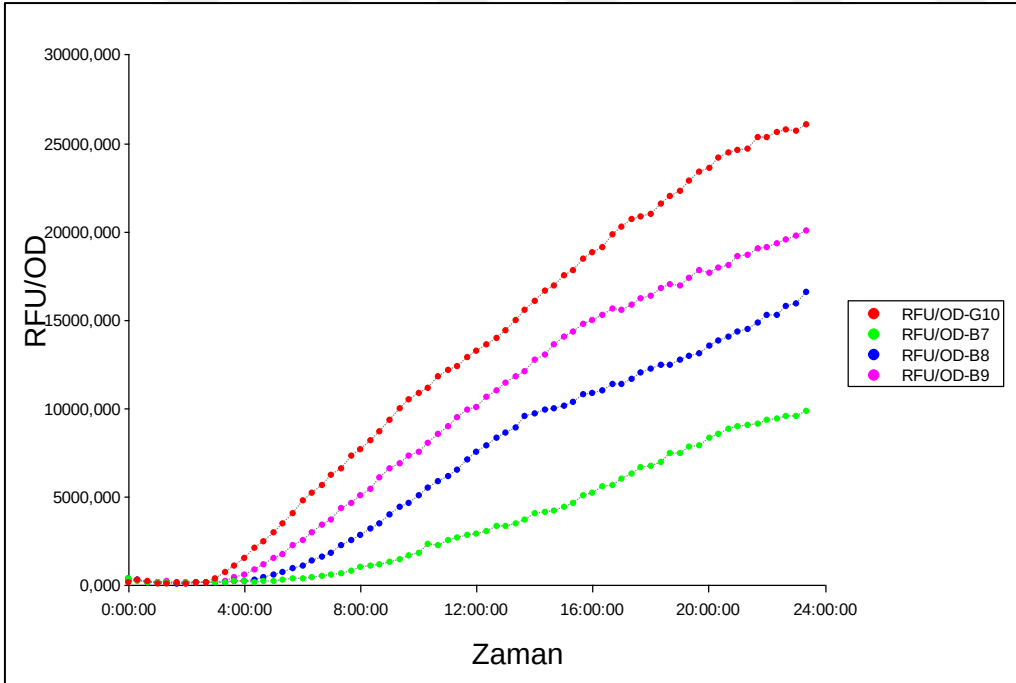
Şekil Ek 1.41. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Bryoria capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G4, G5, G6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



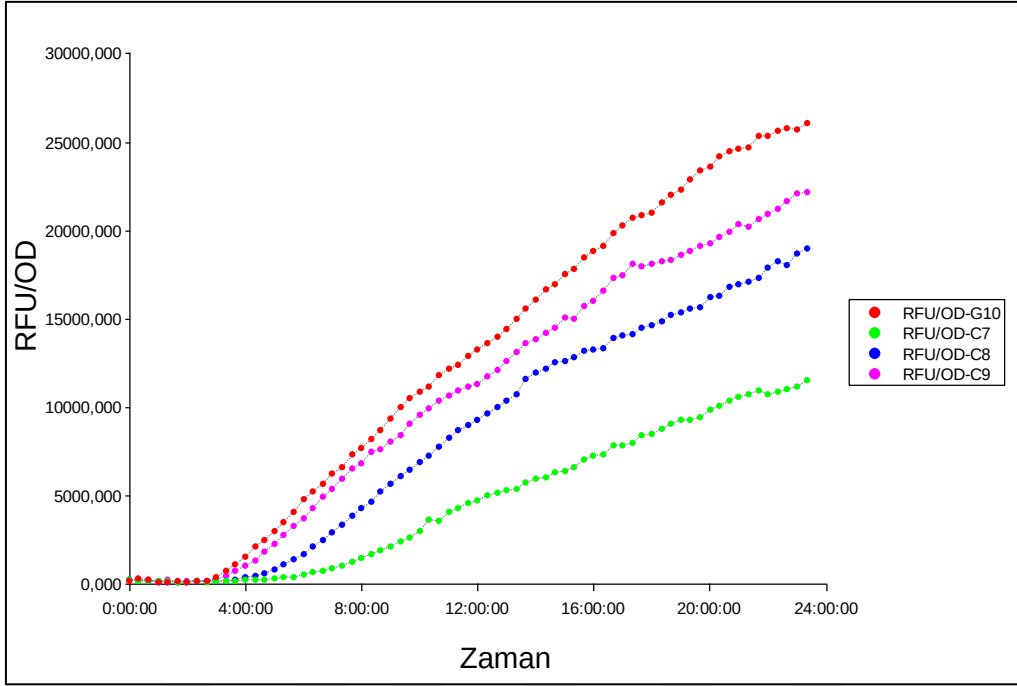
Şekil Ek 1.42. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Evernia divaricata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (H4, H5, H6) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



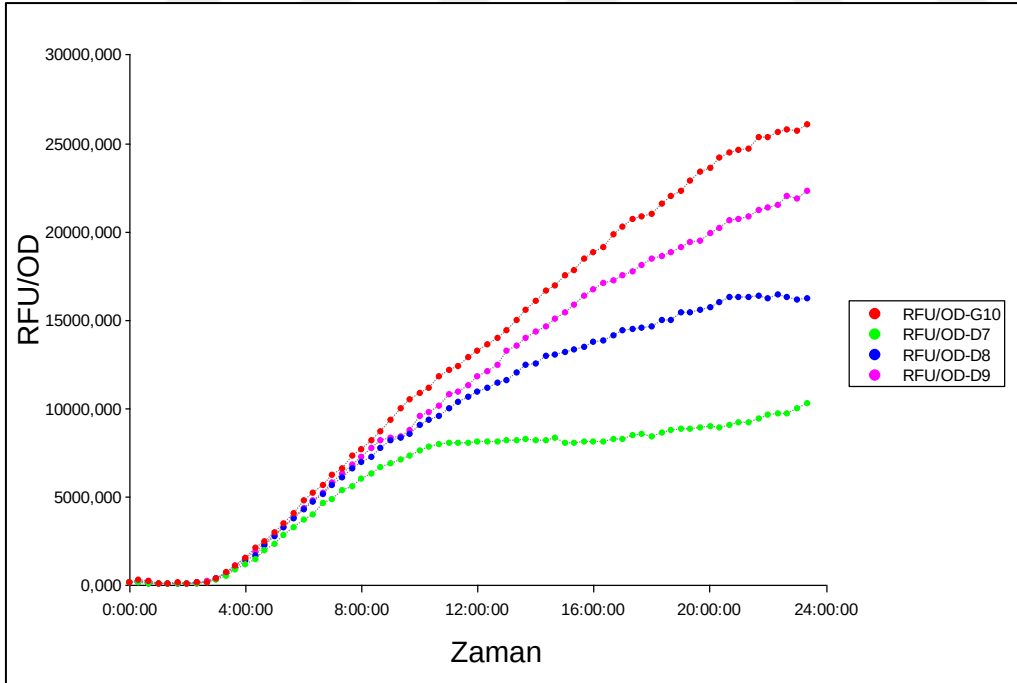
Şekil Ek 1.43. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (A7, A8, A9) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



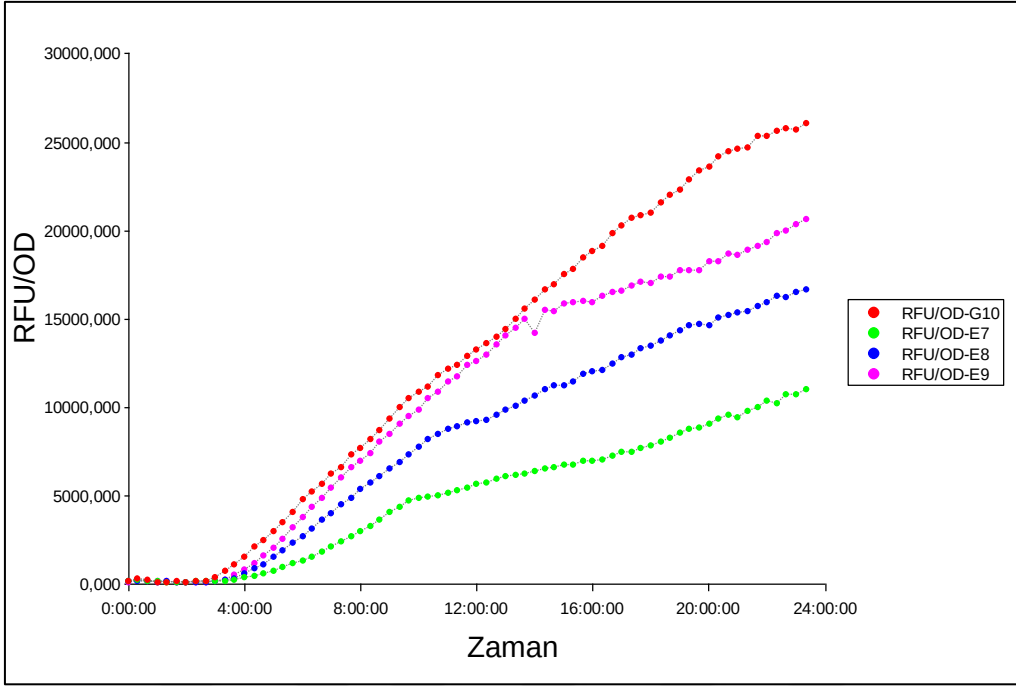
Şekil Ek 1.44. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (B7, B8, B9) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



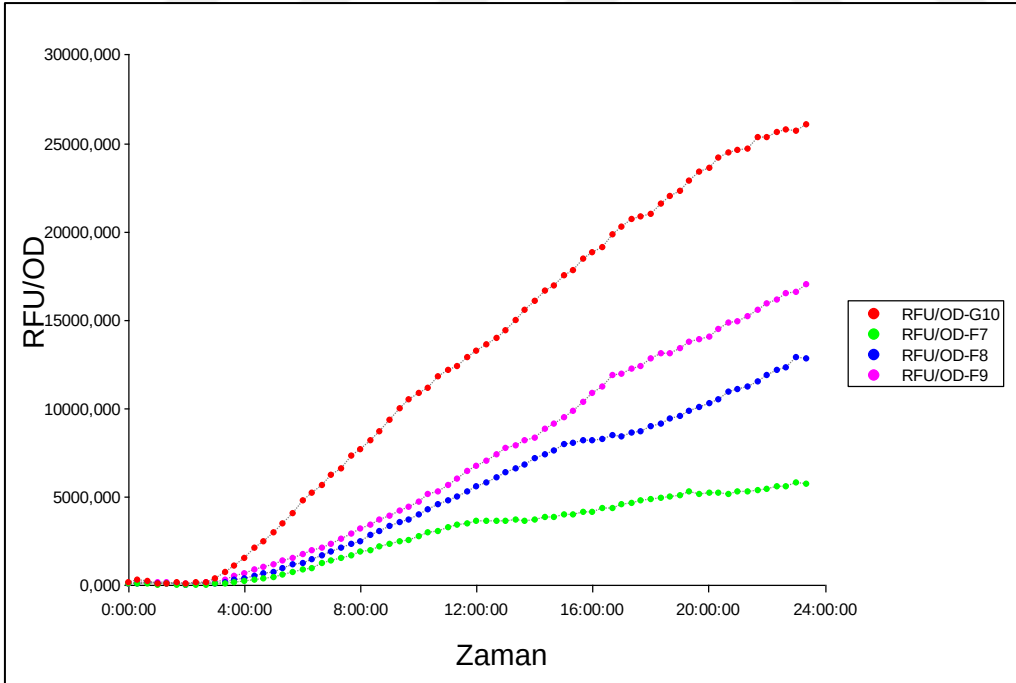
Şekil Ek 1.45. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (C7, C8, C9) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



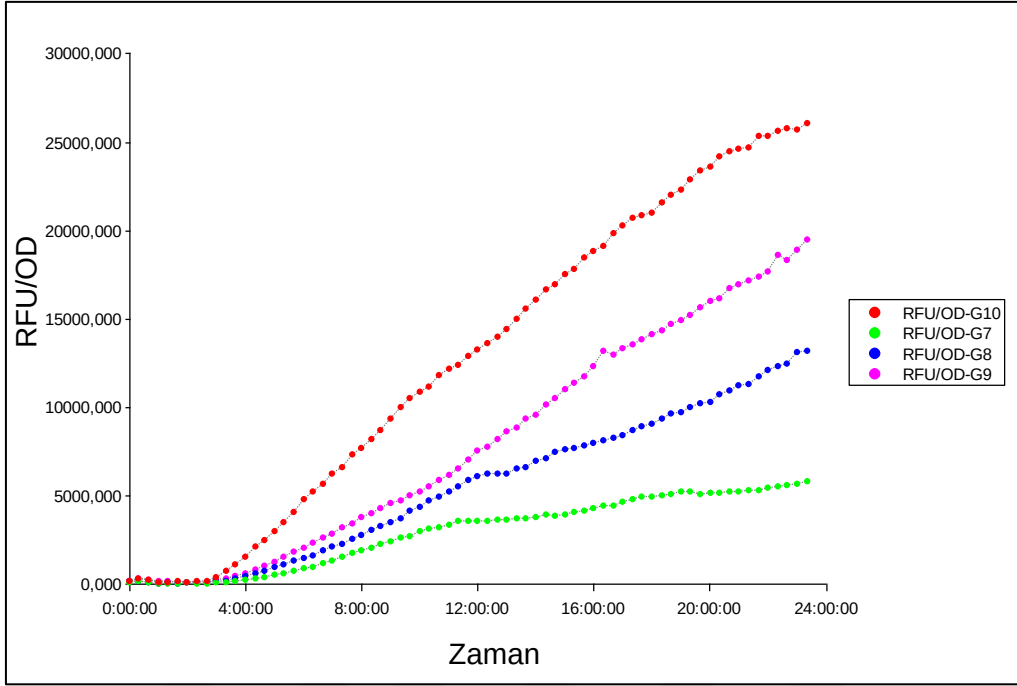
Şekil Ek 1.46. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Usnea barbata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (D7, D8, D9) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol)



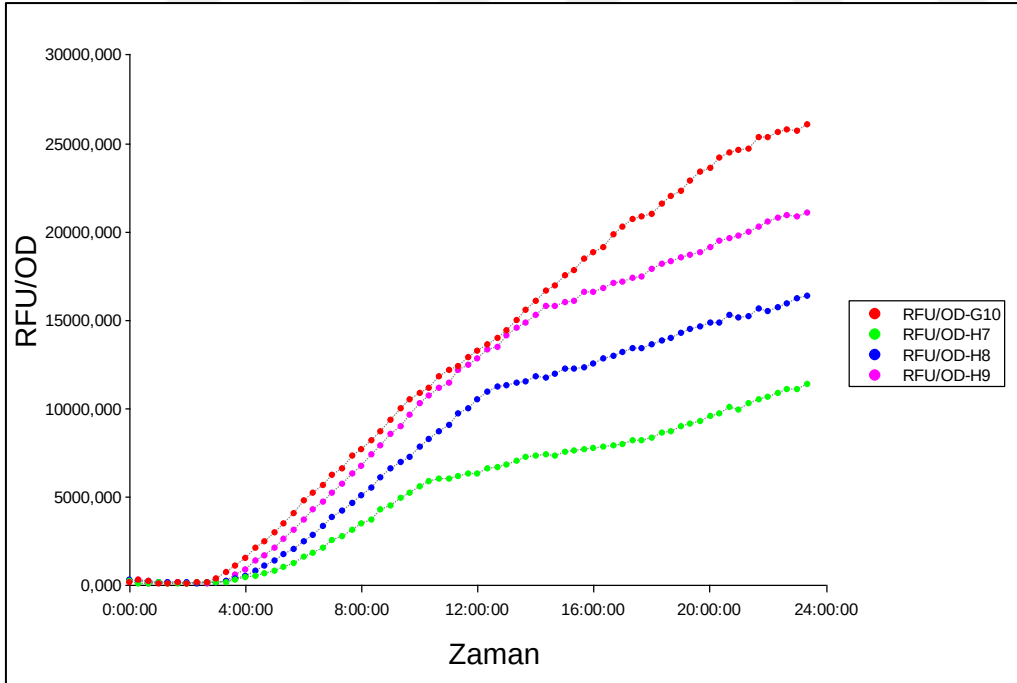
Şekil Ek 1.47. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (E7, E8, E9) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



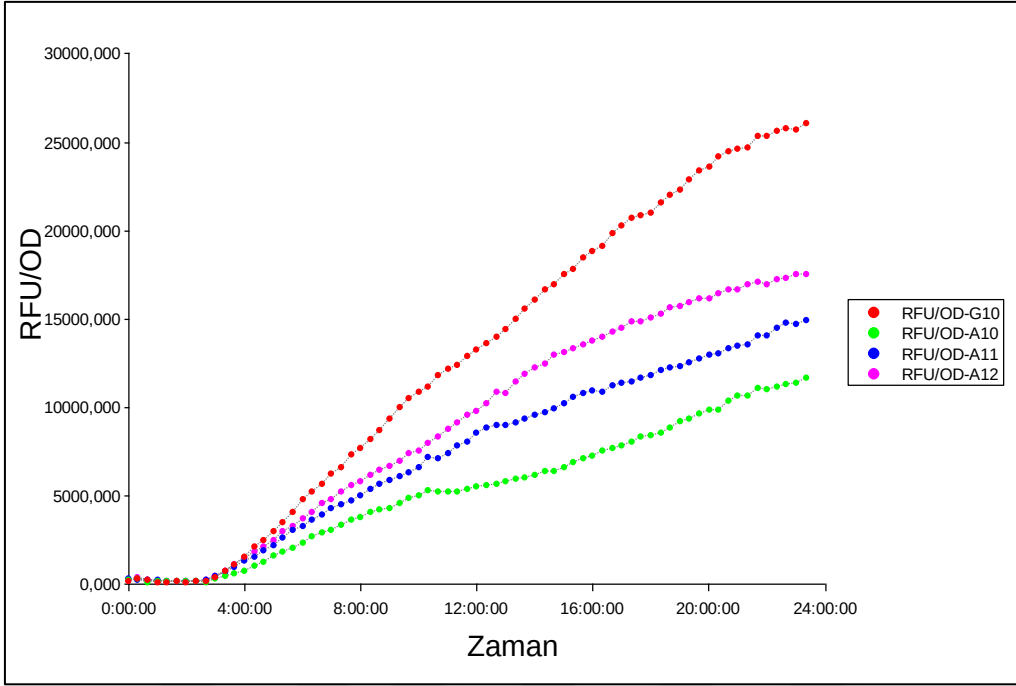
Şekil Ek 1.48. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Parmelia submontana* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F7, F8, F9) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



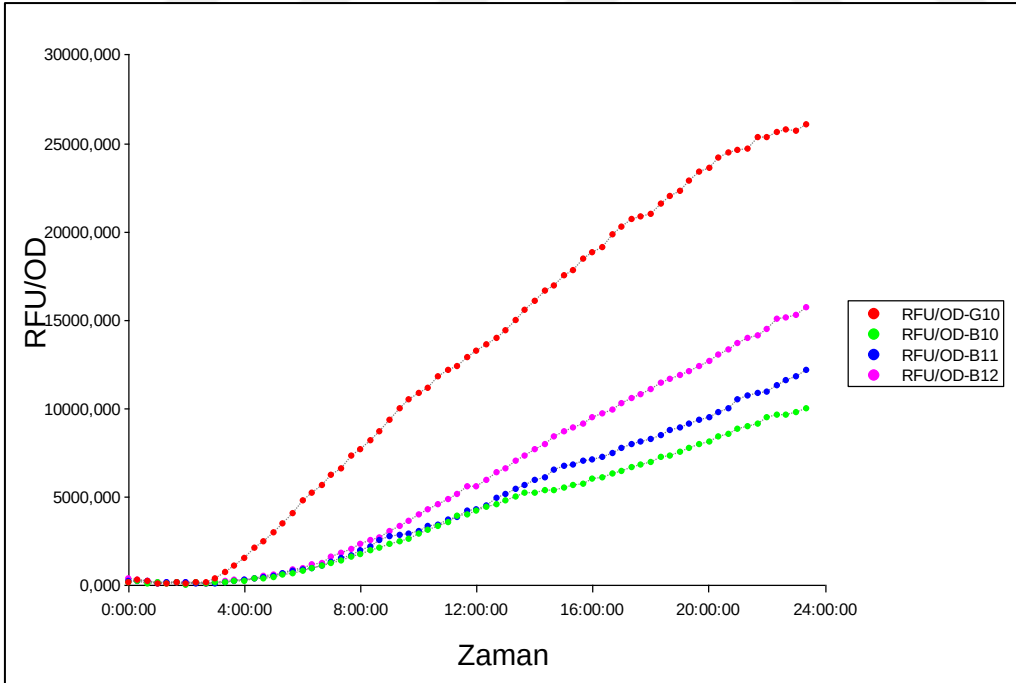
Şekil Ek 1.49. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Parmelia sulcata* aseton özütüne 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (G7, G8, G9) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



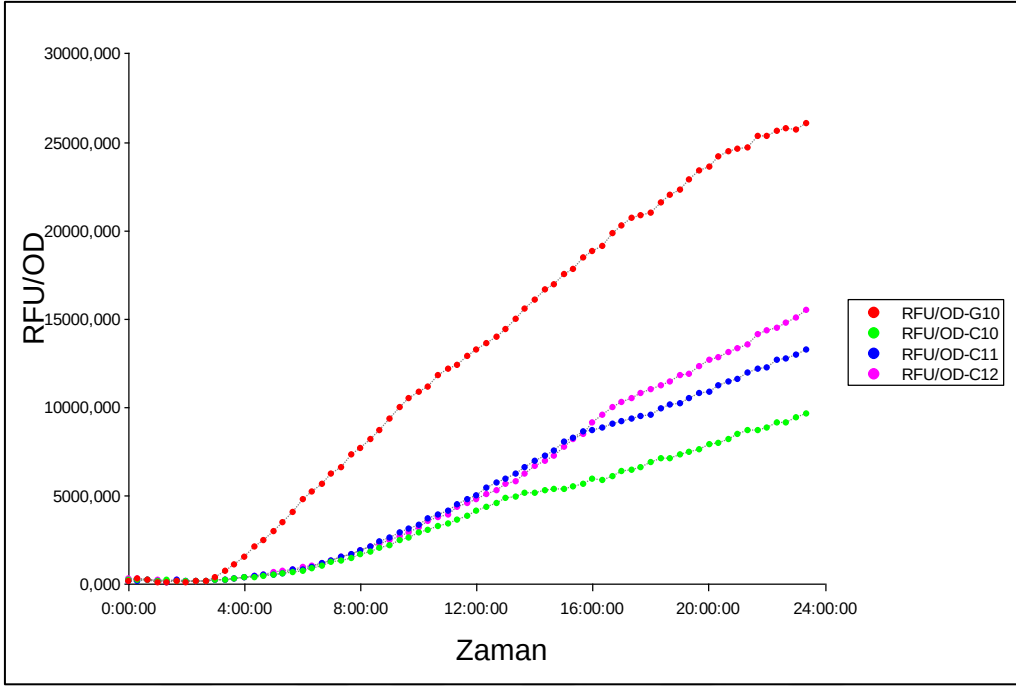
Şekil Ek 1.50. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (H7, H8, H9) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



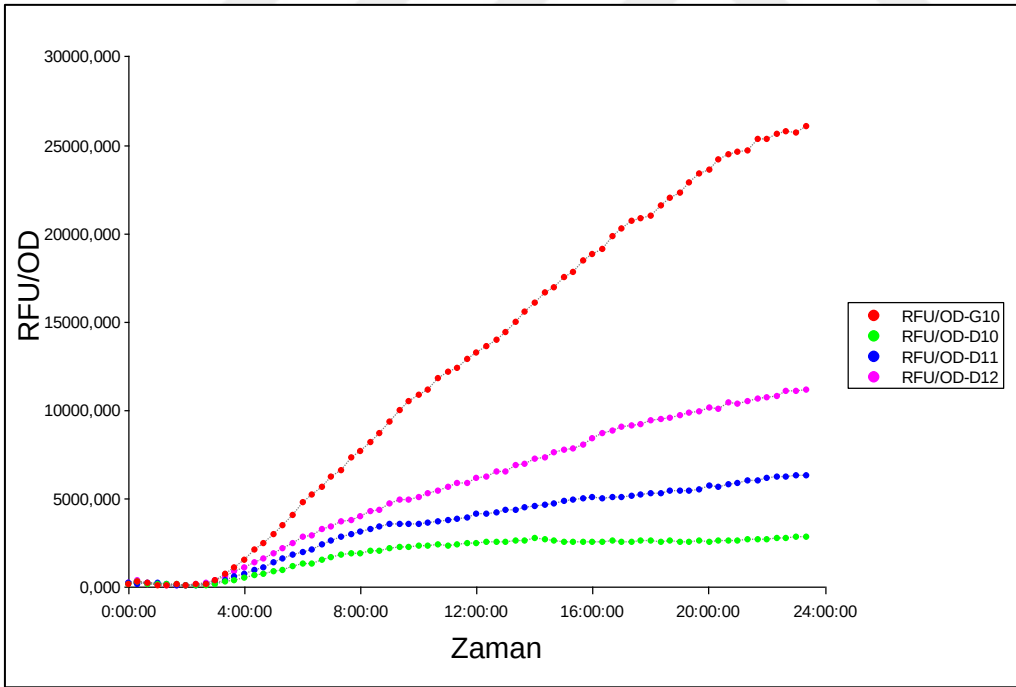
Şekil Ek 1.51. Bursa-Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Melanohalea exasperata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (A10, A11, A12) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



