

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa (PA01) Suşunun Değişik Isı ve Değişik Üreme Fazlarında Housekeeping Gen Anlatımı Düzeyleri

P. aeruginosa PA01 standart kökeninin ve dört ayrı hastaneden elde edilmiş dört *P. aeruginosa* klinik kökeninin 8 housekeeping geni 37 ve 42 derecelerde Brain-Heart Infusion, Mueller-Hinton ve Tryptic Soy Broth sıvı besi yerlerinde ve ayrıca dört değişik NaCl yoğunluğunda mRNA anlatımları açısından gerçek zamanlı PZR deneyi ile ölçüldü. Amaç değişen koşullara karşın anlatımı en istikrarlı genleri seçmek ve mRNA anlatımları açısından bağıl nicelik kıyaslaması yapmayı hedefleyen gelecek çalışmalarda bu istikrarlı genlerin gerçek zamanlı PZR deneylerinde iç kontrol olarak kullanımını önermektir.

Bu amaçla PA01 genomundan Oligo 5.0 programı yardımı ile *proC*, *fabD*, *rpoD*, *rpoS*, *oprB*, *rodA*, *rpoB* ve fonksiyonu bilinmeyen gen x1 seçilerek bunları hedef alan primer dizileri belirlendi. Total RNA izolasyonu asit-fenol guanidine metodu ile izole edilip Random Hexamer Primerleri aracılığı ile cDNA ya çevrildi. Deneyler 57⁰C derece annealing ısısı kullanılarak ve SYBR Green I boyasının ışımaya miktarları 84⁰C da ölçülerek yapıldı. Deneylerde elde edilen “Crossing Point” değerleri Bestkeeper ve NCSS programları aracılığı ile istikrarlılık ve birbirleri ile uyum açısından değerlendirildi.

proC ve *rpoD* genleri hem PA01 standart köken için hem de dört klinik izolat için en istikrarlı ve birbirleri ile uyumlu genler olarak bulundu. Bu genlerin *P. aeruginosa* ile yapılacak bağıl nicel kıyaslama amaçlayan gerçek zamanlı PZR deneylerinde iç kontrol olarak kullanılmalrı önerildi.

Anahtar kelimeler: *P.aeruginosa*, İç kontrol, Housekeeping gen, mRNA, Gerçek zamanlı PZR

ABSTRACT

Expression stability of housekeeping genes of *P. aeruginosa* (PA01) at various temperature and growth stages

Expression stability of 8 Housekeeping genes of *P. aeruginosa* PA01 and of four other clinical strains of *P. aeruginosa* isolated in four different hospitals were studied with real time PCR methodology after incubating these strains in 37 and 42 degrees centigrade in Brain-Heart Infusion, Mueller-Hinton and Tryptic Soy broth media and additionally in broth media with different NaCl concentrations. This study aimed to find most stable genes to be used in future studies as internal controls for relative quantification of mRNA expressions of genes in *P. aeruginosa*.

For this purpose, primers were designed by the aid of Oligo 5.0 for *proC*, *fabD*, *rpoD*, *rpoS*, *oprB*, *rodA*, *rpoB* and an unknown porin like gene x1 of the genome of PA01. Total RNA from strains was isolated by the acid-phenol guanidine method and transcribed to cDNA by Random Hexamer Primers. PCR cycles were accomplished by an annealing temperature of 57⁰C and the readings for SYBR Green I dye were at 84⁰C. Crossing points were evaluated for stability and correlation to each other by the softwares Bestkeeper and NCSS.

Both in PA01 and in clinical strains *proC* and *rpoD* genes were the most stable genes. This study suggested using these genes as the internal control of relative quantifications of genes in *P. aeruginosa* by real-time PCR method.