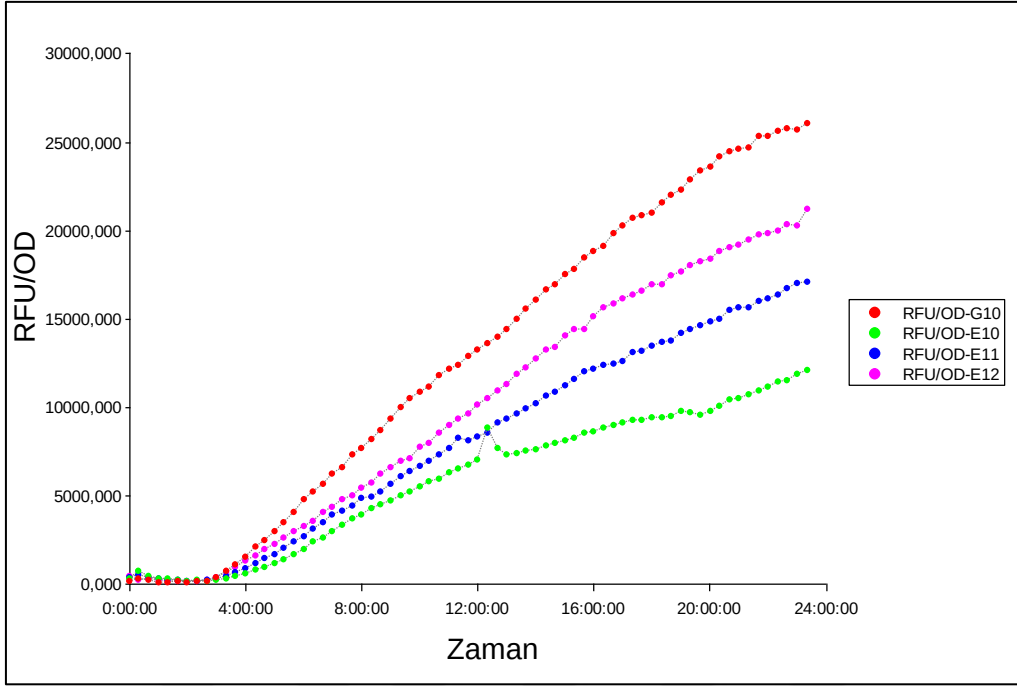
Şekil Ek 1.52. Bursa-Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (B10, B11, B12) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



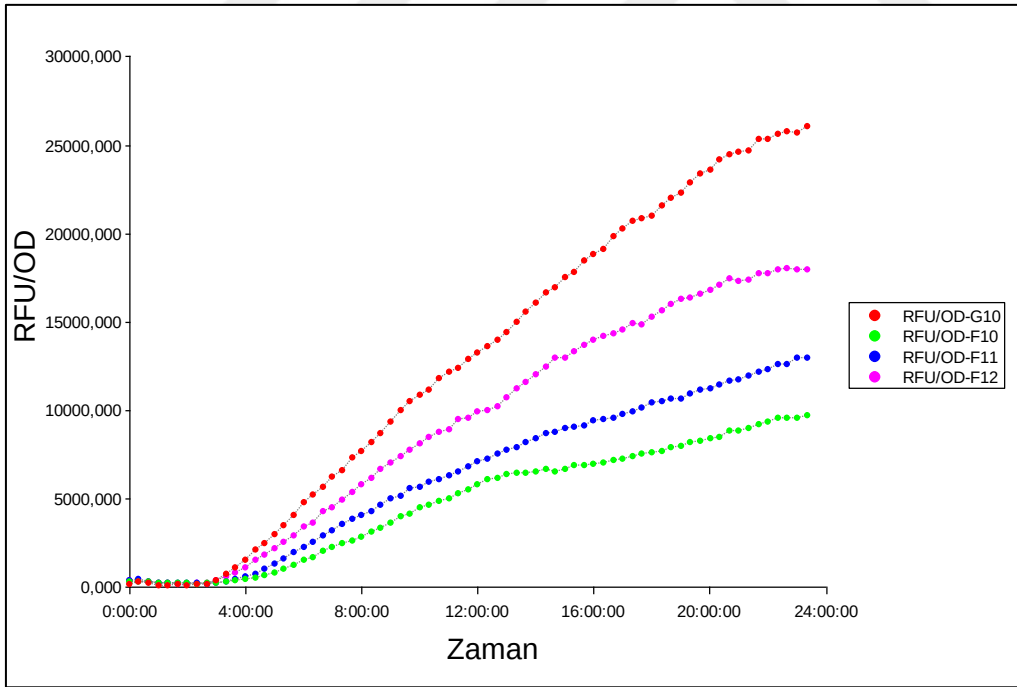
Şekil Ek 1.53. ABA03 kodlu *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (C10, C11, C12) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



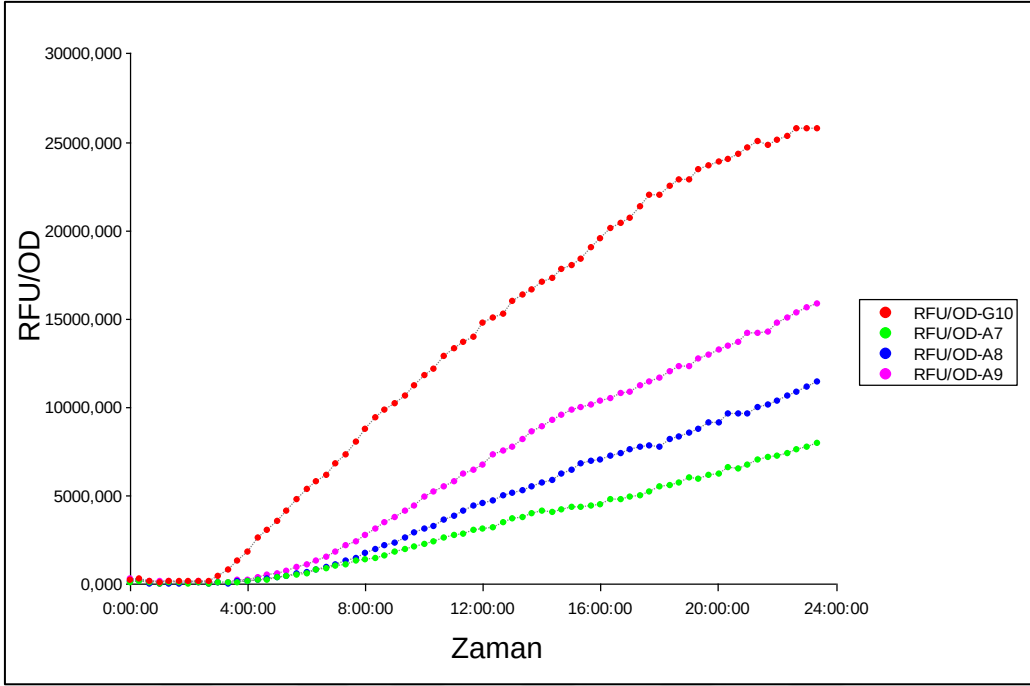
Şekil Ek 1.54. ALA01 kodlu *Lobaria pulmonaria* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (D10, D11, D12) dozlarının *rhIA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



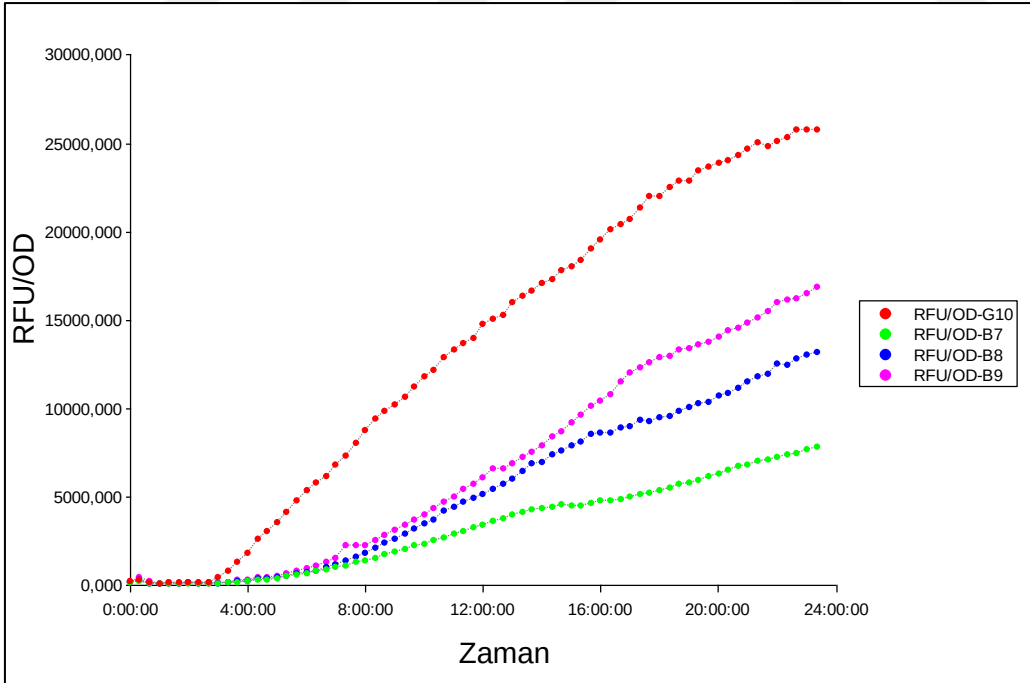
Şekil Ek 1.55. YG01 *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (E10, E11, E12) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).



Şekil Ek 1.56. ALA02 kodlu *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ (F10, F11, F12) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).

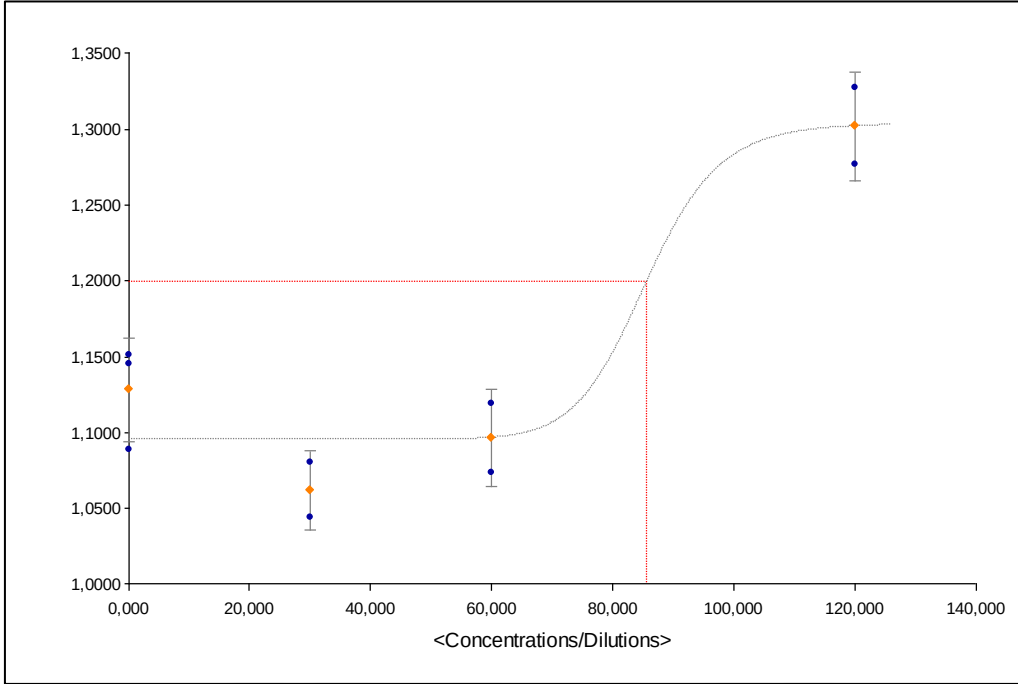


Şekil Ek 1.57. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Hypogymnia physodes* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (A7, A8, A9) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).

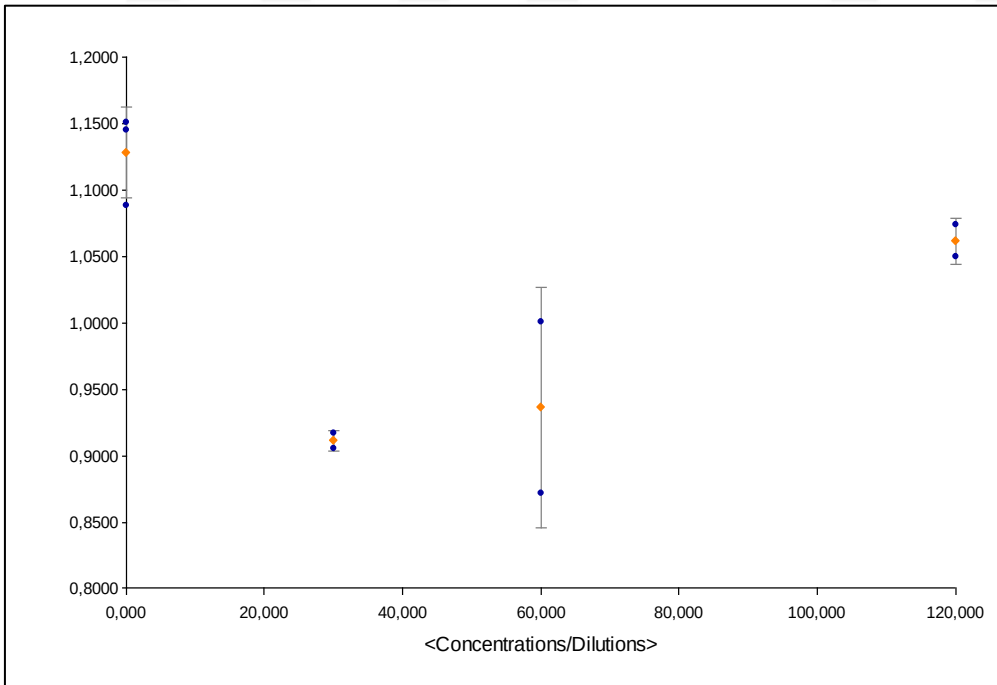


Şekil Ek 1.58. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml (B7, B8, B9) dozlarının *rhlA* sistemi üzerindeki QS etkisi (G10: Kontrol).

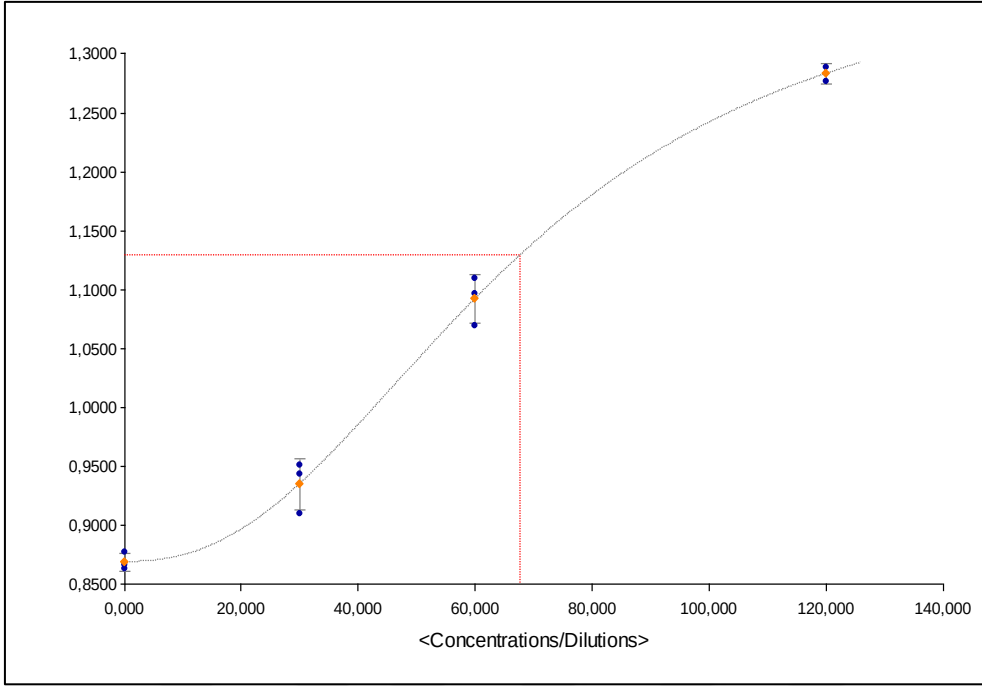
EK-2



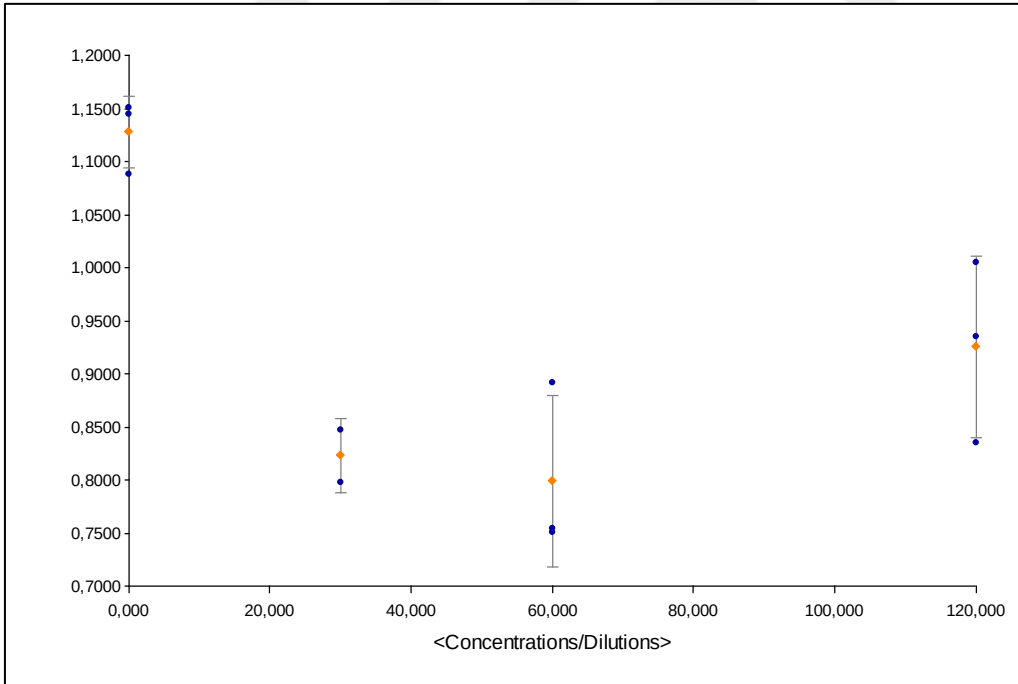
Şekil Ek 2.1. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



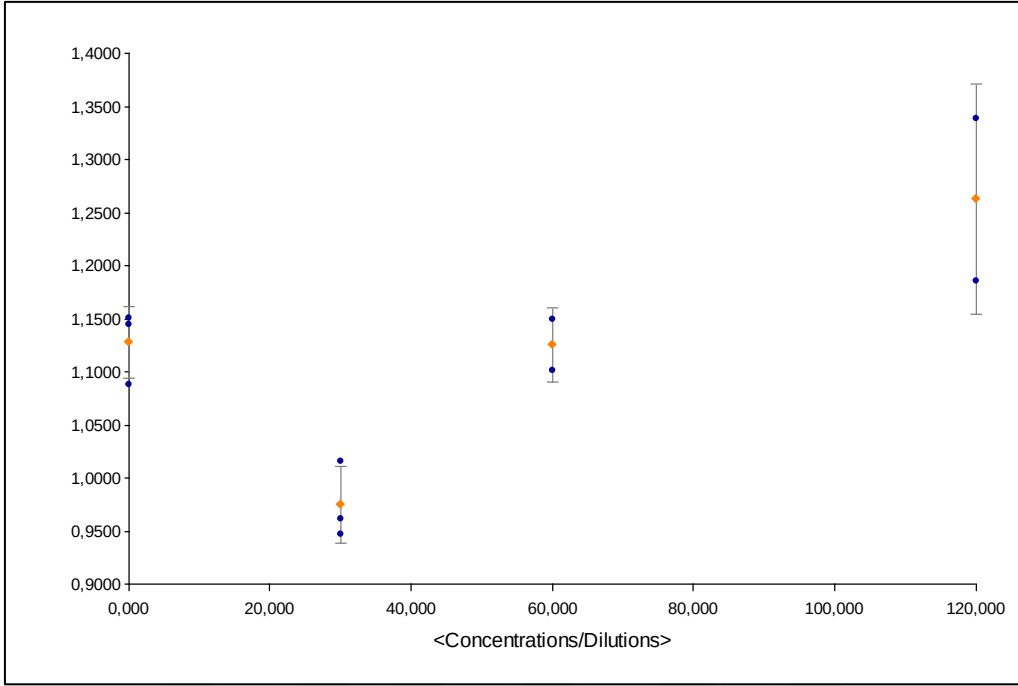
Şekil Ek 2.2. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Ramalina farinacea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



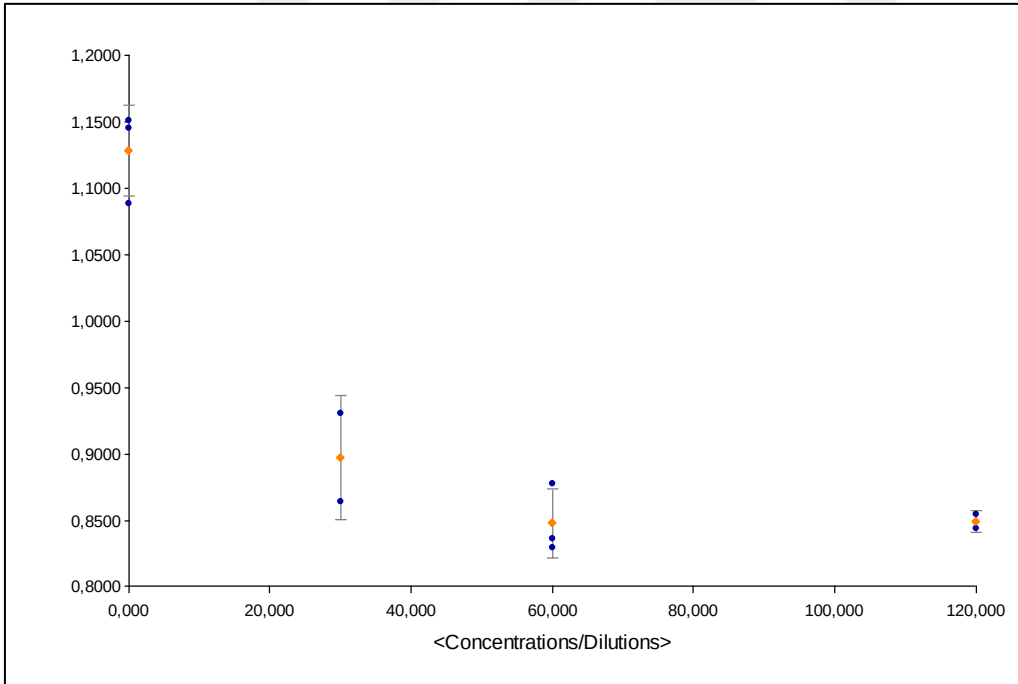
Şekil Ek 2.3. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



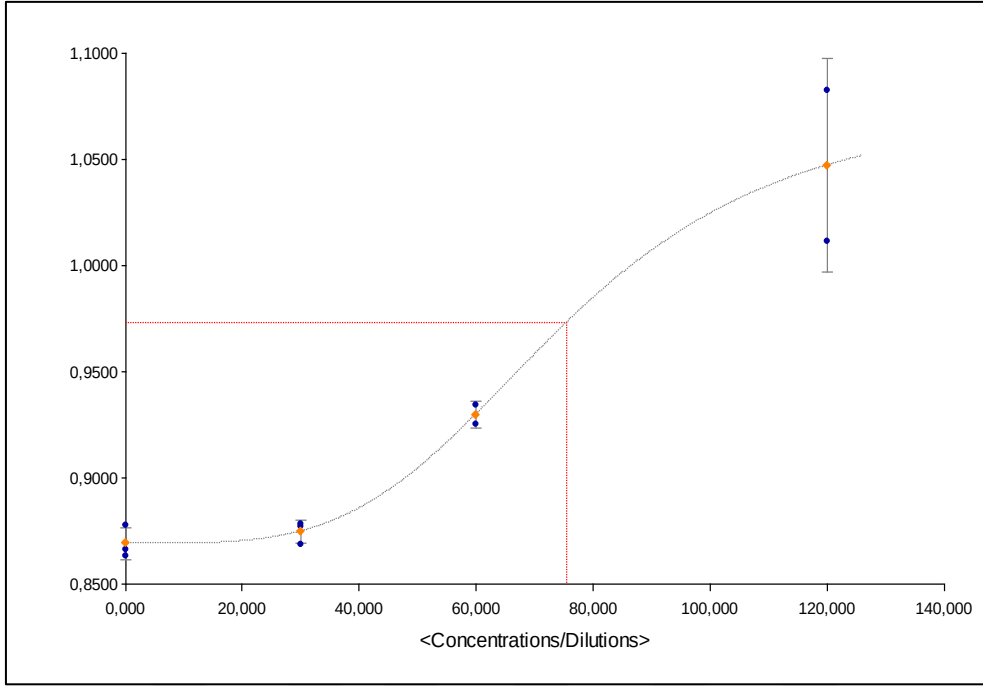
Şekil Ek 2.4. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Usnea florida* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



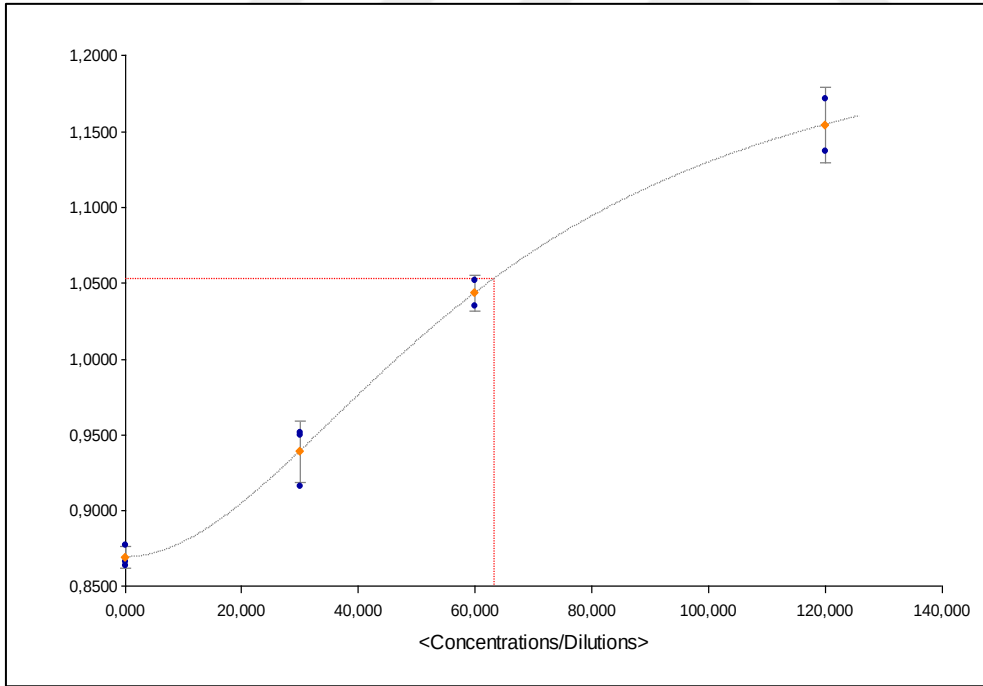
Şekil Ek 2.5. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Bryoria capillaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



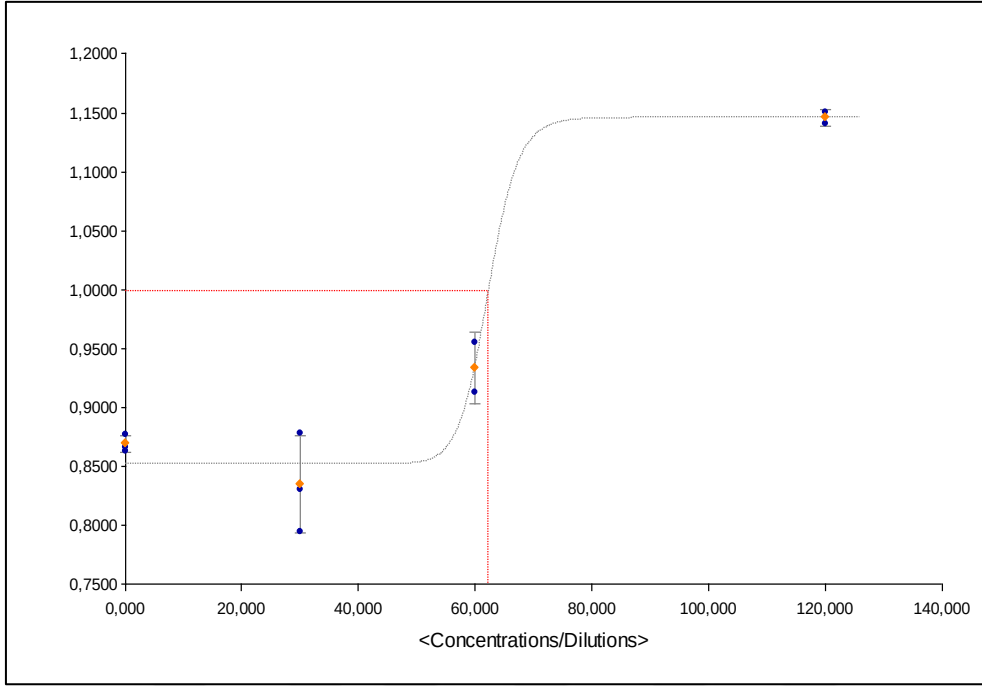
Şekil Ek 2.6. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



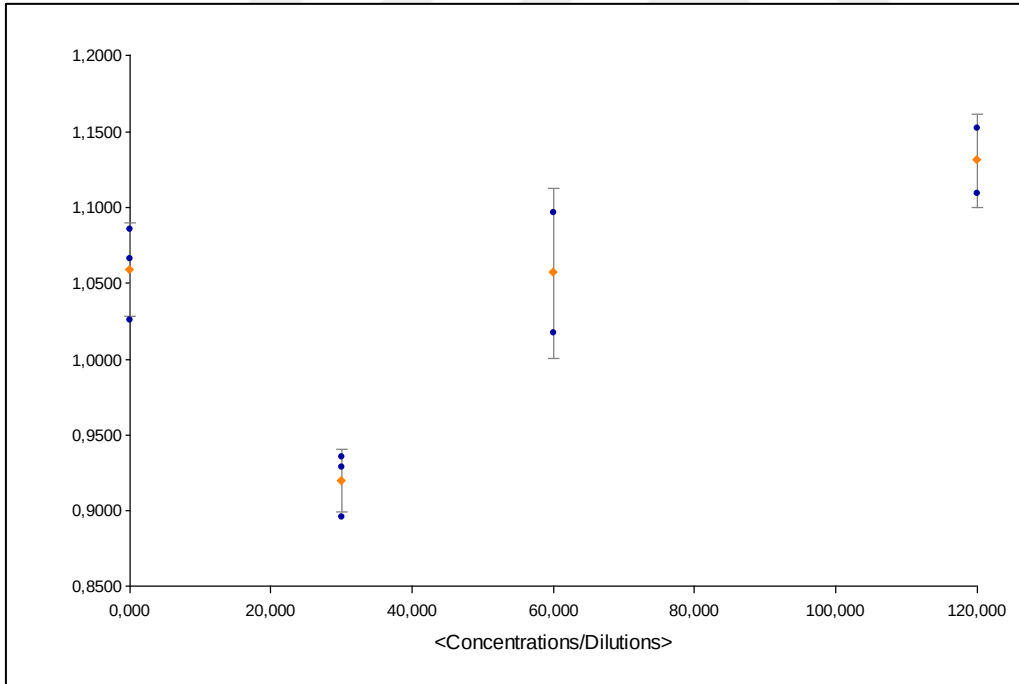
Şekil Ek 2.7. Bolu-Mudurnu bölgesinden toplanan *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



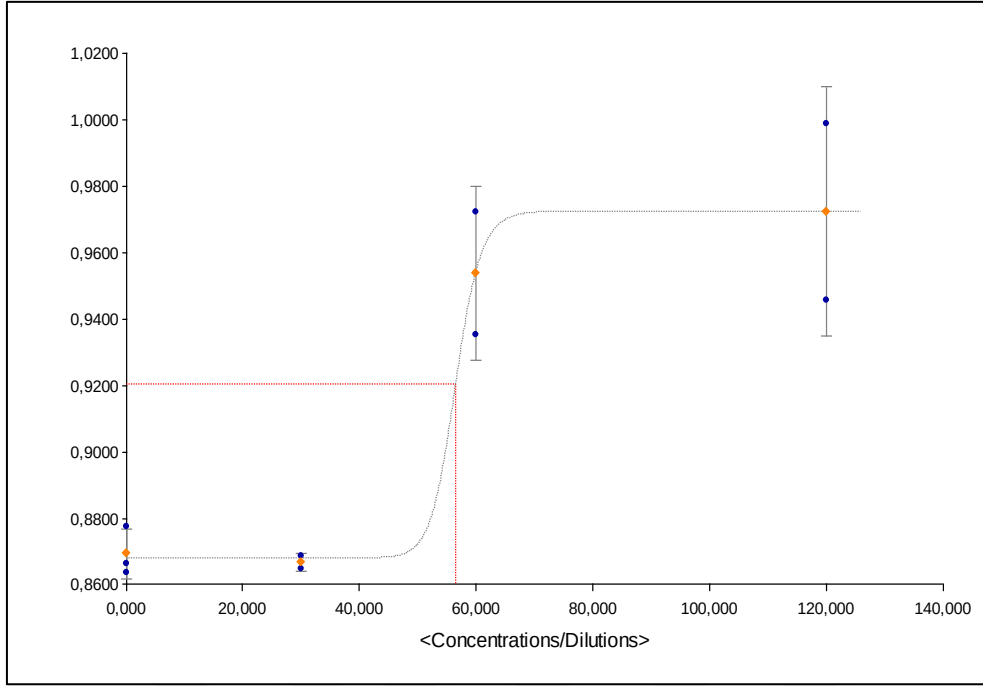
Şekil Ek 2.8. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Evernia divaricata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



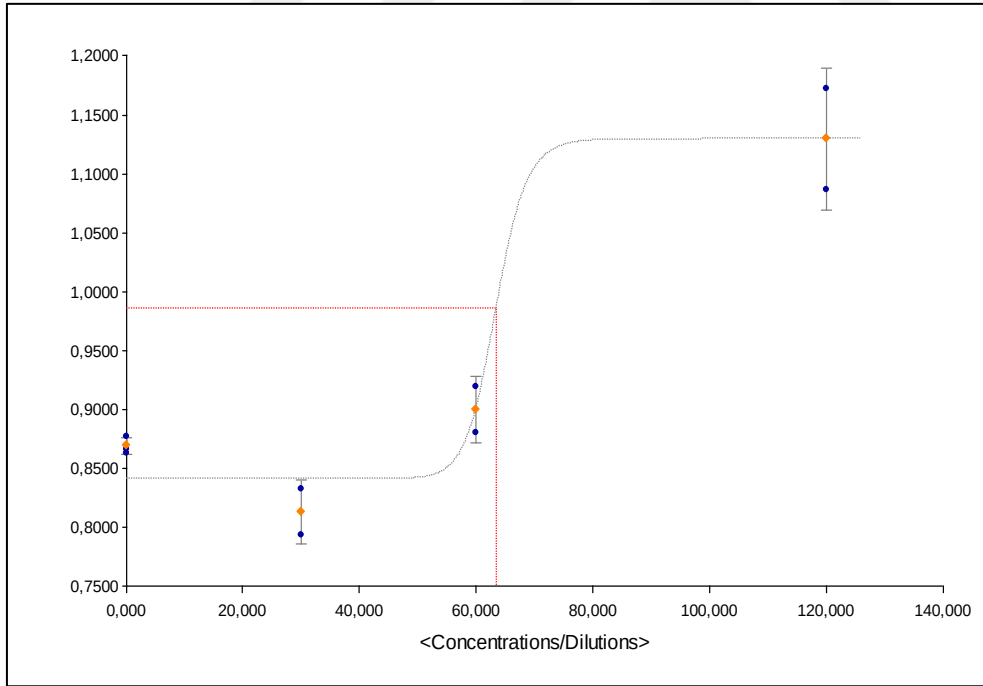
Şekil Ek 2.9. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



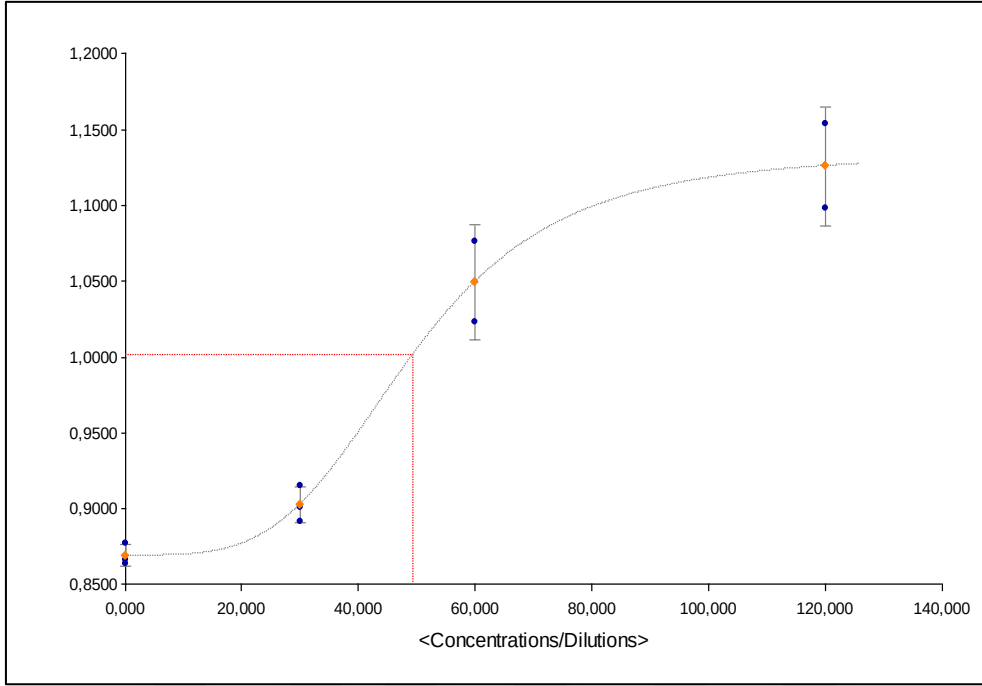
Şekil Ek 2.10. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120,60,30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



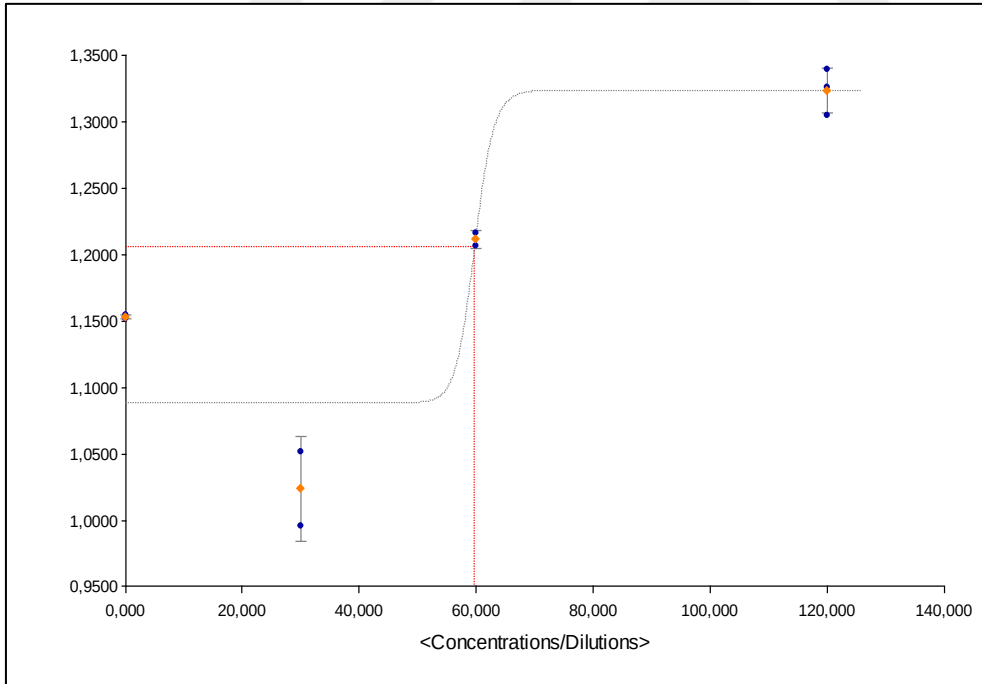
Şekil Ek 2.11. Bolu Aladağlar bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120,60,30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



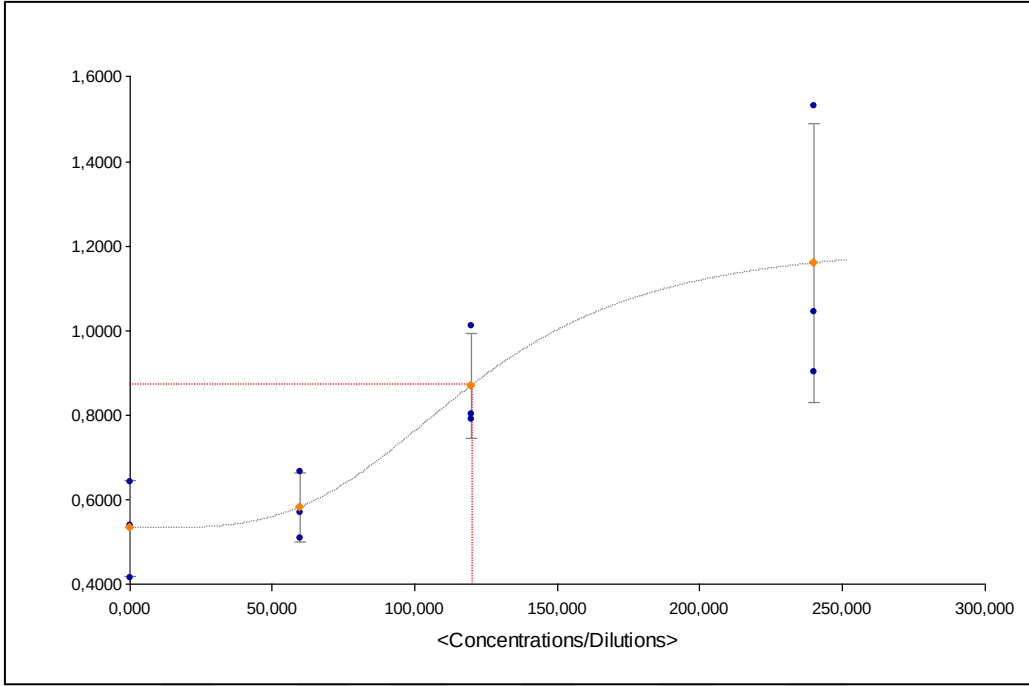
Şekil Ek 2.12. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Evernia prunastri* aseton özütüne ait 120,60,30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



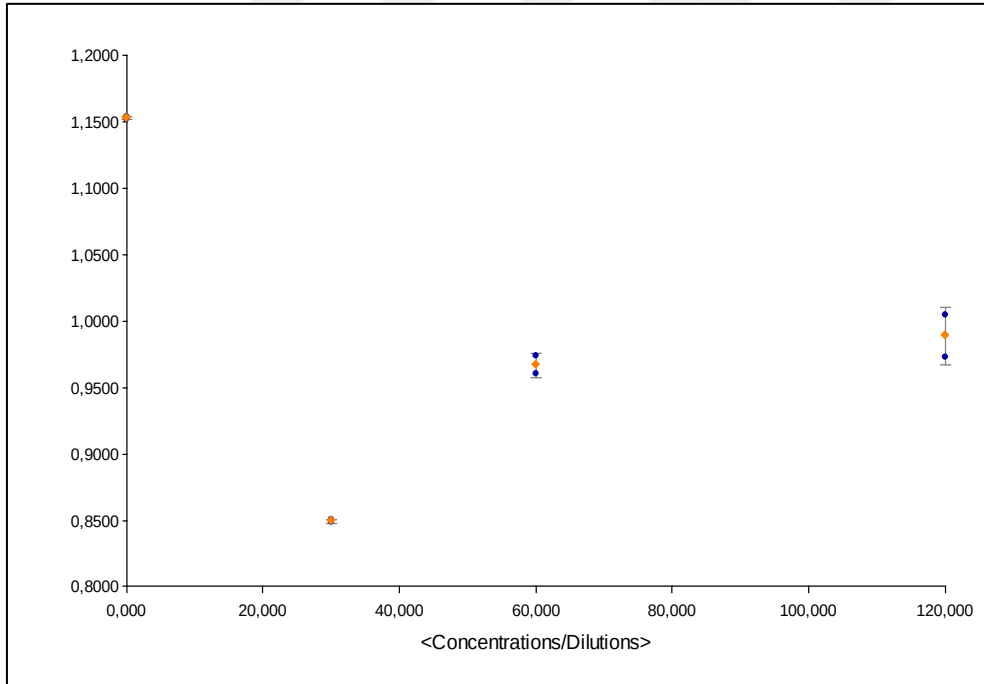
Şekil Ek 2.13. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Bryoria capillaris* aseton özütüne ait 120, 60,30 $\mu\text{g/ml}$ dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



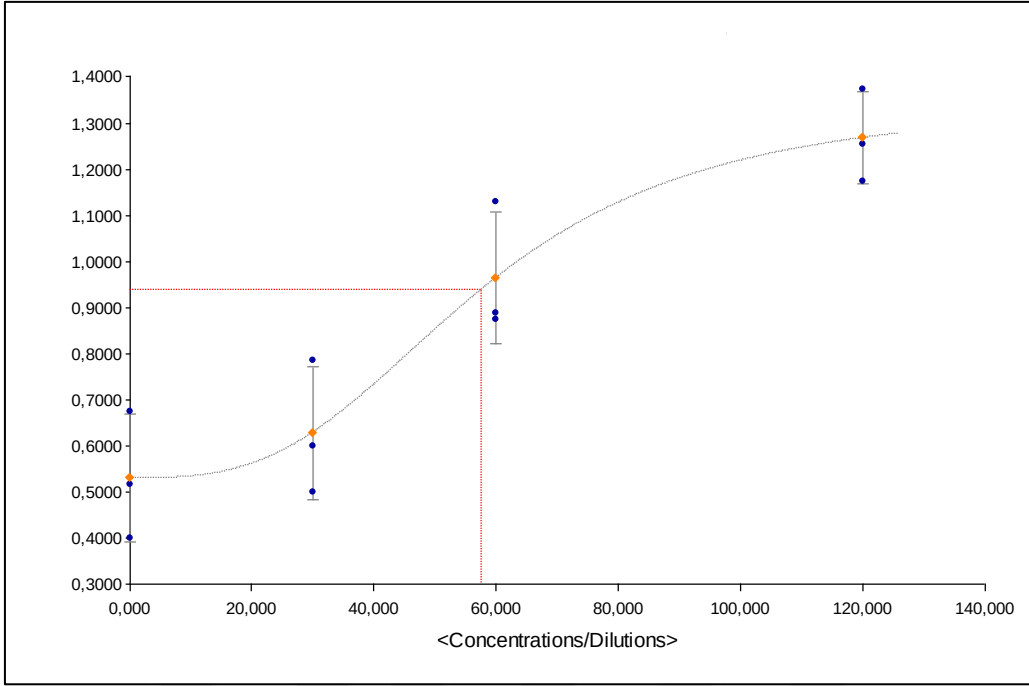
Şekil Ek 2.14. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Evernia divaricata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 $\mu\text{g/ml}$ dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