Key words: *P. aeruginosa*, Internal control, Housekeeping gene, mRNA, Real-time PCR



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
İÇİNDEKİLER	iii
1. KISALTMALAR	v
2. TABLOLAR	vi
3. ŞEKİLLER	vii
4. AMAÇ VE KAPSAM.....	1
5. GENEL BİLGİLER	2
5.1. <i>Pseudomonas</i>	2
5.2. <i>Fizyolojisi ve Yapısı</i>	2
5.3. <i>Patogenez ve İmmunite</i>	4
5.3.1. Adhesinler	5
5.3.2. Polisakkarit Kapsül	5
5.3.3. Endotoksin	5
5.3.4. Piyosyanin	5
5.3.5. Eksotoksin A	5
5.3.6. Eksoenzim S ve T	6
5.3.7. Elastaz	6
5.3.8. Alkalın Proteaz	6
5.3.9. Fosfolipaz C	6
5.3.10. Rhamnolipid	6
5.4. <i>Antibiyotik Direnci</i>	7
5.5. <i>Epidemiyoloji</i>	7
5.6. <i>İnsanda Yaptığı Hastalıklar</i>	8
5.6.1. Akciğer Enfeksiyonları	8
5.6.2. Primer Deri Enfeksiyonları	8
5.6.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları	9
5.6.4. Kulak Enfeksiyonları	9
5.6.5. Göz Enfeksiyonları	9
5.6.6. Bakteremi ve Endokardit	9
5.6.7. Diğer enfeksiyonlar	10
5.6.8. Laboratuvar Tanısı	10
5.6.8.1. Kültür	10
5.6.8.2. Tanımlama	10
5.6.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol	11
5.7. <i>Protein sentezi</i>	11
5.7.1. mRNA	12
5.7.2. tRNA Yapısı ve Fonksiyonu	14
5.7.3. Ribozomlar	14
5.7.4. Polipeptid Yapımı	15
5.7.4.1. Protein Sentezinin Başlaması	15
5.7.4.2. Uzama	15
5.7.4.3. Sonlanma	16
5.7.5. Poliribozomlar	16
5.7.6. Prokaryotik ve Ökaryotik Protein Sentezi Farkları	16
5.7.7. Housekeeping genler	17
6. MATERYAL VE METODLAR	18
6.1. <i>Bakteriler</i>	18
6.2. <i>Bakteri tanımlanması</i>	18
6.2.1. Kültür	18
6.2.2. Gram boyama	18
6.2.3. KOH testi	19
6.2.4. Oksidaz testi	19
6.2.5. Glukoz ve laktoz fermentasyonu ve oksidasyonu	19
6.2.6. Katalaz deneyi	19
6.2.7. Hareket testi	19
6.2.8. İndol	20
6.2.9. Metil kırmızısı-Voges Proskauer (MR-VP) testi	20
6.2.9.1. Üre hidrolizi	20
6.3. <i>Hedef gen bölgeleri ve primerler</i>	20
6.4. <i>P. aeruginosa'nın değişik koşullarda ve değişik ısılarda üretilmesi:</i>	21
6.4.1. Müeller-Hinton Agarın Hazırlanması	21
6.4.2. Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması	22
6.4.3. Deney düzeneği	22

Deney 1	22
Deney 2	22
Deney 3	22
Deney 4	22
Deney 5	23
6.4.4. Total RNA ve cDNA elde edilmesi.....	23
6.5. <i>Quantica cihazı ile gerçek zamanlı PZR deneyi</i>	24
6.5.1. Deneyin iyileştirilmesi	24
6.5.2. Sonuçların okunması.....	24
6.6. <i>mRNA anlatımlarının sabitlik ve uygunluk açısından değerlendirilmesi</i>	25
7. BULGULAR	26
7.1. <i>Gerçek zamanlı PZR deneyi</i>	26
7.2. <i>P. aeruginosa PA01 için elde edilen CP değerlerinin istikrar açısından değerlendirilmesi</i>	27
7.3. <i>Klinik kökenlerin HK gen anlatımları</i>	31
8. TARTIŞMA.....	33
9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	35
10. KAYNAKLAR.....	35
10.1. <i>Kitaplar</i>	35
10.2. 35	
10.3. <i>Periyodikler</i>	36
<i>ACHARYA A., PATERSON D. (2005). Pseudomonas aeruginosa. In Yu VL,</i>	36
<i>Weber R, Raoult D, edss. Antimicrobial Therapy and Vaccines. 2ed.....</i>	36
<i>Advanced in Pharmacy. Vol. 3(2):119-130.....</i>	36