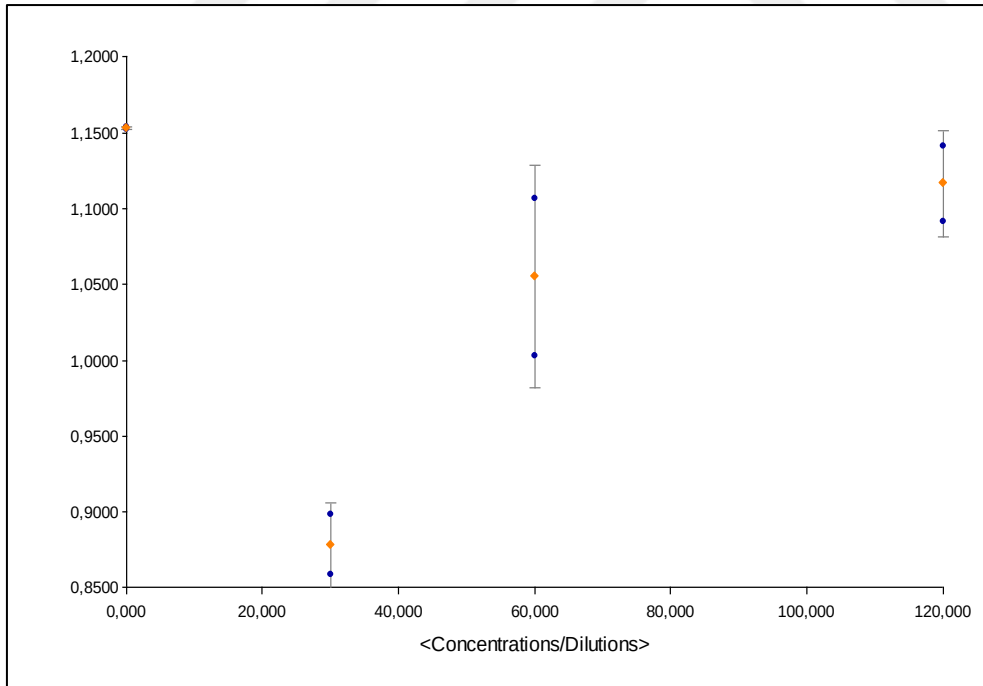
Şekil Ek 2.15. Bursa Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



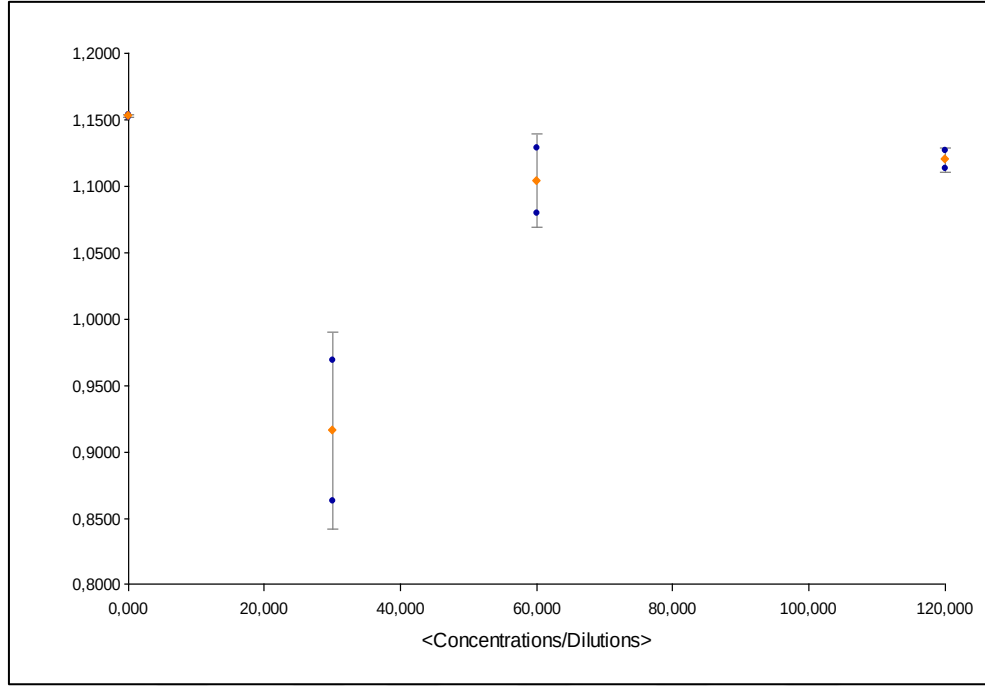
Şekil Ek 2.16. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



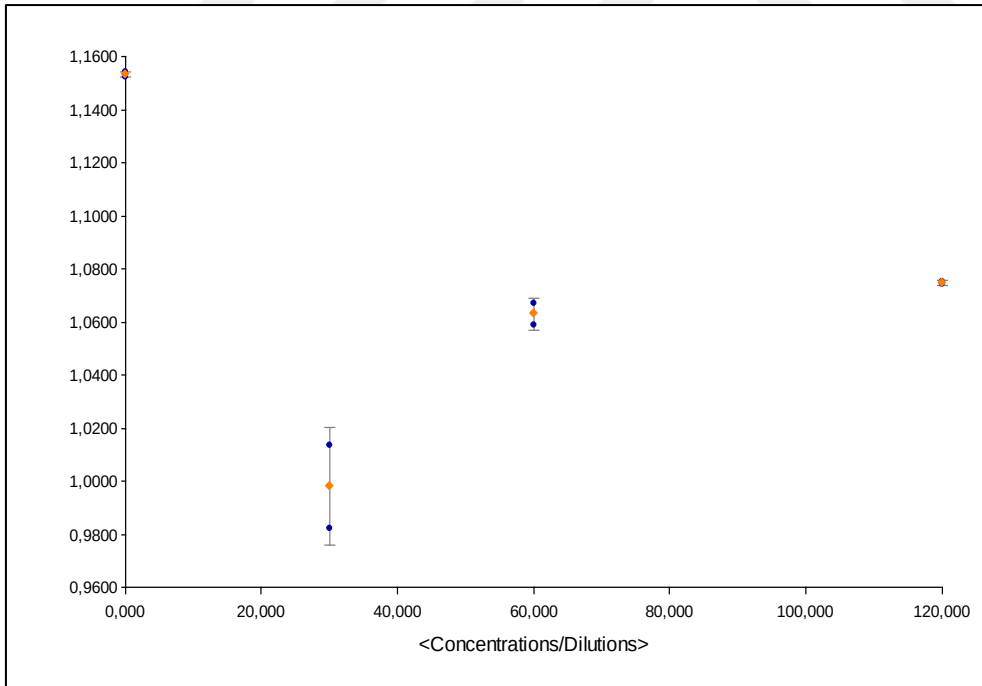
Şekil Ek 2.17. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Platismatia glauca* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



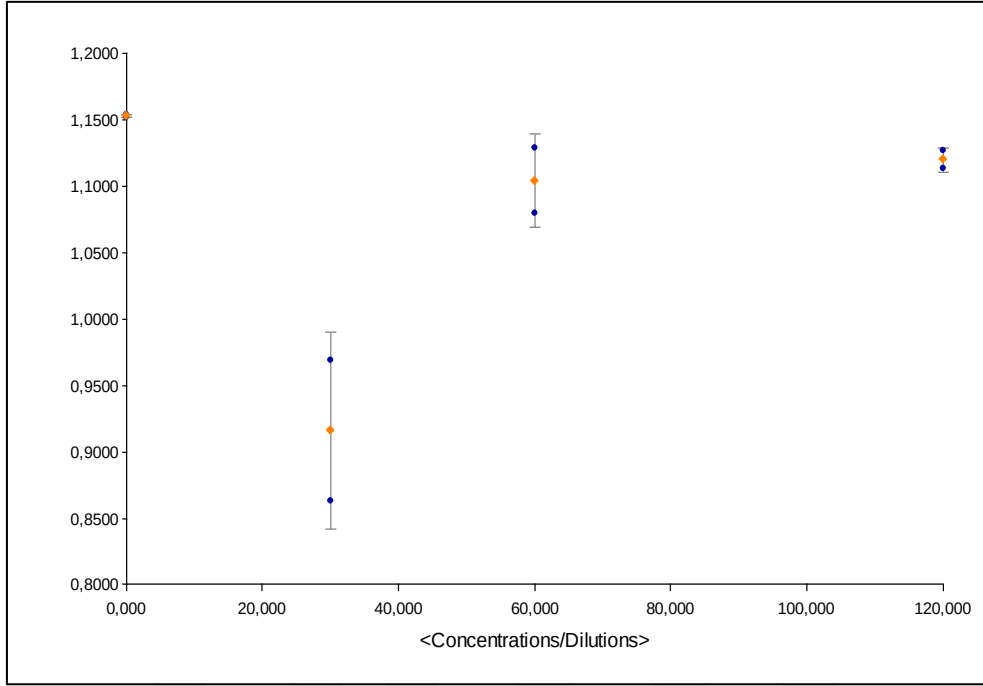
Şekil Ek 2.18. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Usnea barbata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



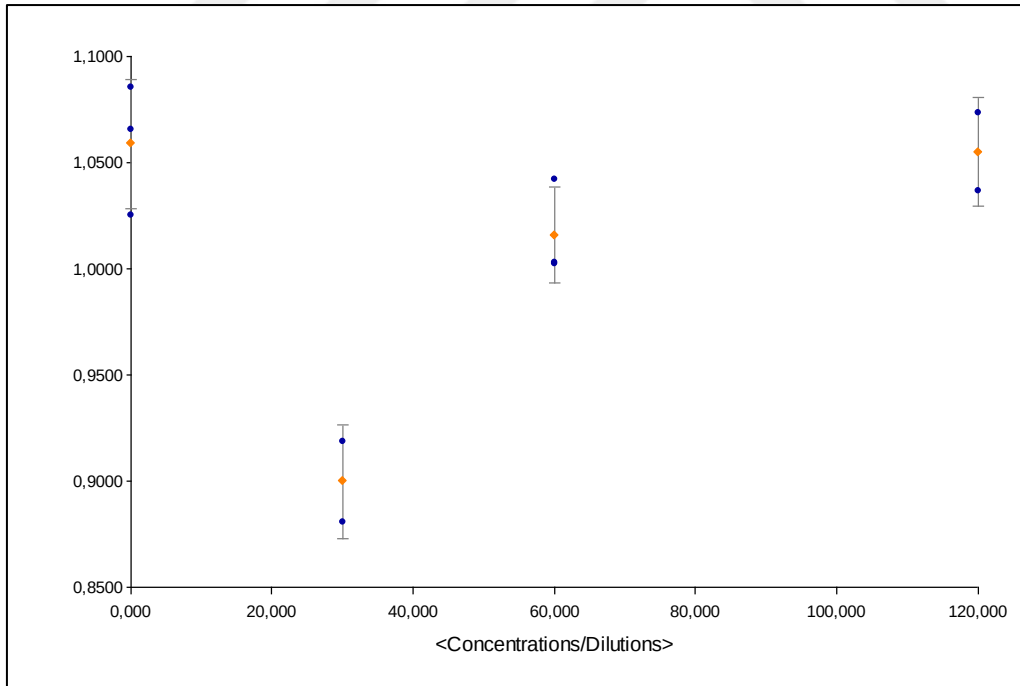
Şekil Ek 2.19. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



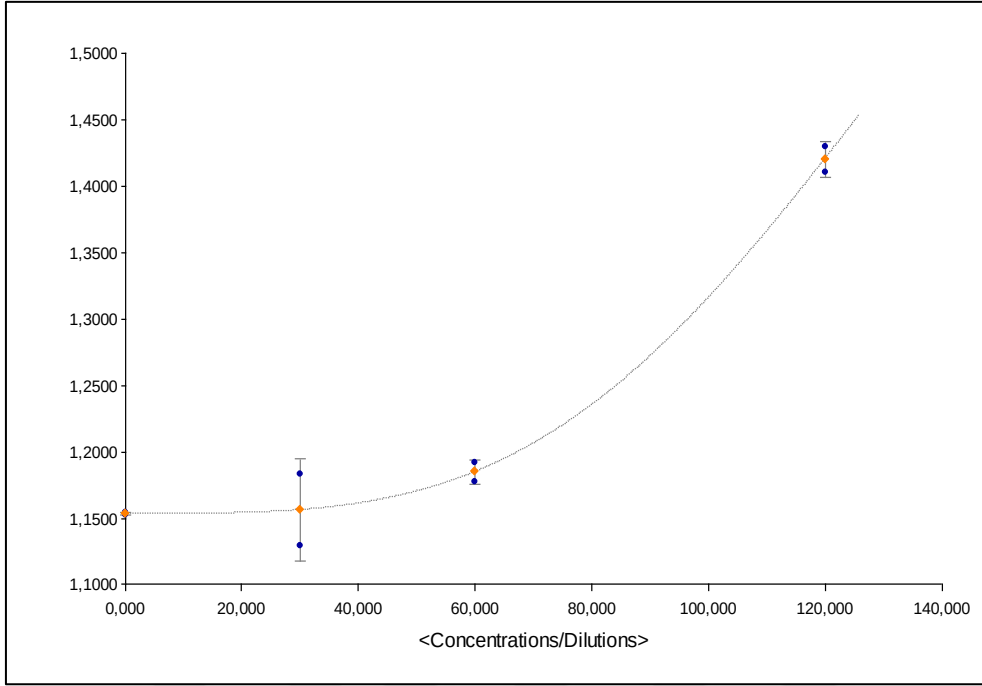
Şekil Ek 2.20. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Parmelia submontana* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



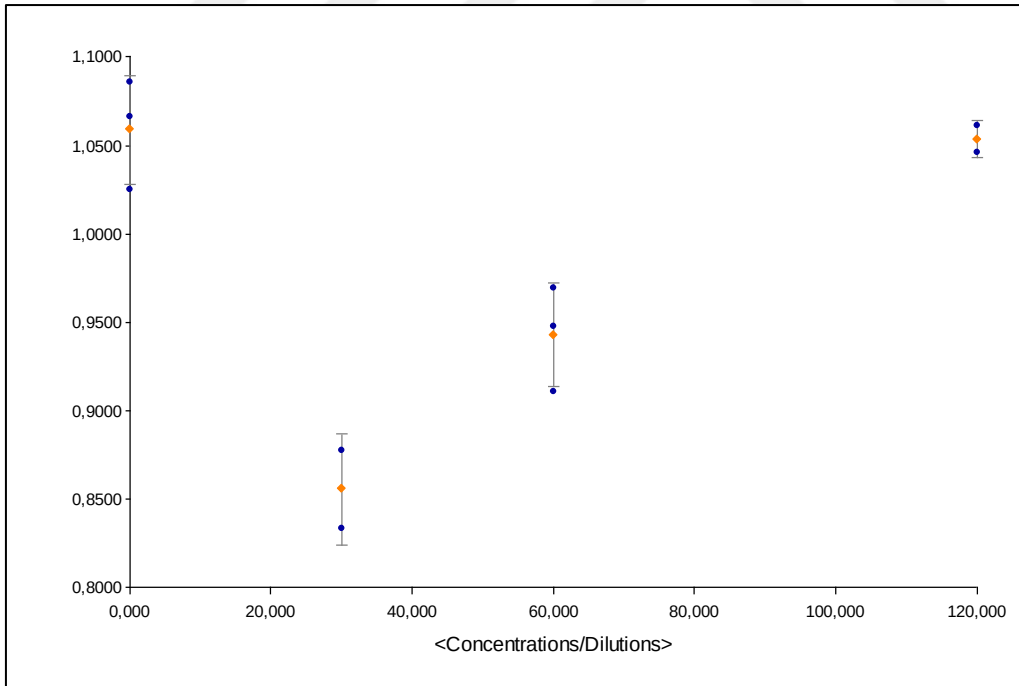
Şekil Ek 2.21. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



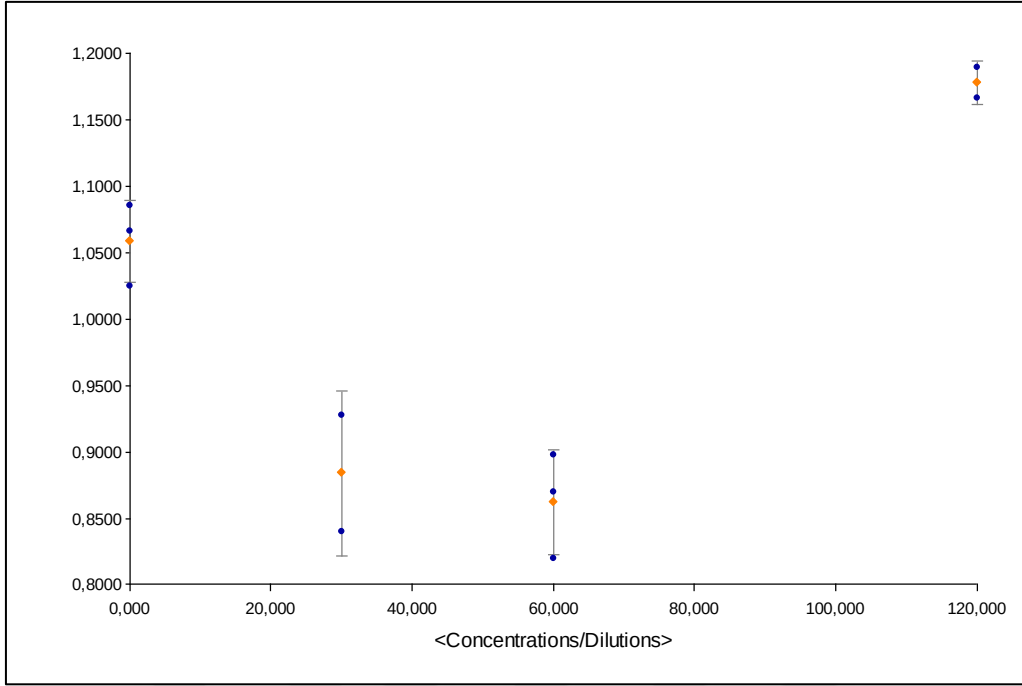
Şekil Ek 2.22. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Parmelia sulcata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



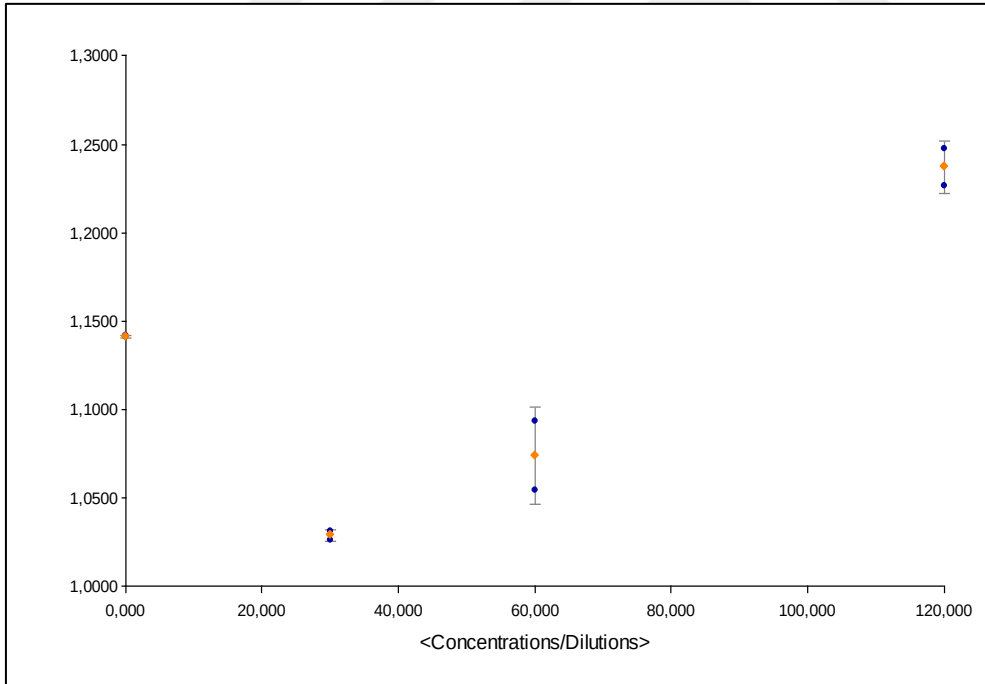
Şekil Ek 2.23. Bursa-Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Melanohalea exasperata* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



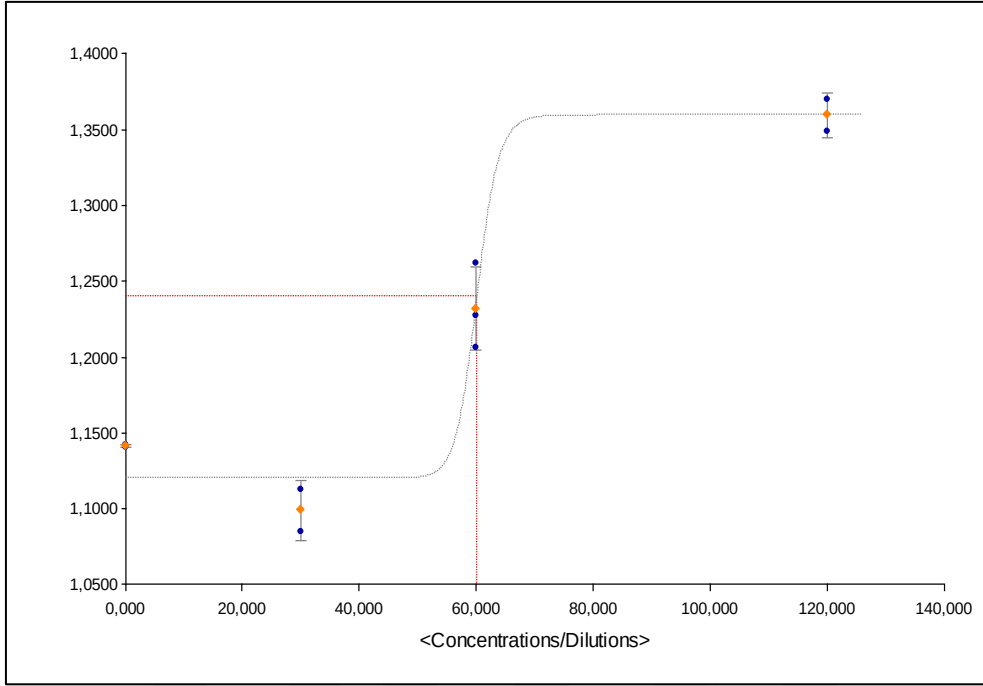
Şekil Ek 2.24. Bursa-Alaçam (İST4) bölgesinden toplanan *Hypogymnia tubulosa* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



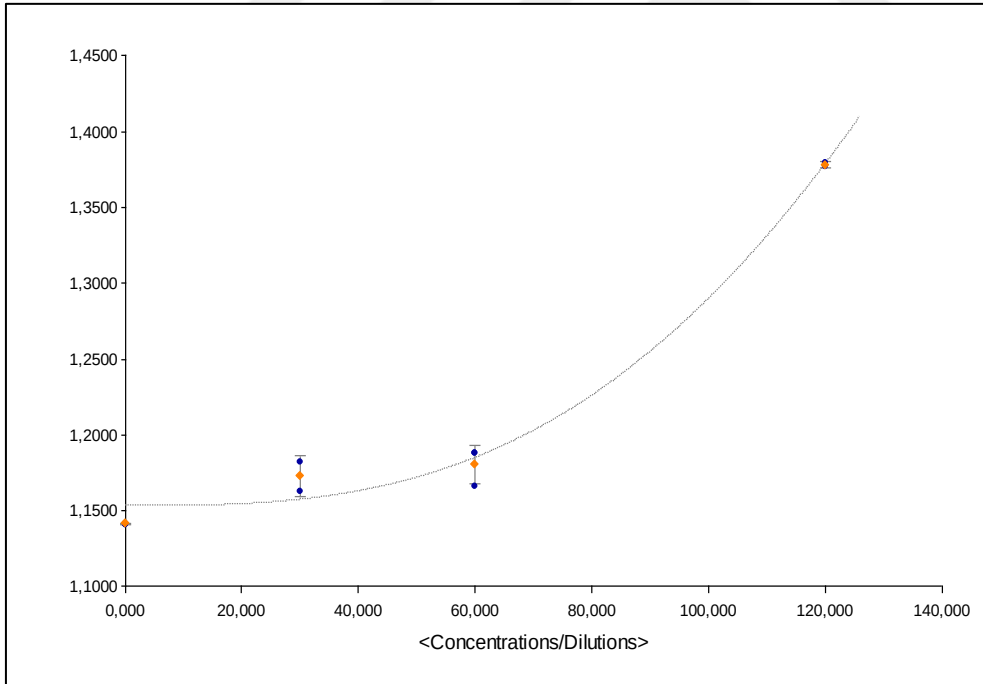
Şekil Ek 2.25. ABA03 kodlu *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60,30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



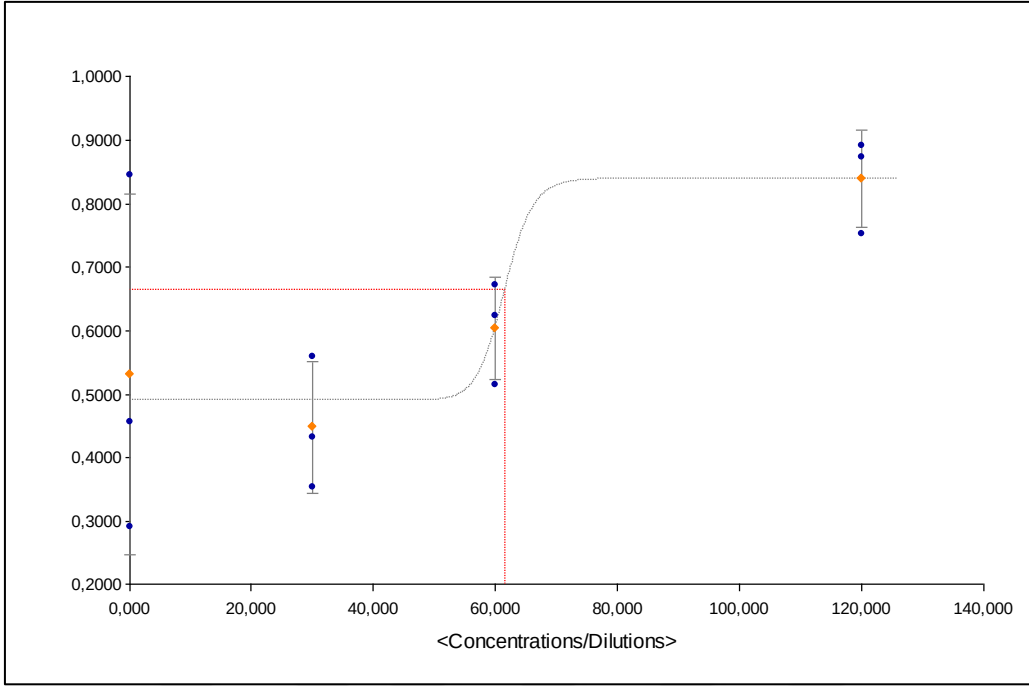
Şekil Ek 2.26. ALA01 kodlu *Lobaria pulmonaria* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



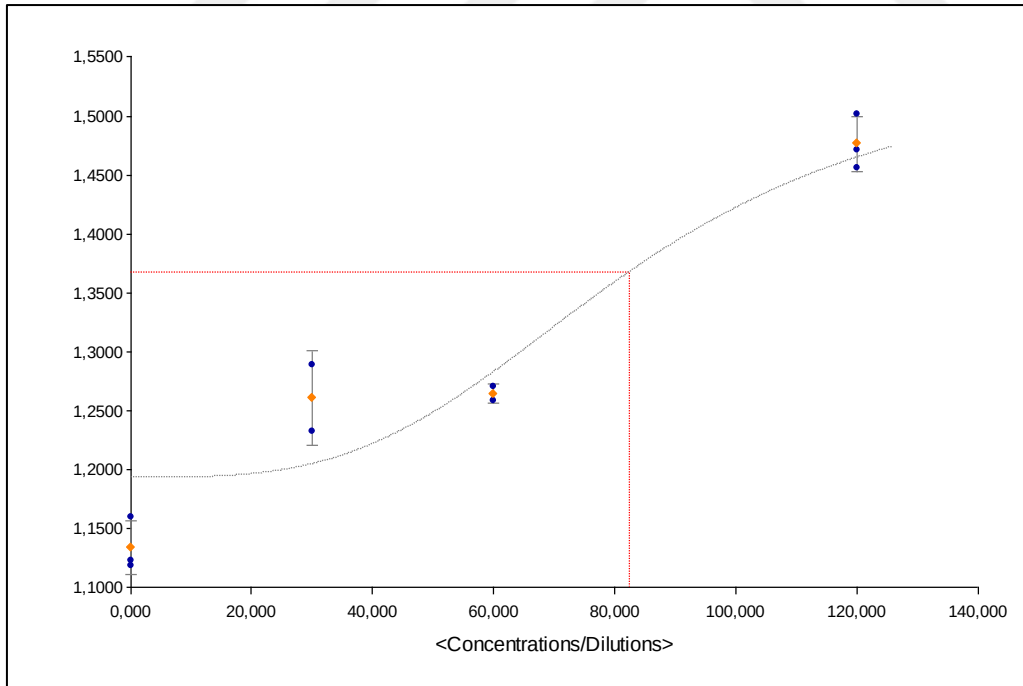
Şekil Ek 2.27. YG01 *Ramalina calicaris* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



Şekil Ek 2.28. ALA02 kodlu *Usnea sp.* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



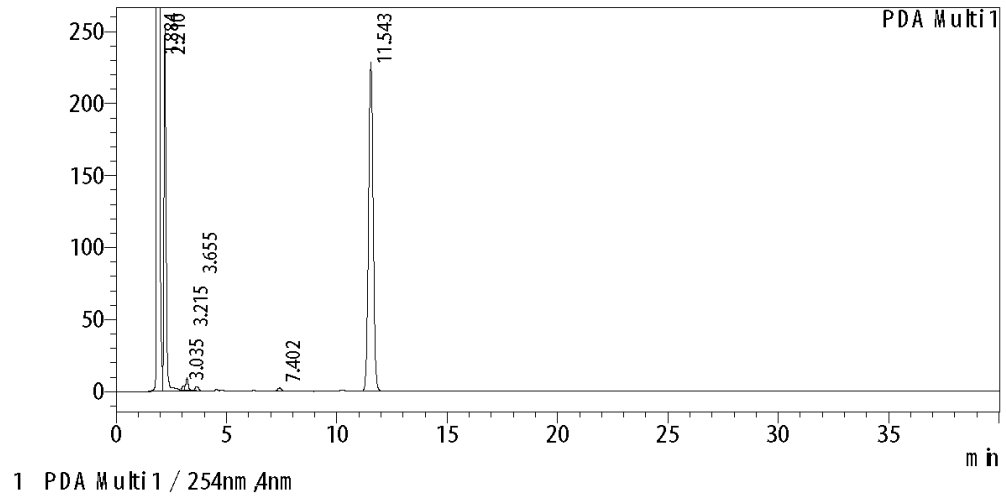
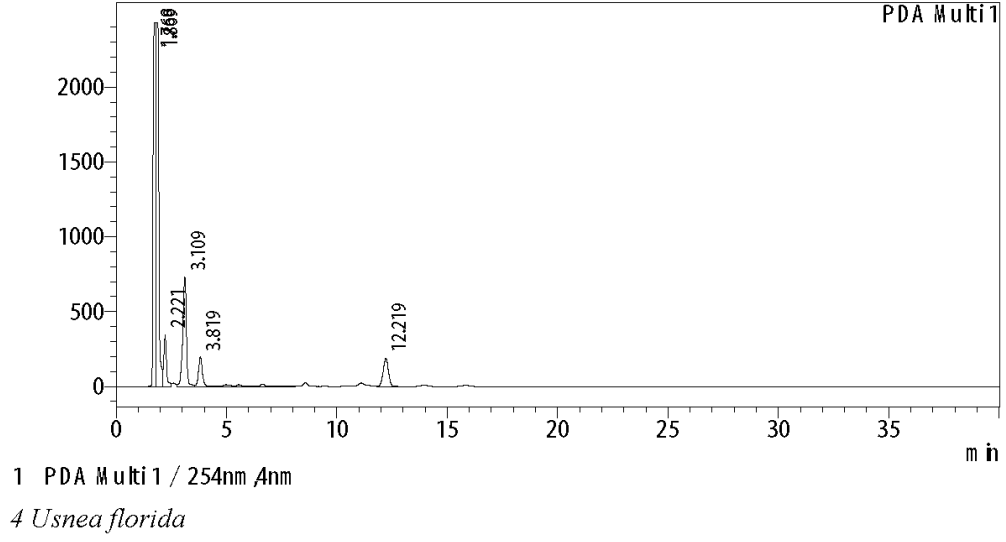
Şekil Ek 2.29. Bursa Alaçam (İST2) bölgesinden toplanan *Hypogymnia physodes* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.



Şekil Ek 2.30. Bursa Alaçam (İST3) bölgesinden toplanan *Pseudevernia furfuracea* aseton özütüne ait 120, 60, 30 µg/ml dozlarının PAO1 suşu üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisi.

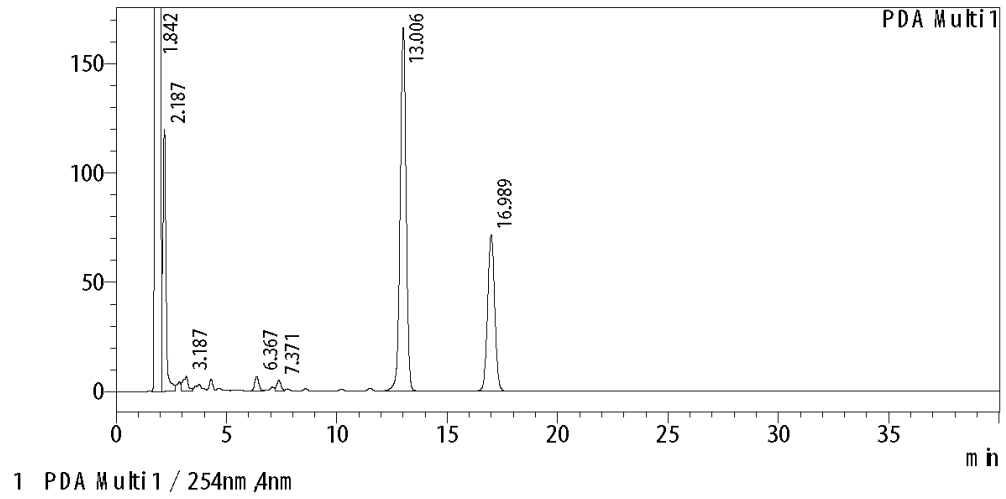
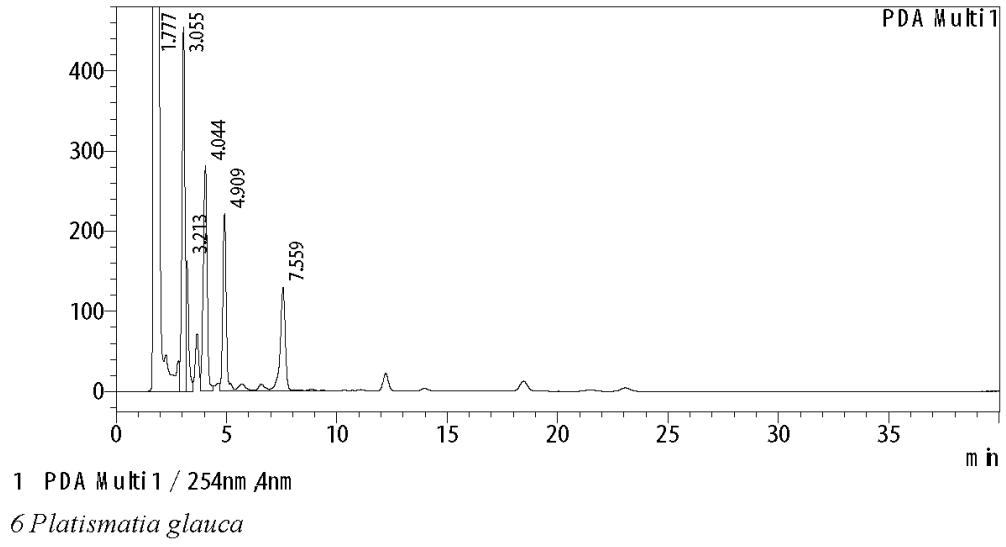
EK-3

2 *Ramalina farinacea*



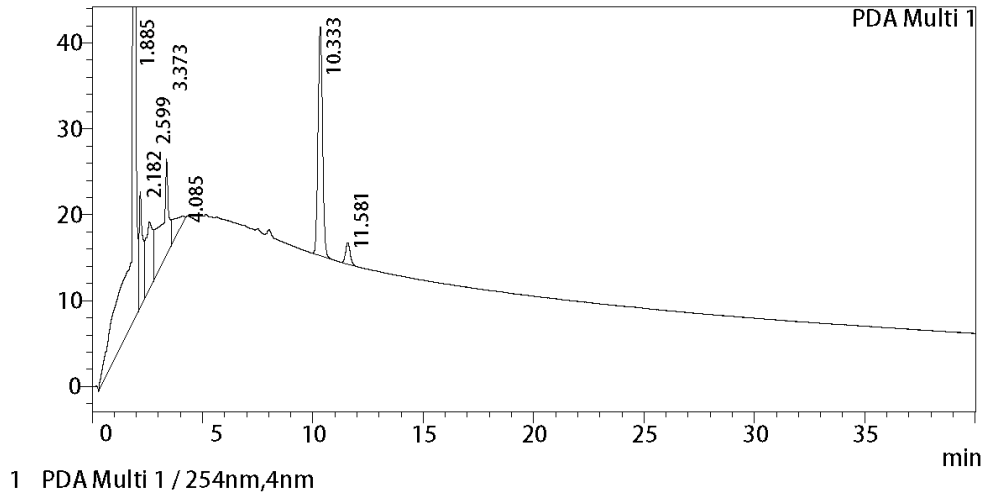
Şekil Ek 3.1. *R. farinacea* ve *U. florida* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

5 *Bryoria capillaris*

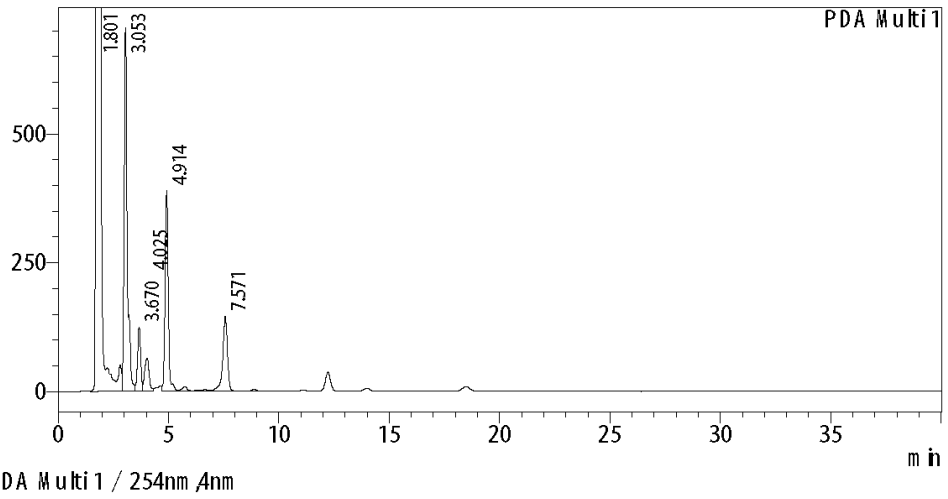


Şekil 3.2. *B. capillaris* ve *P. glauca* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

9 *Evernia divaricata*

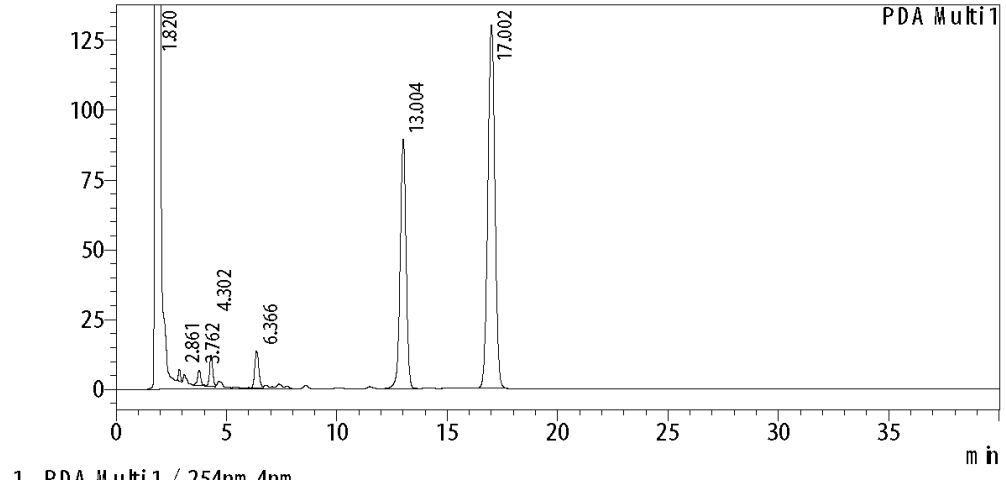


12 *Bryoria capillaris*

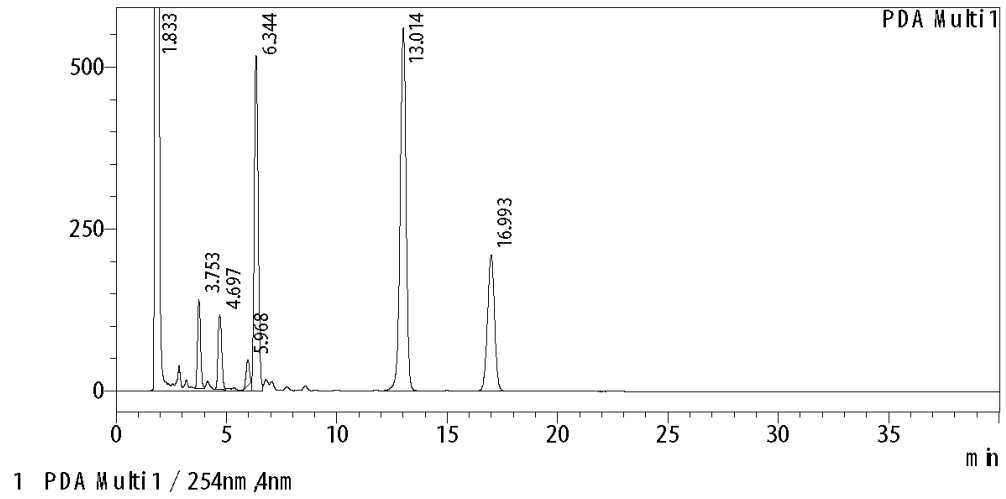


Şekil 3.3. *E. divaricata* ve *B. capillaris* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

15 *Platismatia glauca*

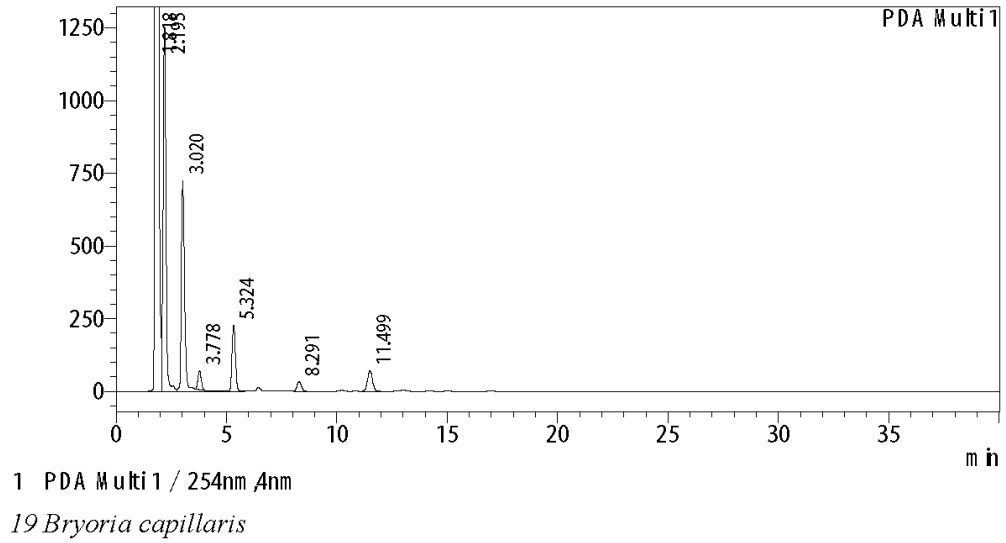


16 *Pseudevernia furfuraceae*

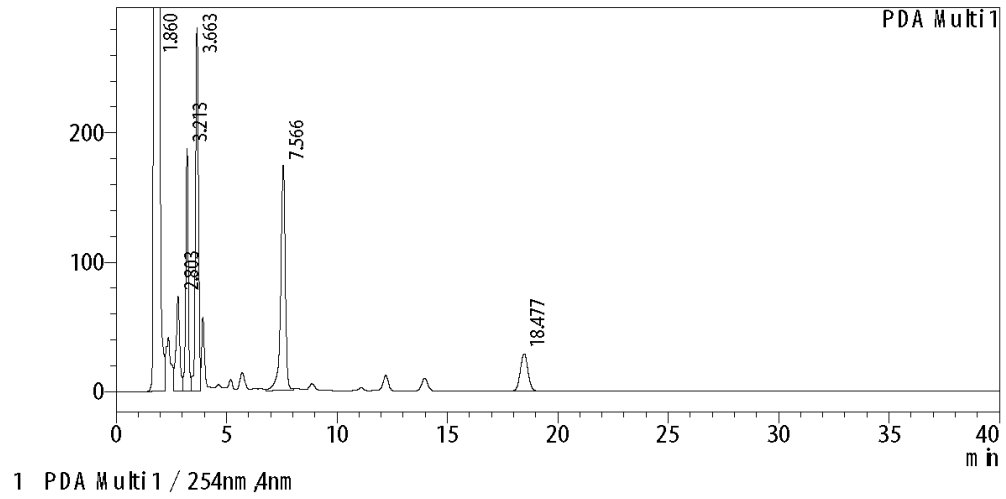


Şekil 3.4. *P. glauca* ve *P. furfuracea* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