1. KISALTMALAR

aa.....	Amino asit
A.....	Adenin
ATP.....	Adenosin trifosfat
BHI.....	Brain Hearth Infusion
C.....	Sitosin
CP.....	Çapraz nokta (Crossing Point)
EMB.....	Eosin Metilen Blue
ER.....	Endoplazmik retikulum
G.....	Guanin
GTP.....	Guanosin trifosfat
H ₂ S.....	Hidrojen sülfür
LT.....	Labil toksin
LPS.....	Lipopolisakkarit
MH.....	Mueller-Hinton (Oxoid)
MHB.....	Mueller Hinton Broth
mRNA.....	Messenger RNA
MR-VP.....	Mehyle Red-Voges Proskauer
KOH.....	Potasyum Hidroksit
rRNA.....	Ribosomal RNA
RT-PZR.....	Real –time Polimerase Chain Reaction
SRP.....	Sinyal tanıma tanecikleri
ST.....	Stabil toksin
T.....	Timin
tRNA.....	Transfer RNA
TBE.....	Tris-Borat-EDTA (Sigma)
TE.....	Tris EDTA
TSB.....	Triptic Soy Broth
TSI.....	Triple Sugar Iron Agar
U.....	Urasil

2. TABLOLAR

TABLO 1. KLİNİK ÖNEMİ OLAN BAZI PSEUDOMONASLARIN SINIFLANDIRILMASI	4
TABLO 2. <i>P. AERUGINOSA</i> 'NIN ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI	7
TABLO 3. KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ	21
TABLO 4. <i>P. AERUGINOSA</i> PA01 İÇİN CP DEĞERLERİ.....	28
TABLO 5. <i>P. AERUGINOSA</i> PA01 HK GENLERİNİN CP DEĞERLERİ İÇİN İSTATİSTİK ANALİZ SONUÇLARI.....	29
TABLO 6. HK GEN ANLATIM DÜZEYLERİNİN PEARSON CORRELATION COEFFICIENT DEĞERLERİ	30
TABLO 7. GEN CP DEĞERLERİNİN “REPEATED PAİR-WİSE CORRELATION” METODU İLE BESTKEEPER İNDEKSİNE KARŞI KIYASLANMASI	31
TABLO 8. KLİNİK ÖRNEKLERİN CP DEĞERLERİ.....	31
TABLO 9. KLİNİK ÖRNEKLERİN HK GEN ANLATIMLARININ BESTKEEPER İNDEKSİ İLE REGRESYON ANALİZİ ARACILIĞI İLE UYUMLULUĞU.....	32

3. ŞEKİLLER

ŞEKİL 1. POZİTİF ÖRNEĞİN AZALAN 10 KAT SEYRELTİKLERİ İLE ELDE EDİLEN 1A, BAĞIL İŞİMA DEĞERLERİ VE 1B, STANDART EĞRİ..... 25

ŞEKİL 2 . ÇALIŞILAN GEN ÜRÜNLERİNİN AYRIŞMA ISILARI 26

ŞEKİL 3. ÜRÜNLERİN JEL ELEKTROFOREZDE GÖRÜNTÜLENMESİ. M, GENE RULER (FERMENTAS); M1 – M4, 10 KAT SEYRELTİK POZİTİF KONTROL GEN ÜRÜNLERİ; 1-8, HK GEN ÜRÜNLERİ. 27

4. AMAÇ ve KAPSAM

mRNA anlatımı hücre fonksiyonlarının önemli bir parçasıdır. Protein sentezinin temelini teşkil eder. Genetik kod ile protein sentezi arasında köprü görevi görür. Genetik kodların çözüldüğü günümüzde genlerin fonksiyonlarının araştırılmasında da önemli bir aşamayı oluşturur (Zamorano et al. 1996). mRNA anlatımlarının çalışılması gen fonksiyonlarını ortaya çıkarmak için önemlidir. Bu alanda bugün için en duyarlı ve en kolay yöntem nicel Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)'dur (Pfaffl MW., 2001). Nicel RT- PZR bağıl değer veya mutlak değer için çalışılabilir. Genlerin fonksiyonunu araştırmak için çalışılan bağıl niceliktir. Bu da iki ya da daha çok örneğin belli genlerinin birbirlerine göre farklılıklarını ifade eder (Bustin, 2000). Örneğin tedavi öncesi ile tedavi sonrası ya da tedavi edilen ile tedavi edilmeyen gibi. Böylece tedavinin gen anlatımı üzerine olan etkisi araştırılır. Bağıl nicel değer çalışmalarında değişen koşullara karşın anlatımı değişmeyen genler iç kontrol olarak kullanılır. Bu genlere çoğu kez housekeeping (HK) genler denir. Her şeye karşın HK genlerin değişen koşullardaki anlatım düzeyleri farklılıklar gösterebilmektedir. Bunun için değişen koşullarda en istikrarlı HK genlerin tespit edilmesi bağıl nicelik çalışmalarında büyük önem taşımaktadır.