18 *Ramalina farinacea*

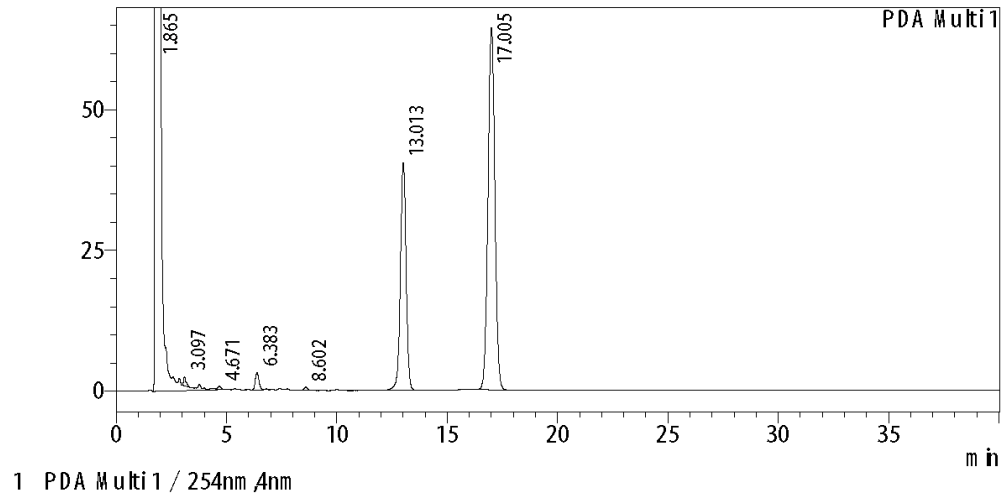
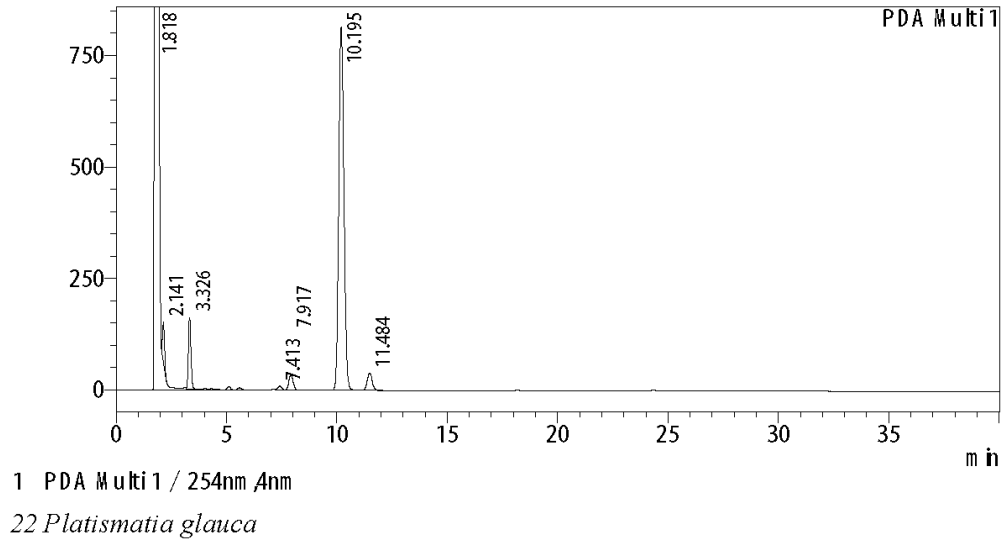


19 *Bryoria capillaris*



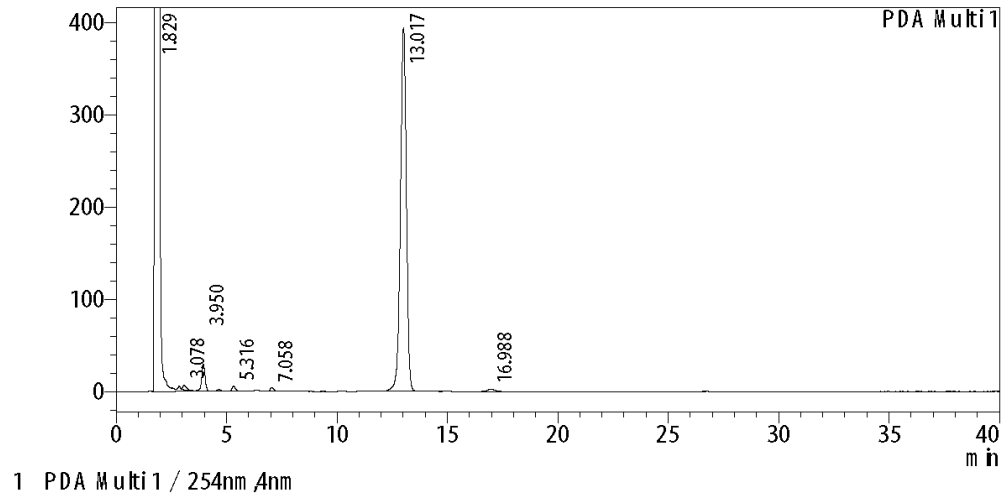
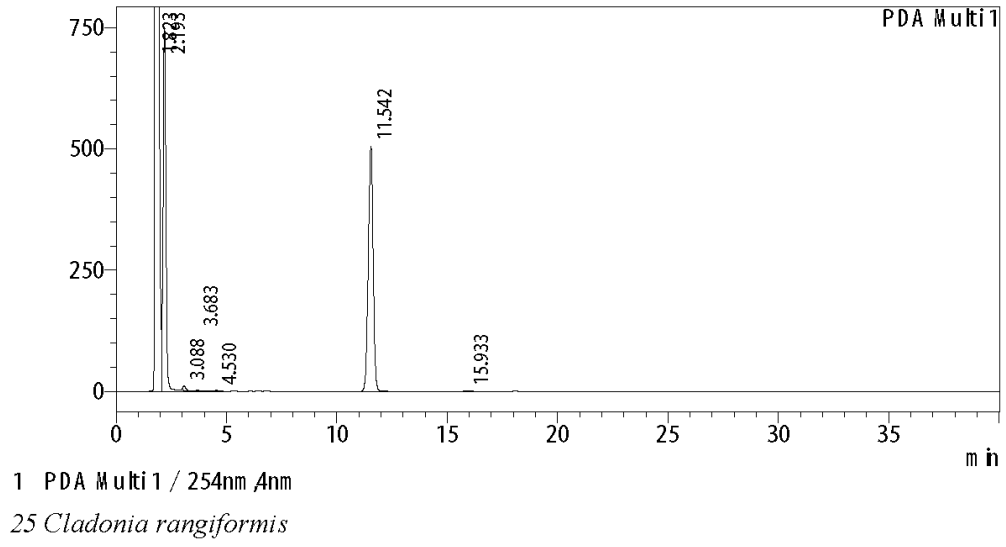
Şekil 3.5. *R. farinacea* ve *B. capillaris* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

20 *Evernia divaricata*



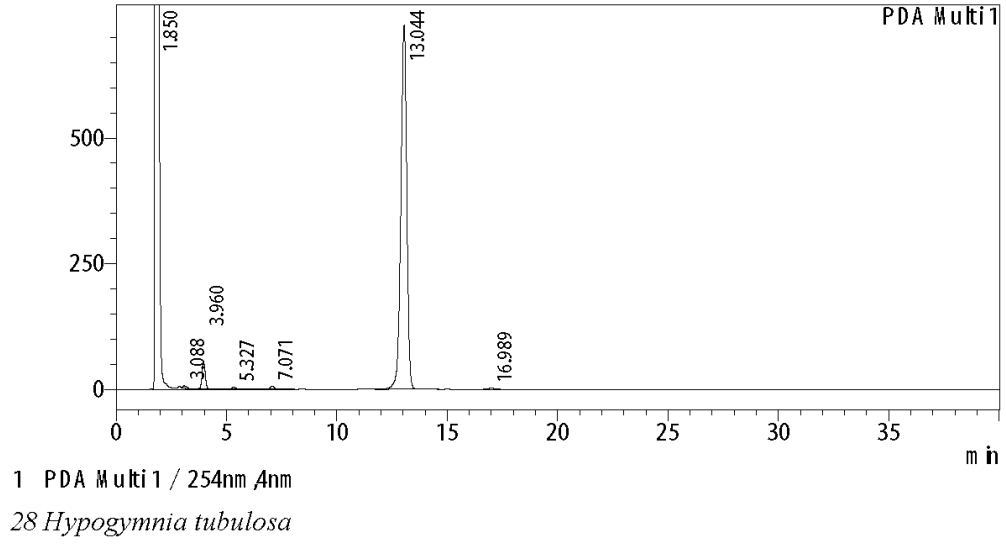
Şekil Ek 3.6. *E. divaricata* ve *P. glauca* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

24 *Usnea barbata*

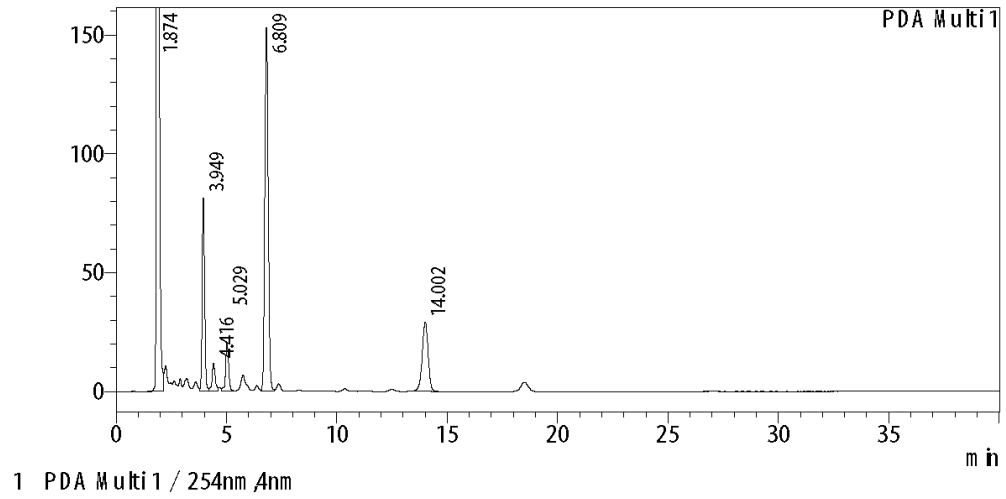


Şekil Ek 3.7. *U. barbata* ve *C. rangiformis* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

27 *Cladonia rangiformis*

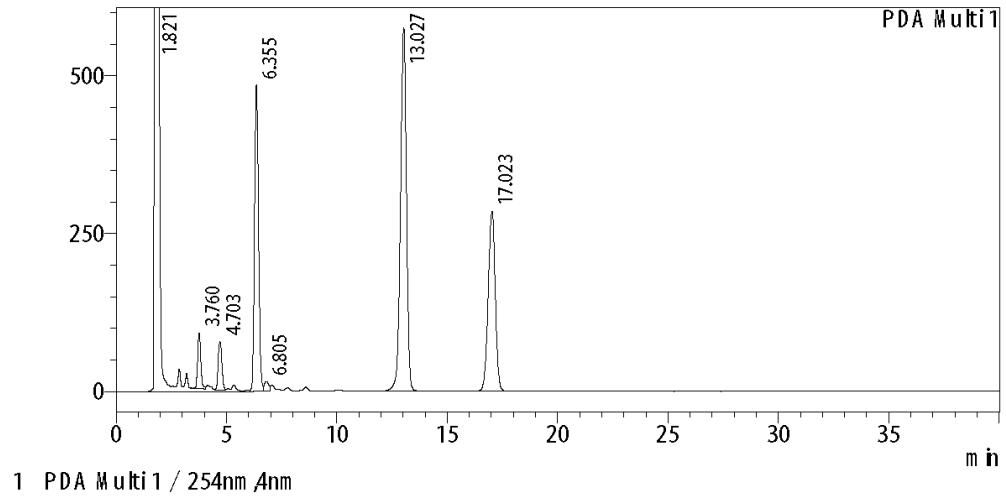
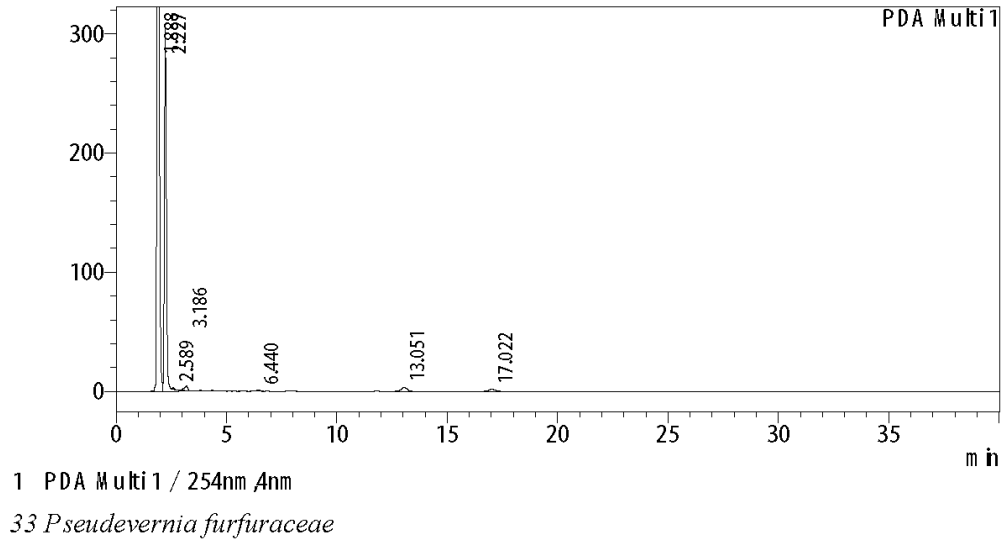


28 *Hypogymnia tubulosa*



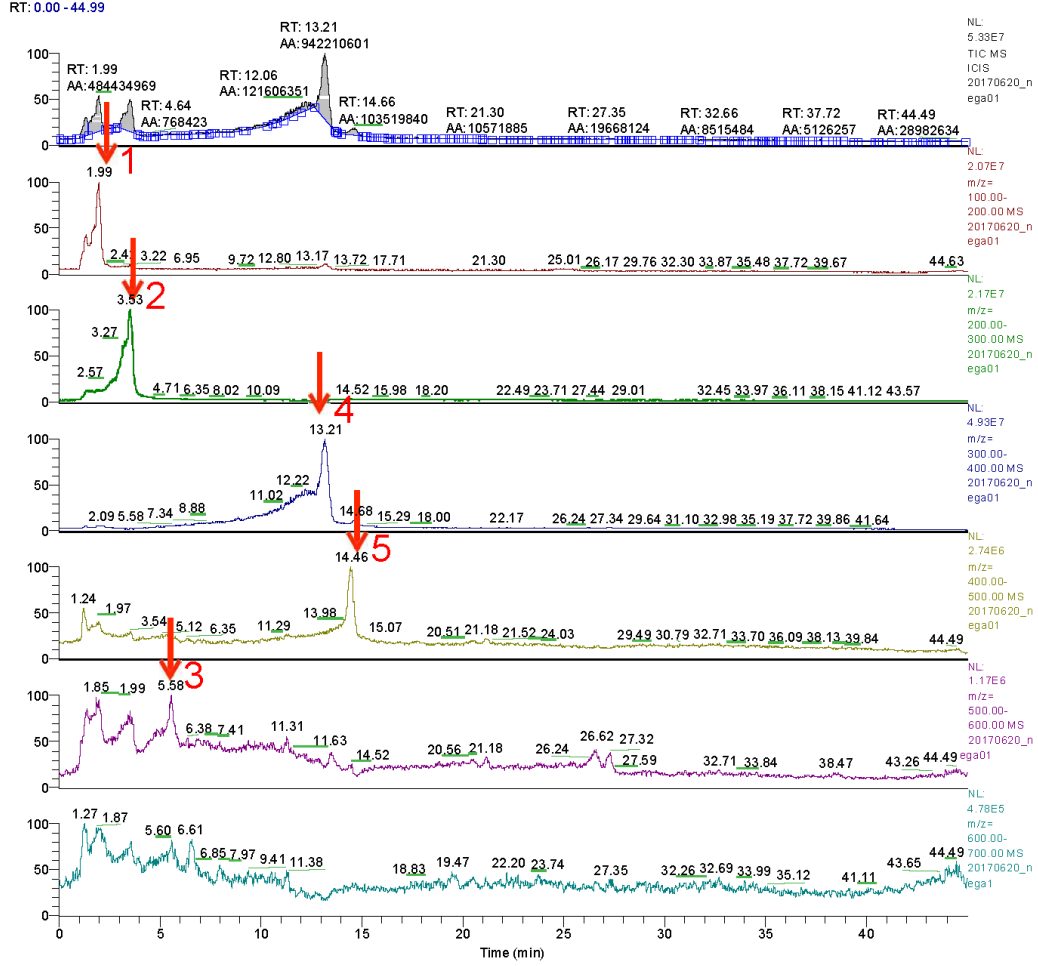
Şekil Ek 3.8. *C. rangiformis* ve *H. tubulosa* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

29 *Parmelia sulcata*



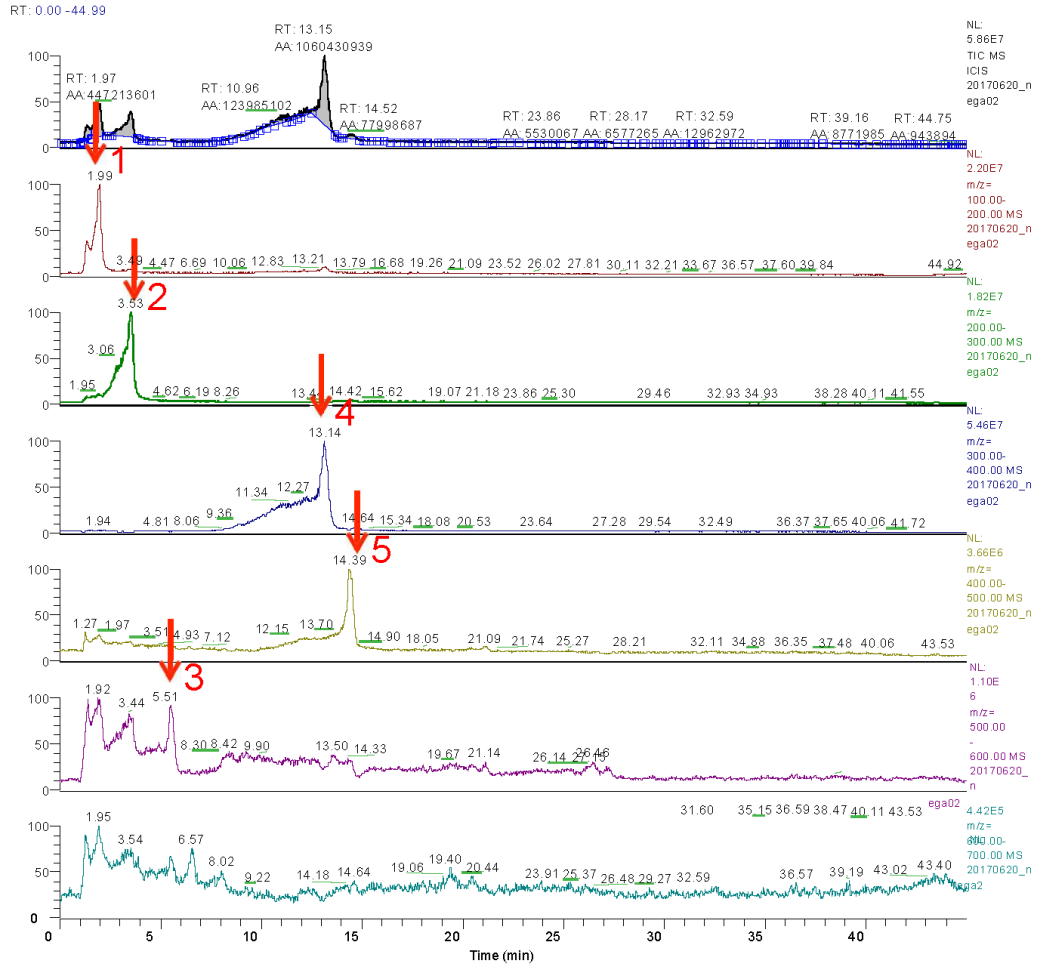
Şekil Ek 3.9. *P. sulcata* ve *P. furfuracea* liken özütlerine ait HPLC alıkonma grafiği.

1 *Evernia divaricata*



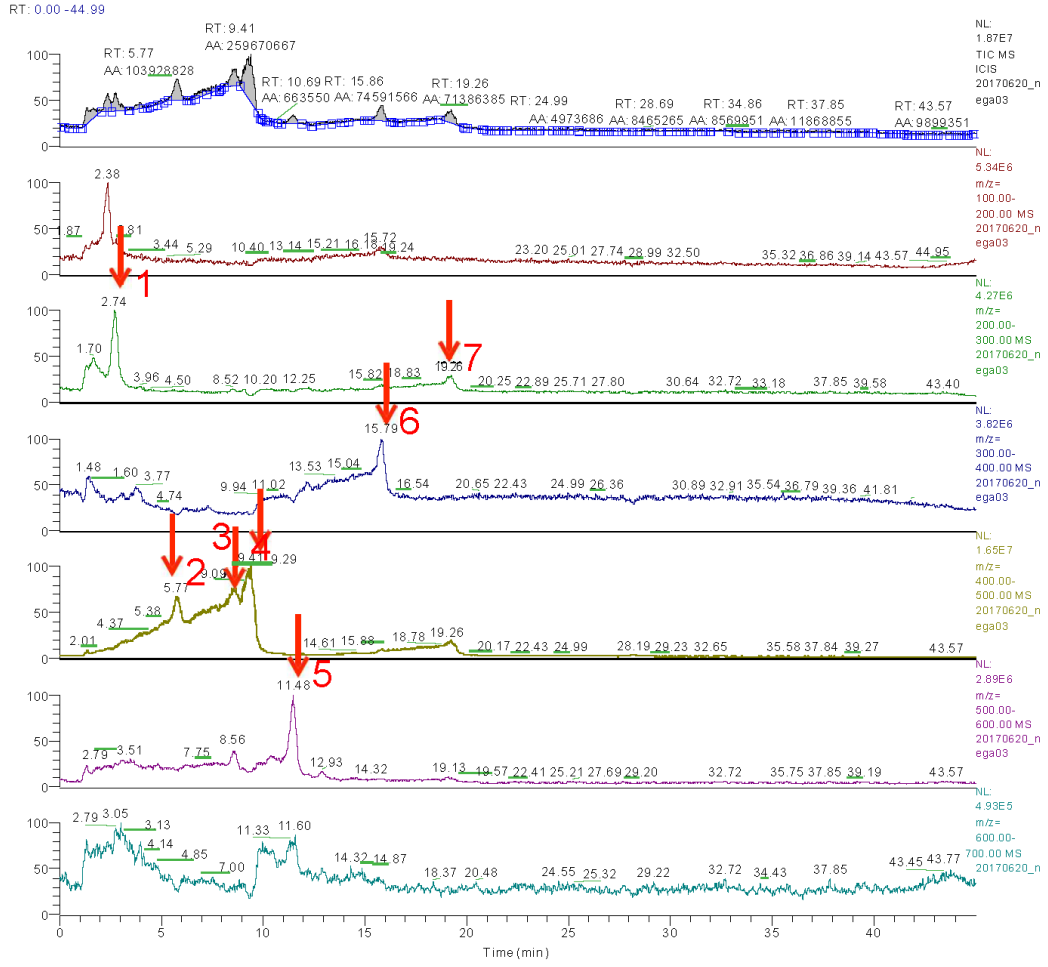
Şekil Ek 3.9. *E. divaricata* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

2 *Evernia divaricata*



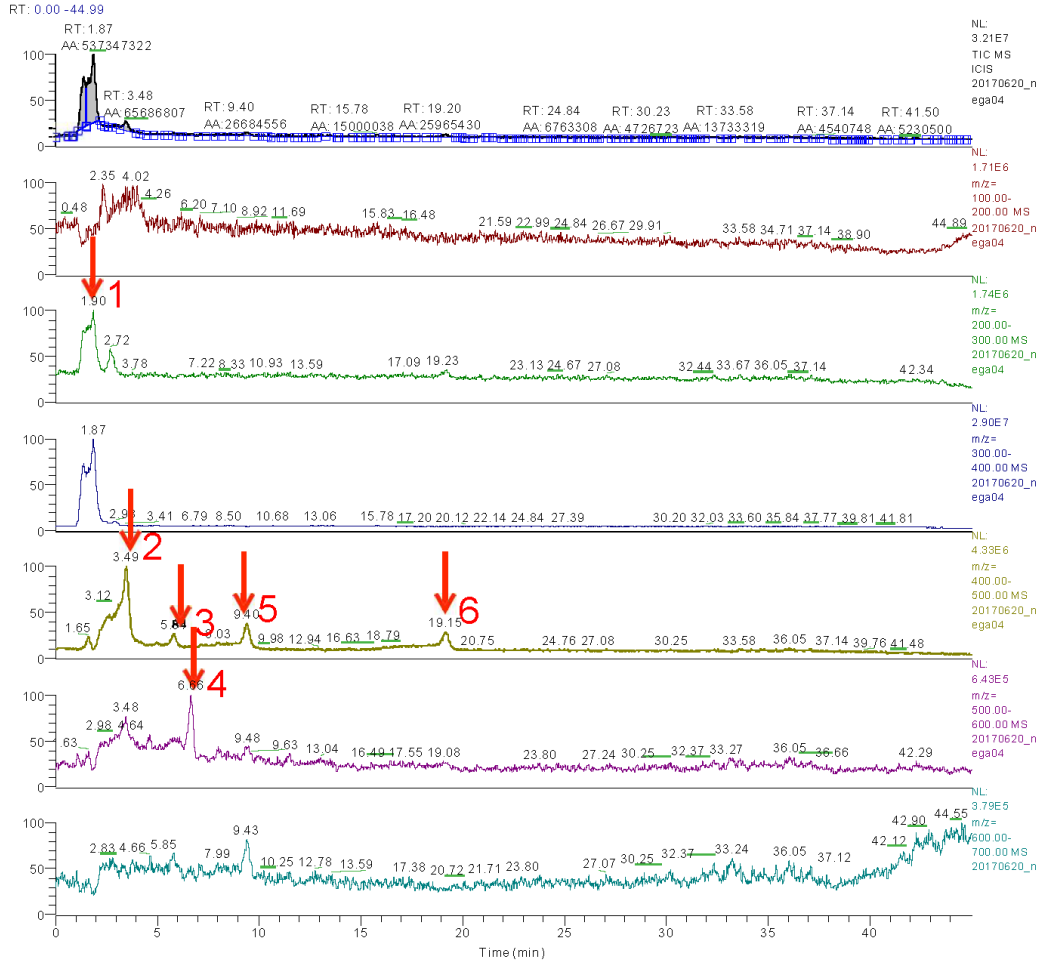
Şekil Ek 3.10. *E. divaricata* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

3 *Pseudevernia furfuraceae*



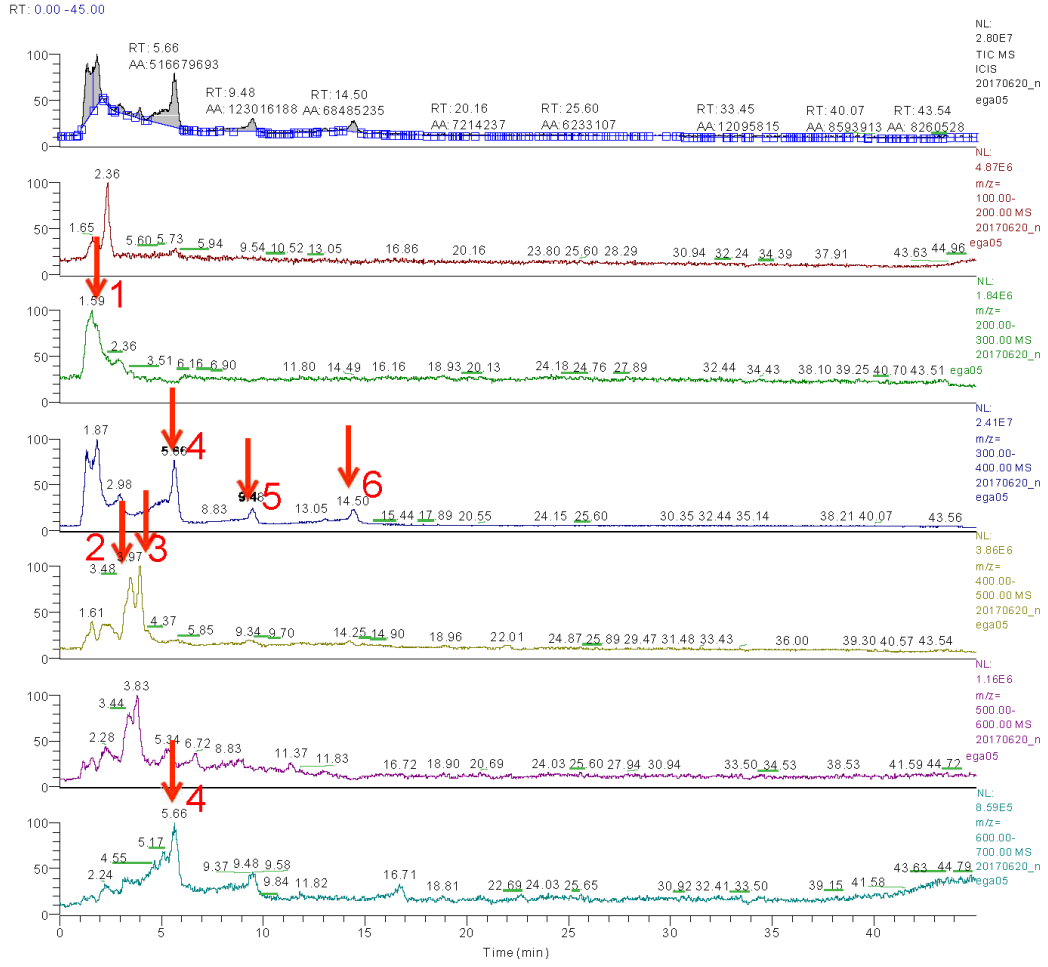
Şekil Ek 3.11. *P. furfuracea* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

4 *Parmelia sulcata*



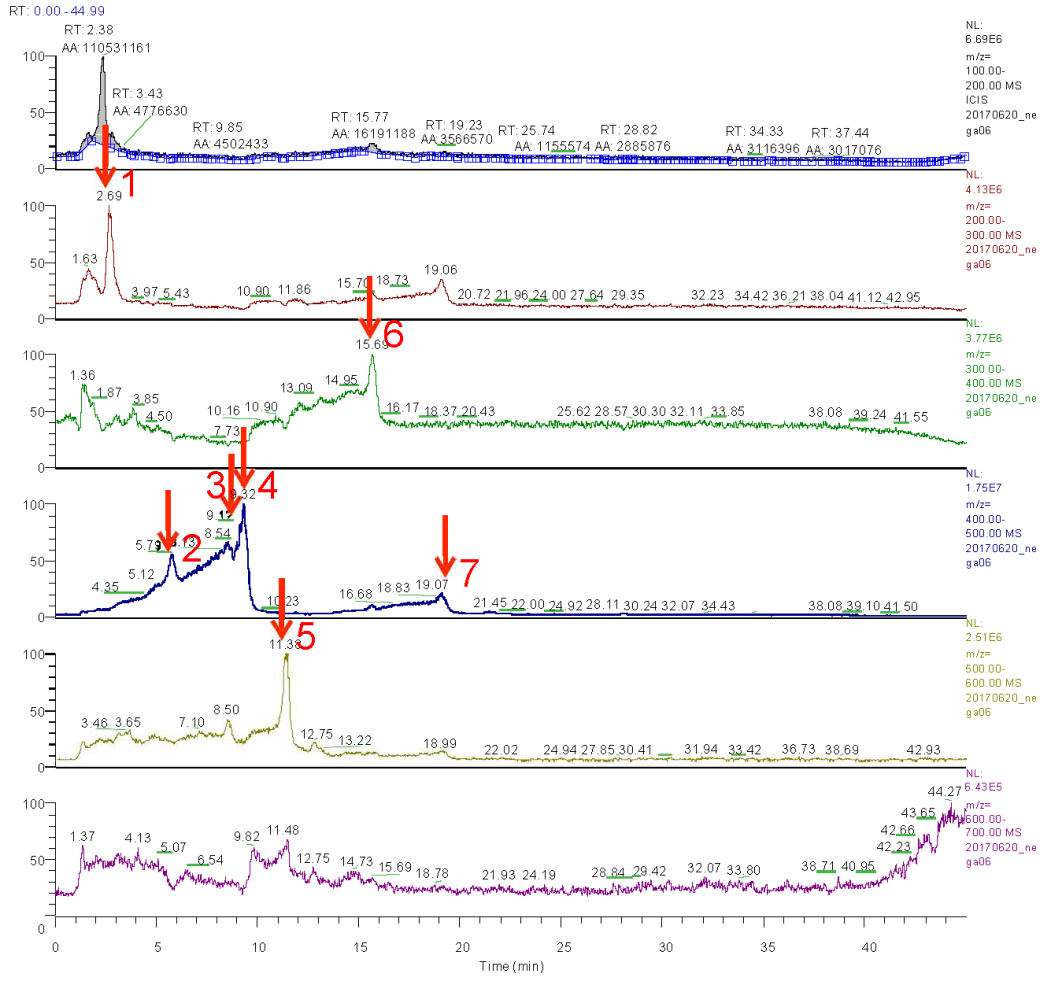
Şekil Ek 3.12. *P. sulcata* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

5 *Ramalina farinacea*



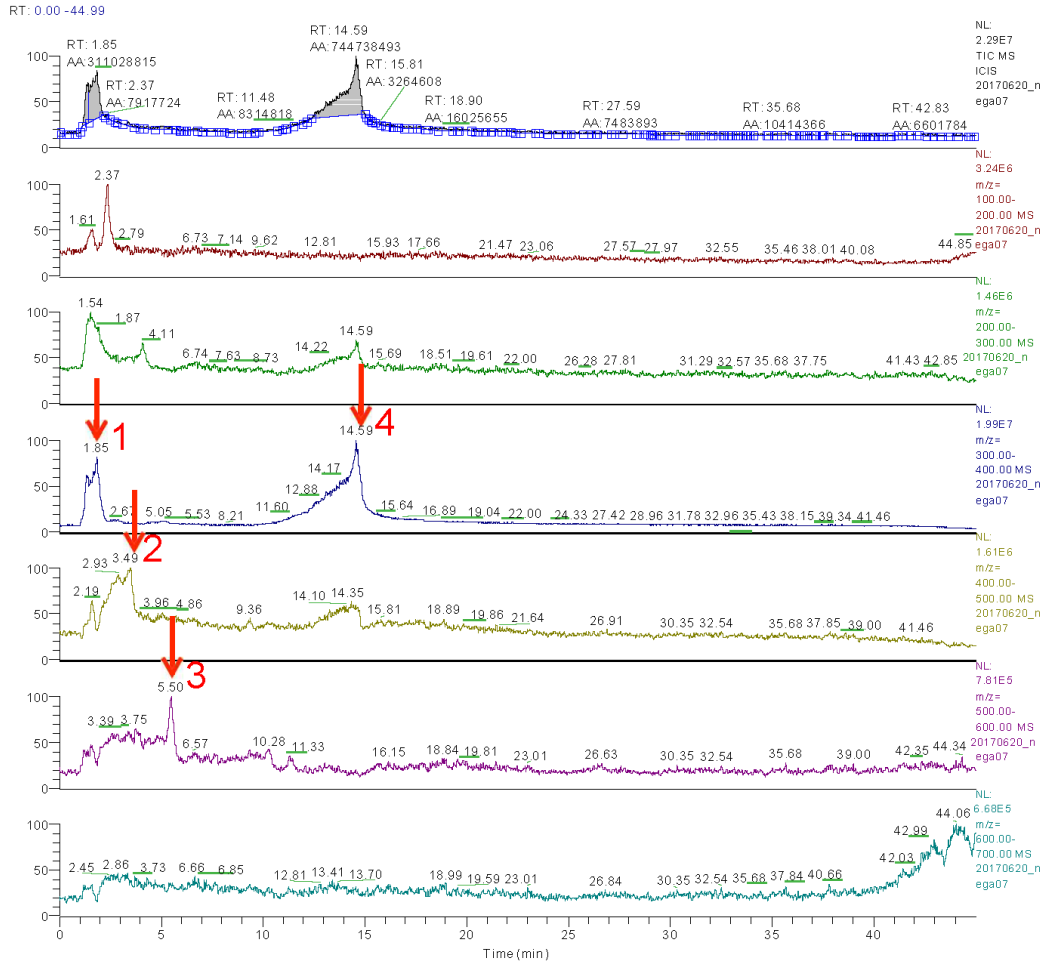
Şekil Ek 3.13. *R. farinacea* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

6 *Pseudevernia furfuraceae*



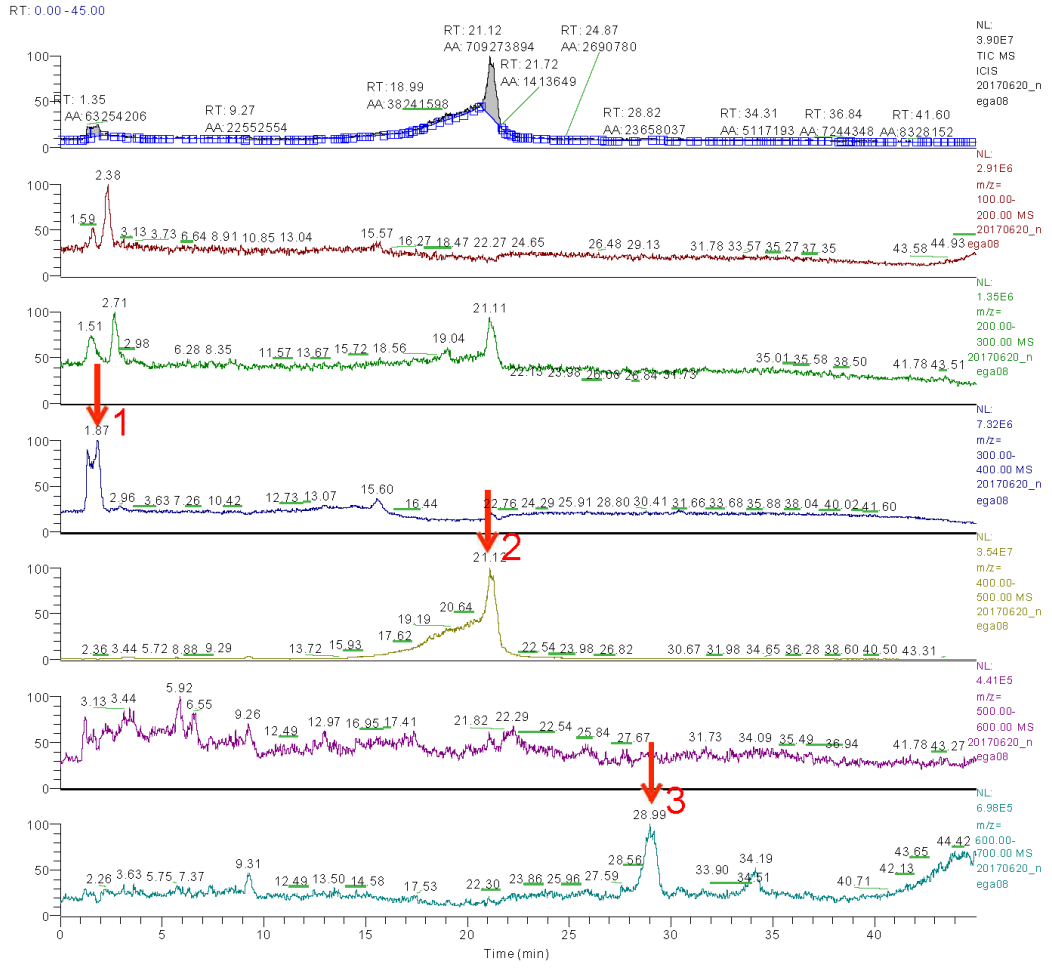
Şekil Ek 3.14. *P. furfuracea* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

7 *Usnea florida*



Şekil Ek 3.15. *U. florida* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

8 *Platismatia glauca*



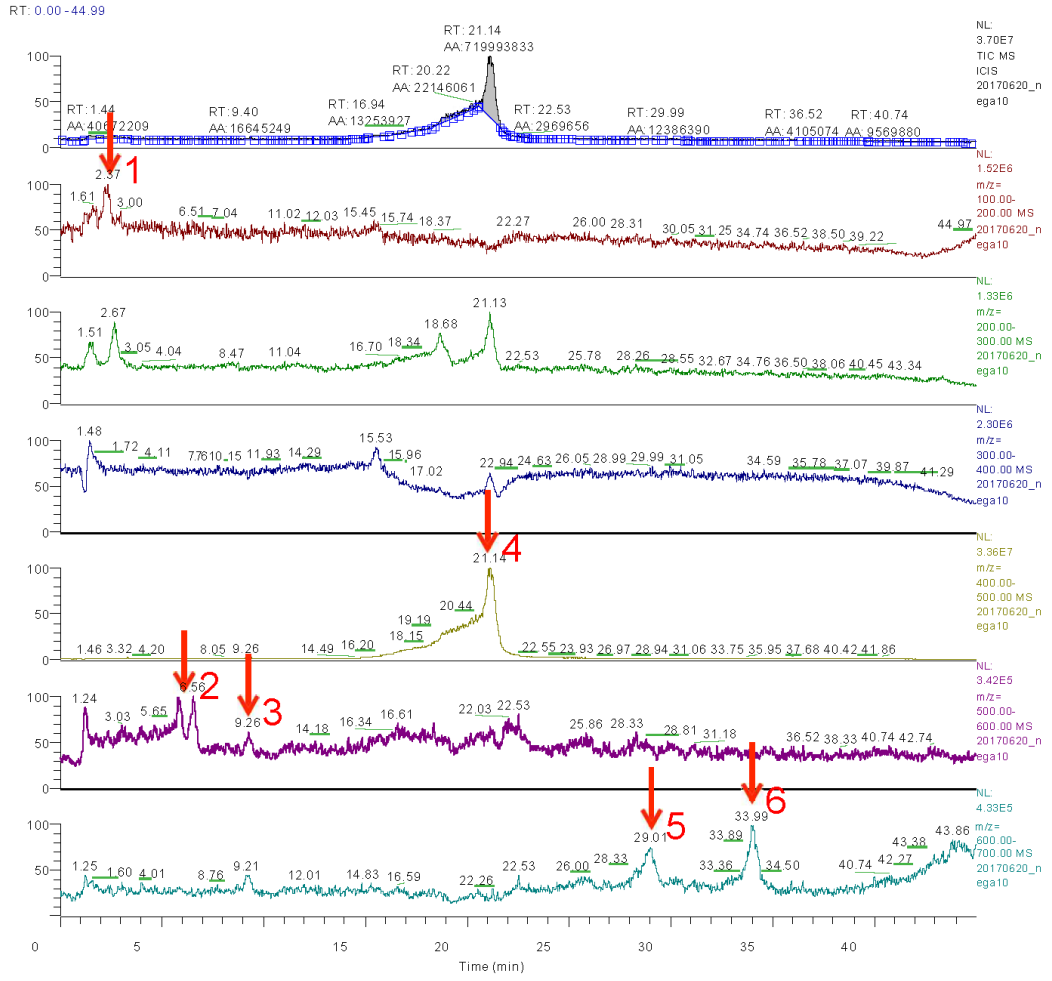
Şekil Ek 3.16. *P.glauca* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

9



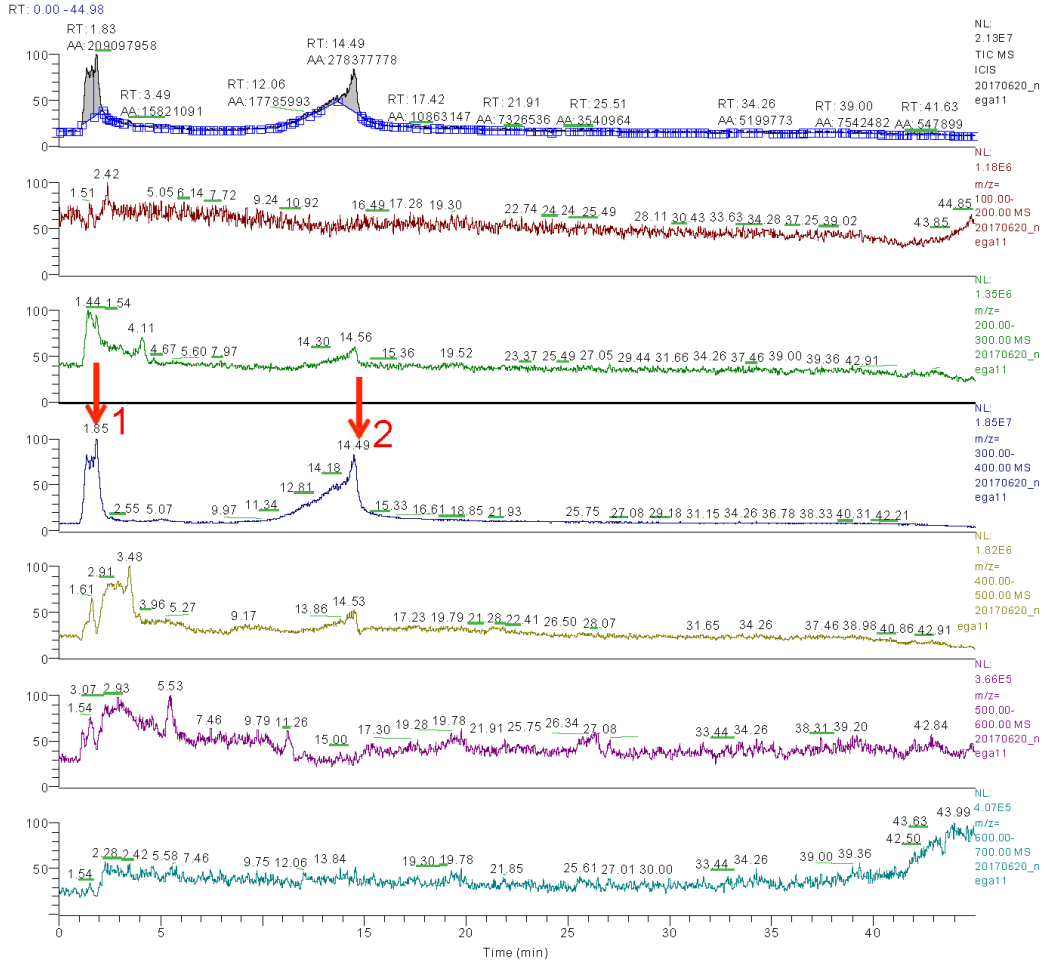
Şekil Ek 3.17. *P. glauca* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

10 *Platismatia glauca*



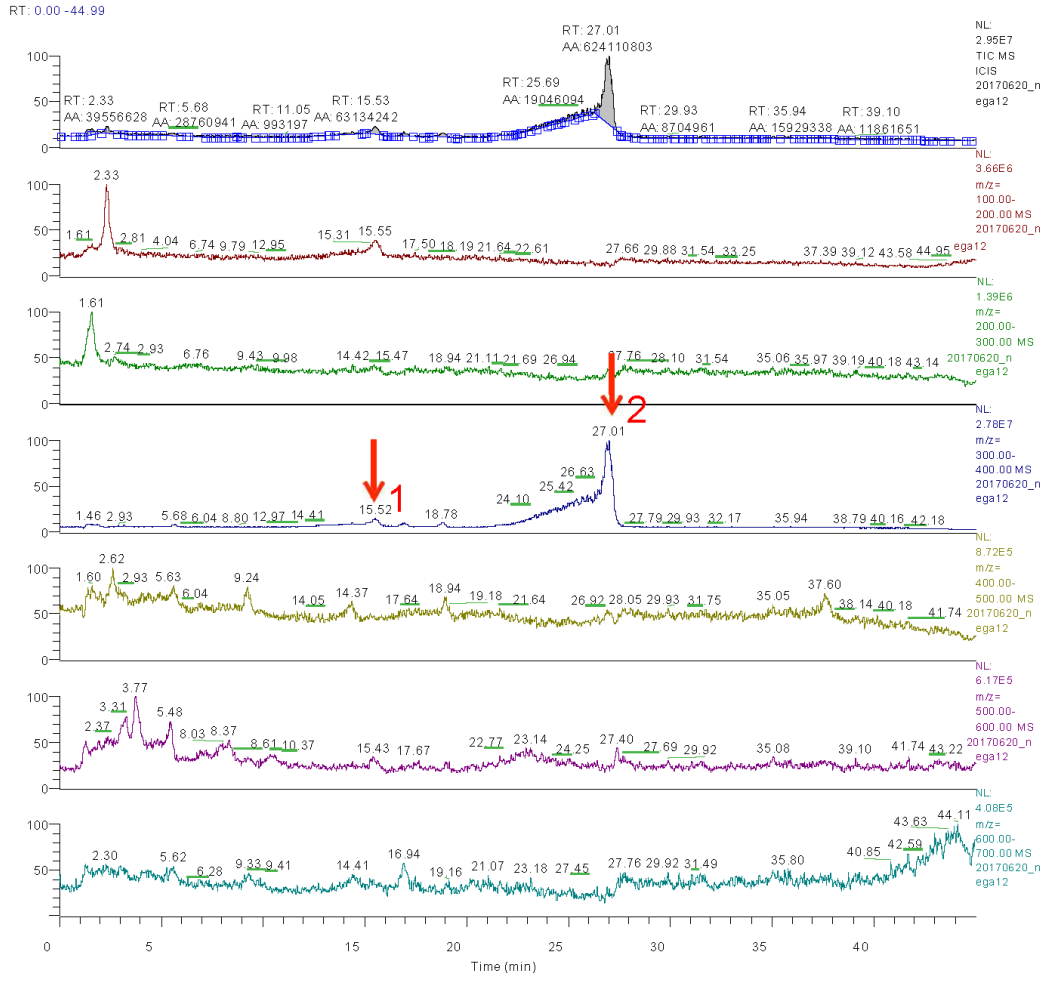
Şekil Ek 3.18. *P. glauca* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