Değişen koşullara karşın istikrarlı kalabilen genler iç kontrol olarak kullanıldığında A örneğinde toplam mRNA miktarı ile B örneğinde toplam mRNA miktarı kıyaslanabilir ve dolayısı ile de A örneğinde yer alan toplam mRNA içerisinde aradığımız gen miktarı B örneğinde bulunan toplam mRNA içerisinde ki aynı gen miktarı ile karşılaştırılabilir olur. Bu da izolasyon, cDNA elde edilmesi ve örnek koyulması aşamalarında ki deney ortamından kaynaklanan farklılıkları en aza indirerek gerçek oranları kıyaslamamızı olanaklı kılar.

Bu çalışmanın amacı, *P. aeruginosa* (PAO1) suşunun değişik ısı ve değişik üreme fazlarında seçilmiş HK gen anlatımı düzeylerini ölçerek hangi genlerin daha istikrarlı olduğunu araştırmaktır.

5. GENEL BİLGİLER

5.1. *Pseudomonas*

Pseudomonas' lar toprakta, çürüyen organik maddelerde, bitkilerde ve suda yaşayan mikroorganizmalardır (Acharya and Paterson, 2005). Ayrıca hastane çevresinde; nemli ortamlarda, yiyeceklerde, kesilmiş çiçeklerde, lavabo, tuvalet, solunum ve diyaliz cihazlarında ve hatta dezenfektanlarda yaşayabilirler . Besin ihtiyaçlarının basit olması nedeniyle her yerde kolaylıkla üreyebilirler. Yatan hastalar ve bağışıklık sistemi zayıf kişiler hariç, normal florada kalıcı taşıyıcılık riski düşüktür. Bu enfeksiyonlarda mortalitenin yüksekliği, konak direncinin azalmasına, etkenin antibiyotiklere karşı direncine ve bakteriye ait enzim ve toksinlere bağlıdır. Karbon ve nitrojen kaynağı olarak pek çok organik maddeyi (glukoz, riboz ve glukonat gibi birkaç karbonhidratı) kullanırlar ve bazı türler eser miktarda besin kullanarak suda bile yaşar. *Pseudomonas* türleri, virulansını artıran pek çok toksin, yapısal eleman ve enzime sahiptir. Bu da onlara pek çok antibiyotiğe karşı direnç kazandırır. *Pseudomonas* ve ilgili mikroorganizmalar bitkilerin, hayvanların ve insanların fırsatçı patojenleridir. Özellikle insanlarda enfeksiyonlara yol açan fırsatçı türler; *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Pseudomonas putrefaciens*'tir. Sadece *Burkholderia mallei* ve *Burkholderia pseudomallei* insanlarda spesifik hastalık oluşturur. Klinik olarak en önemli olan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Aynı zamanda en iyi karakterize edilen *Pseudomonas*'tır.

P. aeruginosa nemli ortamlarda rahatça yaşayabilmesi ve serbest yaşayan bakteri olması nedeniyle de önem taşımaktadır (Venezia et al. 2005).

5.2. Fizyolojisi ve Yapısı

P. aeruginosa, küçük bazen ikişerli, bazen zincir oluşturacak gibi fakat çoğu kez tek tek görülen sporsuz, uçlarındaki tek, nadiren 2-3 adet kirpikleri ile çok hareketli, düz yaygın koloni (0.5-1.0 x 1.5-5.0µm) oluşturan gram negatif basillerdir. Her besi yerinde (McConkey dahil) ürerler. Optimal 37°C' de fakat aynı zamanda oda derecesinde ve 42°C' de de üreyebilirler ve sporsuzdurlar. Bazıları hücre dışına alginat salgıladıkları için mukoid koloniler yaparlar. % 5 koyun kanlı agar da