11 *Usnea barbata*



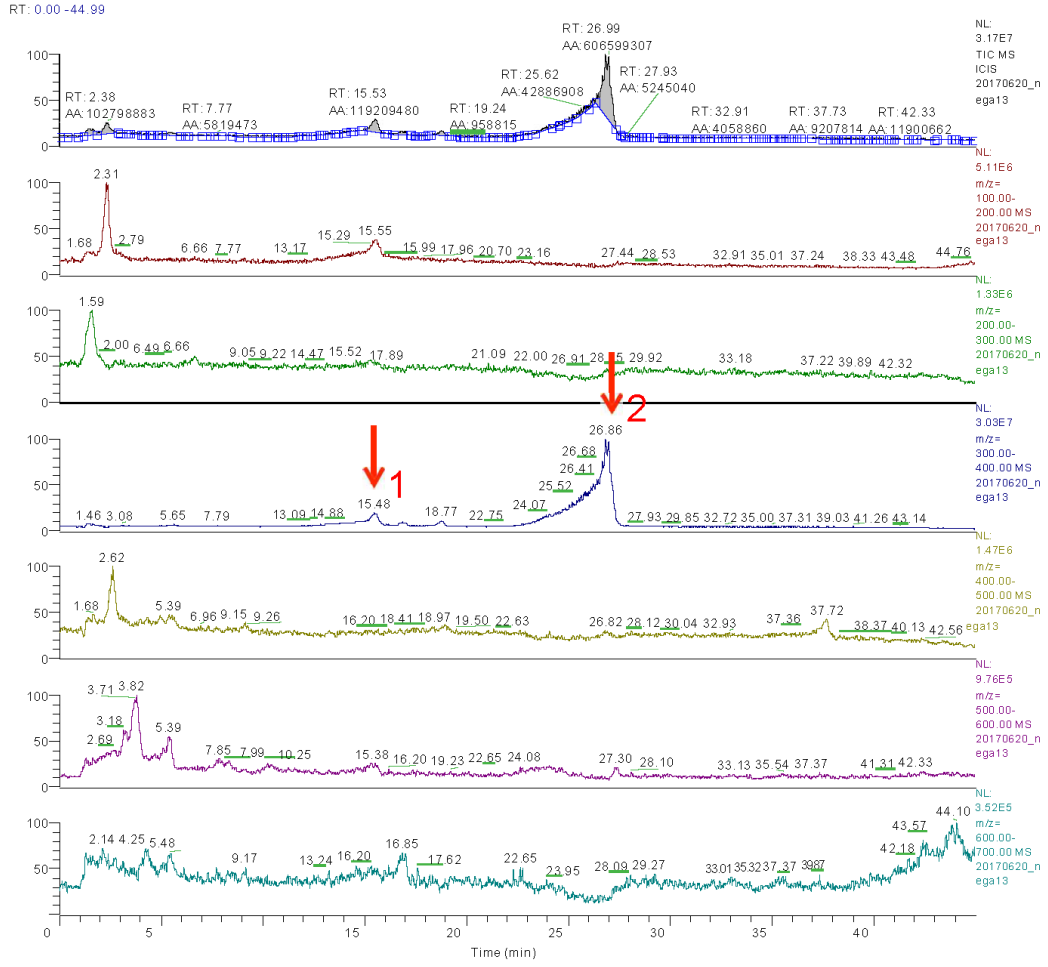
Şekil Ek 3.19. *U. barbata* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

12 *Cladonia rangiformis*



Şekil Ek 3.20. *C. rangiformis* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

13 *Cladonia rangiformis*



Şekil Ek 3.21. *C. rangiformis* liken özütüne ait LC/MS grafiği.

EK-4**Tablo Ek 4.1.** Gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile aşağı-regülasyona uğrayan genlerin GO Biyolojik Süreçler veritabanına göre ait oldukları metabolik yollar.

Zenginleştirme Hatalı Keşif Oranı	Regülasyonu değişen genler	Toplam gen	Fonksiyonel kategori
5.7E-13	78	1112	biyolojik işlemler
1.1E-11	71	1023	metabolik işlemler
6.2E-11	67	999	hücrel işlemler
1.3E-08	55	847	hücrel metabolik işlemler
1.1E-08	54	817	tek organizma süreci
2.5E-07	51	835	organik madde metabolik süreci
1.9E-07	47	729	tek organizmalı hücrel işlemler
1.2E-07	44	643	tek organizmalı metabolik işlemler
7.3E-05	40	732	birincil metabolik işlemler
1.6E-04	36	654	nitrojen bileşiği metabolik süreci
4.8E-06	32	460	organonitrojen bileşiği metabolik işlemler
9.2E-04	31	586	biyosentetik işlemler
1.0E-05	30	431	küçük molekül metabolik işlemler
6.8E-08	28	291	oksoasit metabolik işlemler
7.5E-08	28	293	organik asit metabolik süreci
4.1E-03	28	566	hücrel biyosentetik işlemler
1.6E-07	27	288	karboksilik asit metabolik süreci
4.8E-04	27	457	organik döngüsel bileşik metabolik işlemler
5.2E-04	26	435	hücrel aromatik bileşik

			metabolik işlemler
3.2E-08	24	210	oksidasyon indirgeme süreci
2.3E-11	23	126	katabolik işlemler
2.9E-11	21	105	tek organizmalı katabolik işlemler
6.2E-11	20	101	hücrel katabolik işlemler
8.7E-10	20	119	organik madde katabolik süreci
2.0E-06	17	143	alfa-amino asit metabolik süreci
3.1E-05	17	177	hücrel amino asit metabolik süreci
3.8E-03	17	274	organik döngüsel bileşik biyosentetik işlemler
8.2E-11	16	61	organik asit katabolik işlemler
8.2E-11	16	61	karboksilik asit katabolik işlemler
5.5E-10	16	69	küçük molekül katabolik işlemler
5.1E-11	15	48	hücrel amino asit katabolik süreci
5.9E-11	15	49	alfa-amino asit katabolik süreci
5.5E-10	15	59	organonitrojen bileşiği katabolik işlemler
8.4E-03	15	250	aromatik bileşik biyosentetik süreci
6.2E-11	14	42	çoklu organizma süreci
1.9E-03	13	165	biyolojik düzenleme
8.2E-06	12	80	monokarboksilik asit metabolik süreci
3.5E-03	12	156	Motilite
3.9E-03	12	159	yerleştirme kurulması
7.9E-03	12	176	lokalizasyon
1.8E-03	11	123	kofaktör metabolik işlemler

4.8E-03	11	142	tek organizma hareketi
6.2E-03	11	147	tek organizma lokalizasyonu
8.7E-08	10	32	aromatik bileşik katabolik işlemler
1.5E-07	10	34	homeostatik işlemler
4.5E-05	10	65	biyolojik kalitenin düzenlenmesi
2.7E-07	9	28	patogenez
1.2E-06	9	33	organik döngüsel bileşik katabolik işlemler
7.7E-03	8	89	koenzim metabolik süreci
8.5E-03	8	91	kofaktör biyosentetik süreci
8.8E-08	7	12	antibiyotik biyosentetik süreci
1.6E-07	7	13	antibiyotik metabolik işlemler
1.6E-07	7	13	ilaç metabolik süreci
6.2E-04	7	43	dikarboksilik asit metabolik süreci
1.8E-03	7	52	öncül metabolitlerin ve enerjinin üretimi
6.4E-07	6	10	quorum sensing
1.2E-06	6	11	hücre sayısının homeostazı
1.2E-06	6	11	serbest yaşayan bir popülasyondaki hücre sayısının homeostazı
1.4E-05	6	16	çok organizmalı hücresel işlemler
1.7E-04	6	24	aromatik amino asit ailesi metabolik süreci
2.1E-04	6	25	proteoliz
7.0E-03	6	51	strese tepki
2.0E-06	5	7	fenazin biyosentetik süreci
2.0E-06	5	7	L-fenilalanin metabolik süreci

2.0E-06	5	7	aromatik amino asit ailesi katabolik işlemler eritroz 4-fosfat /
2.0E-06	5	7	fosfoenolpiruvat ailesi amino asit metabolik süreci
3.2E-05	5	11	glutamat metabolik süreci
2.4E-04	5	16	sekonder metabolit sentezi
4.3E-03	5	31	organik bileşiklerin oksidasyonu ile enerji türevi
3.5E-06	4	4	L-fenilalanin katabolik işlemler
3.5E-06	4	4	tirozin metabolik süreci
3.5E-06	4	4	tirozin katabolik işlemler eritroz 4-fosfat /
3.5E-06	4	4	fosfoenolpiruvat ailesi amino asit katabolik işlemler
6.9E-04	4	11	oksidatif strese tepki
2.2E-03	4	15	ikincil metabolit biyosentetik süreci
7.7E-03	4	22	metabolik sürecin olumsuz düzenlenmesi
1.1E-04	3	3	dallı zincirli amino asit katabolik süreci
3.9E-04	3	4	fenol içeren bileşik metabolik işlemler
8.0E-04	3	5	histidin katabolik işlemler
8.0E-04	3	5	format metabolik işlemler
8.0E-04	3	5	glutamat ve formamide histidin katabolik süreci
8.0E-04	3	5	glutamat ve formatlama için histidin katabolik süreci
8.0E-04	3	5	formamid metabolik süreci
8.0E-04	3	5	imidazol içeren bileşik

			katabolik işlemler
8.0E-04	3	5	reaktif oksijen türleri metabolik işlemler
3.5E-03	3	8	siderophore metabolik işlemler
3.5E-03	3	8	siderophore biyosentetik süreci
3.5E-03	3	8	benzen içeren bileşik metabolik işlemler
4.8E-03	3	9	proteolizin düzenlenmesi
8.0E-03	3	11	demir koordinasyon taşıması
2.7E-03	2	2	valin katabolik işlemler
2.7E-03	2	2	salisilik asit metabolik süreci
2.7E-03	2	2	salisilik asit biyosentetik süreci
2.7E-03	2	2	pyochelin metabolik süreci
2.7E-03	2	2	pyochelin biyosentetik süreci
2.7E-03	2	2	fenol içeren bileşik biyosentetik işlemler
6.7E-03	2	3	fumarat metabolik işlemler
6.7E-03	2	3	hidrojen peroksit metabolik süreci
6.7E-03	2	3	hidrojen peroksit katabolik işlemler
6.7E-03	2	3	beta-ketoadipat yolu

Tablo Ek 4.2. Gen ontolojisi zenginleştirme analizi ile yukarı-regülasyona uğrayan genlerin GO Biyolojik Süreçler veritabanına göre ait oldukları metabolik yollar.

Zenginleştirme Hatalı Keşif Oranı	Regülasyonu değişen genler	Toplam gen	Fonksiyonel kategori
1.7E-09	65	817	tek organizma süreci
3.1E-09	78	1112	biyolojik süreç
3.0E-08	9	17	kobalamin metabolik süreç
3.0E-08	9	17	kobalamin biyosentetik süreci
3.0E-08	52	643	tek organizmalı metabolik süreç
3.6E-08	70	1023	metabolik işlemler
7.8E-08	55	729	tek organizmalı hücrel süreç
2.1E-07	10	28	tetrapirrol metabolik süreci
2.1E-07	10	28	tetrapirrol biyosentetik süreci
5.8E-07	11	40	vitamin metabolik süreci
5.8E-07	11	40	suda çözünür vitamin metabolik süreci
5.8E-07	11	40	vitamin biyosentetik süreci
5.8E-07	11	40	suda çözünür vitamin biyosentetik süreci
6.6E-07	17	106	transmembran taşıma
6.9E-07	37	431	küçük moleküllü metabolik süreç
1.8E-06	20	156	Motilite
2.3E-06	20	159	yerelleştirme kurulması
3.2E-06	23	210	oksidasyon indirgeme süreci
3.2E-06	9	30	inorganik katyon transmembran taşınması
3.7E-06	62	999	hücrel süreç
6.9E-06	18	142	tek organizma nakli
6.9E-06	9	33	inorganik iyon transmembran taşınması

8.5E-06	20	176	yerelleştirme
8.5E-06	9	34	katyon transmembran taşınması
9.8E-06	18	147	tek organizma lokalizasyonu
1.0E-05	4	4	amino asit betain metabolik süreci
1.1E-05	21	196	küçük moleküllü biyosentetik süreç
6.5E-05	24	274	organik döngüsel bileşik biyosentetik süreç
7.6E-05	8	34	organik hidroksi bileşik metabolik süreç
9.3E-05	8	35	tek değerlikli inorganik katyon taşınması
1.2E-04	28	363	tek organizmalı biyosentetik süreç
1.3E-04	22	250	aromatik bileşik biyosentetik süreci
1.3E-04	9	48	katyon taşınması
1.6E-04	5	12	amonyum iyonu metabolik süreci
1.8E-04	9	50	iyon transmembran taşınması
1.8E-04	41	654	nitrojen bileşiği metabolik süreci
1.9E-04	3	3	amino asit betain biyosentetik süreci
1.9E-04	3	3	kobalamin taşınması
1.9E-04	3	3	kolinden glisin betain biyosentetik süreci
1.9E-04	3	3	kolin metabolik süreci
1.9E-04	3	3	glisin betain metabolik süreci
1.9E-04	3	3	glisin betain biyosentetik

			süreci
1.9E-04	3	3	vitamin transmembran nakli
1.9E-04	3	3	vitamin nakli
2.0E-04	27	361	hücrel nitrojen bileşigi biyosentetik süreci
2.1E-04	22	264	heterosikl biyosentetik süreç
2.1E-04	11	79	organik madde taşınması
2.6E-04	23	288	karboksilik asit metabolik süreci
2.8E-04	11	82	iyon taşıma
2.9E-04	23	291	oksoasit metabolik süreç
3.1E-04	23	293	organik asit metabolik süreci
3.1E-04	6	23	aljinik asit metabolik süreci
3.1E-04	6	23	alginik asit biyosentetik süreci
3.2E-04	48	847	hücrel metabolik süreç
3.2E-04	31	460	organonitrojen bileşigi metabolik süreç
5.9E-04	3	4	etanolamin içeren bileşik metabolik süreç
8.4E-04	46	835	organik madde metabolik süreci
1.3E-03	3	5	potasyum iyonu taşınması
1.3E-03	3	5	tip III sekresyon sistemi tarafından protein sekresyonu
1.3E-03	3	5	hücrel potasyum iyonu taşınması
1.3E-03	3	5	potasyum iyonu transmembran taşınması
1.3E-03	29	457	organik döngüsel bileşik metabolik süreç
1.7E-03	4	12	hücrel biyosentetik sürecin pozitif düzenlenmesi

1.7E-03	4	12	nitrojen bileşigi metabolik sürecinin pozitif düzenlenmesi
1.8E-03	32	535	hücrel nitrojen bileşigi metabolik süreç
1.8E-03	6	32	nitrojen bileşigi taşınması
2.1E-03	33	565	organik madde biyosentetik süreci
2.2E-03	33	566	hücrel biyosentetik süreç
2.7E-03	27	435	hücrel aromatik bileşik metabolik süreç
2.7E-03	24	369	organonitrojen bileşigi biyosentetik süreci
2.8E-03	4	14	hücrel metabolik sürecin pozitif düzenlenmesi
2.8E-03	4	14	yerelleştirme düzenlemesi
2.9E-03	5	24	metal iyon taşımacılığı
3.3E-03	33	586	biyosentetik süreç
3.3E-03	2	2	organik katyon taşınması
3.3E-03	2	2	amonyum nakli
3.3E-03	2	2	putrescine nakliyesi
3.3E-03	2	2	spermidin taşınması
3.3E-03	2	2	denitrifikasyon yolu
3.3E-03	2	2	amonyum transmembran nakliyesi
3.3E-03	2	2	poliamin transmembran taşınması
3.3E-03	2	2	spermidin transmembran taşınması
4.3E-03	4	16	biyosentetik sürecin pozitif düzenlenmesi
4.7E-03	3	8	transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi, DNA şablonlu

4.7E-03	3	8	nükleobaz içeren bileşik metabolik sürecin pozitif düzenlenmesi
4.7E-03	3	8	RNA metabolik sürecinin pozitif düzenlenmesi
4.7E-03	3	8	RNA biyosentetik sürecinin pozitif düzenlenmesi
4.7E-03	3	8	nükleik asit şablonlu transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi
5.1E-03	4	17	alkol metabolik süreci
5.3E-03	26	441	heterosikl metabolik süreç
8.5E-03	2	3	biotin metabolik süreci
8.5E-03	2	3	biyotin biyosentetik süreci
8.5E-03	7	61	organik asit katabolik süreç
8.5E-03	7	61	karboksilik asit katabolik süreç
8.9E-03	3	10	makromolekül biyosentetik sürecinin pozitif düzenlenmesi
8.9E-03	3	10	gen ifadesinin pozitif düzenlenmesi
1.0E-02	4	21	hücrel biyojenik amin metabolik süreci
1.0E-02	4	21	hücrel amin metabolik süreci
1.0E-02	4	21	hücrel sürecin olumlu düzenlenmesi
1.1E-02	12	156	organik asit biyosentetik süreci

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : Barış GÖKALSIN

ÖĞRENİM DURUMU : Doktora

Derece	Alan	Üniversite	Başlangıç Yılı
Ortaöğretim	Sayısal	Özel Kalamış Lisesi	1999
Lisans	Sayısal	Anadolu Üniversitesi	2004
Lisans	Sayısal	Marmara Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Sayısal	Marmara Üniversitesi	2014
Doktora	Sayısal	Marmara Üniversitesi	2016

Yayınlar

Kitap bölümleri

Gökalsın, B., Berber, D., & Sesal, N. C. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Inhibition. In *Quorum Sensing* (pp. 227-256). Academic Press.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Başaran, T. I., Berber, D., Gökalsın, B., Tramice, A., Tommonaro, G., Abbamondi, G. R., ... & Sesal, N. C. (2020). Extremophilic Natrinema versiforme Against *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm. *Frontiers in microbiology*, 11, 79.

Gökalsın, B., Berber, D., Hur, J. S., & Sesal, C. (2020). Quorum sensing inhibition

properties of lichen forming fungi extracts from *Cetrelia* species against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(1), 22-27.

Balkan, A. A., Yıldız, A., Berber, D., Gökalsın, B., Sesal, N. C. (2020). Infusion or Decoction Extracts of *Helianthus annuus* Leaves: Potential Inhibitors for QS System and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, In publication.

Gökalsın, B., Berber, D., Özyiğitoğlu, G. Ç., Yeşilada, E., & Sesal, N. C. (2019). Quorum sensing attenuation properties of ethnobotanically valuable lichens against *Pseudomonas aeruginosa*. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-8.

Doğan, Ş., Gökalsın, B., Şenkardeş, İ., Doğan, A., & Sesal, N. C. (2019). Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of ethnopharmacology*, 235, 293-300.

Gökalsın, B., Aksoydan, B., Erman, B. & Sesal, N. C. (2017). Reducing Virulence and Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* by Potential Quorum Sensing Inhibitor Carotenoid: Zeaxanthin. *Microbial Ecology*, 1-8.

Uçarkuş, E., Gökalsın, B., Yıldırım, N., Açıkgöz, B., Özyiğitoğlu, G. & Sesal, N. C. (2017). Balıkesir Bölgesinden Toplanan Liken Örneklerine Ait Özütlerin *Escherichia coli* ATCC 25922 Üzerindeki Antibakteriyel Etkinlikleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 47(1), 26-32.

Gökalsın, B. & Sesal, N. C. (2016). Lichen secondary metabolite evernic acid as potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9), 150.

Kekeç, Ö., Gökalsın, B., Karaltı, İ., Kayhan, F. E. & Sesal, N. C. (2016). Effects of Chlorine Stress on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Analysis of Related Gene Expressions. *Current microbiology*, 1-8.

Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Sözlü sunumlar:

In silico and *in vitro* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Psoromic Acid, 6th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, 2018.

Pseudomonas aeruginosa Virülansına Karşı Mücadele için Ekstremofilik Quorum Sensing İnhibitörlerin Araştırılması, Turkish Microbiology Congress, 2018. (Co-author)

Evernic Acid Reduces Biofilm Formation and Virulence Gene Expression of *Pseudomonas aeruginosa*, 8th International Conference on Image Processing, Wavelet and Applications IWW2016, İstanbul, 2016.

Lichen secondary metabolites as potential quorum sensing inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa*,

KoRLI International Symposium and Workshop: Lichen Biodiversity in Asia and biological activity of lichen bioresources, Suncheon, Güney Kore, 2016.

Poster sunumları:

Pseudomonas aeruginosa las and *rhl* Quorum Sensing Inhibition by Atranorin, 2. International Green Biotechnology Congress, İstanbul, 2019.

Cucurbita pepo Ethyl Acetate Extracts against *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing and Biofilm, 2. International Green Biotechnology Congress, İstanbul, 2019.

Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by *Hypogymnia tubulosa* Lichen and Mycobiont Acetone Extracts, 2. International Green Biotechnology Congress, İstanbul, 2019.

Pseudomonas aeruginosa las and *rhl* Quorum Sensing Inhibition by *Xanthoria parietena* Acetone Extract, 2. International Green Biotechnology Congress, İstanbul, 2019.

Yeni Ftalosyanin Bileşikler ile *Pseudomonas aeruginosa*'ya Karşı Quorum Sensing

İnhibisyonu, 30. Ulusal Kimya Kongresi, KKTC, 2018.

Norlichexantone against *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl QS Systems, 6th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, 2018.

Biofilm and pqs System Inhibition Properties of Norlichexanthone against *Pseudomonas aeruginosa*, 6th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, 2018.

Determining the Effects of Lichen and Endolichenic Bacteria Extracts on *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Form, International IVEK Bio Congress, İstanbul, 2018.

Quorum Sensing Inhibitory Potential of *Halomonas campaniensis* on *Pseudomonas aeruginosa*, International IVEK Bio Congress, İstanbul, 2018.

Quorum Sensing Inhibitory Potential of *Natrinema versiforme* on *Pseudomonas aeruginosa*, International IVEK Bio Congress, İstanbul, 2018.

In silico and *in vitro* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Ergosterol, Turkish Microbiology Congress, 2018.

Quorum Sensing Inhibitory Potential of *Halomonas pantelleriensis* on *Pseudomonas aeruginosa*, Turkish Microbiology Congress, 2018.

Virulence Reducing Effects of Zeaxanthin and Evernic Acid on *Pseudomonas aeruginosa*, 3rd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2017.

Evernia divaricata ve *Platismatia glauca* Liken Türlerinin *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Formu Üzerindeki Etkinlikleri, 3rd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2017.

Ramalina calicaris Liken Türünün *Propionibacterium acnes* Biyofilm Formu Üzerindeki Etkisi, 3rd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 2017.

Effect of *Hypogymnia tubulosa* Acetone Extract on *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems and Biofilm Formation, 1st International Eurasia Mycology

Congress, Manisa, 2017.

Inhibition of *Propionibacterium acnes* Quorum Sensing and Biofilm formation by acetone extracts of *Platismatia glauca* from Alaçam-Bursa, 1st International Eurasia Mycology Congress, Manisa, 2017.

Usnea florida Liken Türünün *Propionibacterium acnes* Biyofilm Formu Üzerindeki Etkisi, 1st International Eurasia Mycology Congress, Manisa, 2017.

Bursa – Alaçam Bölgesinden toplanan *Cladonia rangiformis* Liken Türünün *Propionibacterium acnes* Biyofilm Formu Üzerindeki Etkisi, 1st International Eurasia Mycology Congress, Manisa, 2017.

Vulpinic Acid against *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems LasIR and RhlIR, 5th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, 2017.

Zeaxanthin as a Potential Quorum Sensing Inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*, 4th International BAU Drug Design Congress, İstanbul, 2017.

Inhibiting Quorum Sensing Systems of *Pseudomonas aeruginosa* by Extracts of Lichens Collected from Bolu Aladağlar Region, 8th International Conference on Image Processing, Wavelet and Applications IWW2016, İstanbul, 2016.

Effects of Light and Humidity on Polyketide Gene Expression Levels of *Evernia prunastri* L, 8th International Conference on Image Processing, Wavelet and Applications IWW2016, İstanbul, 2016.

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

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

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

The Effects of Ultrasound Application on Green Algae *Chlorella variabilis*,

International Congress on Applied Biological Sciences, Macedonya, 2015.

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