kolonileri basık, uçları tüylenmiş gibi veya R koloni biçiminde olup beta hemoliz yaparlar. Kültürlerinde tatlımsı, aromatik meyve, olgun üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzer bir özel koku oluştururlar. *P. aeruginosa* kökenlerinin çoğu mavi yeşil bir hücre dışı pigment olan piyosiyenin yaparak üredikleri ortamı bu renklere boyarlar. Bu pigment yalnız aerop ortamda oluşur. Bu pigmenti başka hiçbir bakteri oluşturmadığından, görülmesinin tanıda önemi büyüktür. Piyosiyenin kloroformda erir. *P. aeruginosa*'nın bazı kökenleri başka pigmentler de oluşturabilirler. Bunlar pyoverdin (veya fluorescein) wood ışığında yeşil floresans verir. Pyorubin kırmızı renkte ve pyomelanin kahverengi pigmentlerdir. Varlıkları halinde piyosiyeni maskeleyebilirler. Az sayıdaki kökenleri pigment oluşturmazlar. Bunların tanısında 42°C ' de üreme, arginini hidroliz etme, hareketli olma ve O-F (oksidatif-fermentatif) besi yerinde laktozu ve sukrozu parçalayarak asit oluşturma özellikleri önem taşır. Kanlı agar da beta hemolitik, karakteristik koloni görünümü ve özgül kokuyu oluşturan oksidaz olumlu, çok hareketli bakteriler *P. aeruginosa* için kuvvetli kuşkulu koloniler sayılır. Diğer biyolojik özelliklerinin araştırılması ve aminoglikozitlerle kolistin dışındaki antibiyotiklerin çoğuna doğal olarak dirençli olmaları *P. aeruginosa* tanısını kesinleştirir. *Burkholderia mallei* dışındaki diğer *Pseudomonas*lar hareketlidir. Hareketlerini tek polar flagella aracılığı ile sağlarlar. Bazı suşlar iki ya da üç flagella taşır. Flagella ısıya hassas antijenler (H antijeni) içerir. Bu antijenlere karşı oluşan antikorlarla serolojik sınıflama yapılmaktadır, nonfermentatif, son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanan bakterilerdir. Zorunlu aéropturlar fakat alternatif elektron alıcısı olarak nitrat veya arginini kullanarak anaerop üreyebilirler. Sitokrom oksidaz varlığı ile *Enterobacteriaceae* ailesinden ayrılırlar. Bazı türler polisakkarit kapsül yüzünden mukoid koloni oluştururlar ve sıklıkla kistik fibrozisli hastalardan izole edilirler. Bazı *Pseudomonas* türleri besi yerine yayılan pigmentler (piyosiyenin [mavi], fuloressein [sarı], piyorubin [kırmızı-kahverengi], piyomelanin[siyah]) üretirler (Brooks et al, 1998).

Tablo 1. Klinik önemi olan bazı Pseudomonasların sınıflandırılması

rRNA Homoloji Grup ve Subgrup	Cins ve Tür Adları
floresan veren grup (rRNA group I)	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i> <i>P. chlororaphis</i> <i>P. cichorii</i> <i>P. syringae</i> <i>P. viridiflava</i> <i>P. flavescens</i>
floresan vermeyen grup (rRNA group I)	<i>P. alcaligenes</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. luteola</i> <i>P. oryzihabitans</i>
rRNA group II	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia picketti</i>
rRNA group III	<i>Comamonas</i> türleri <i>Acidovorax</i> türleri
rRNA group IV	<i>Brevundimonas</i> türleri
rRNA group V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

* Collier et al. Topley and Wilson's, 9th edition; vol. 2, Systematic Bacteriology

5.3. Patogenez ve İmmunite

P. aeruginosa yapısal komponentler, toksinler ve enzimler gibi pek çok virulans faktörüne sahiptir.

5.3.1. Adhesinler

P. aeruginosa 'nın konak hücrelere yapışmasında pilinin eşlik ettiği ve etmediği adhesinler rol oynar. Pili epiteliyal hücrelere bağlanmada önemli rol oynar. *Neisseria gonorrhoeae* 'de de benzer bir yapı bulunmuştur. *P. aeruginosa* ayrıca nöraminidaz üretir. Nöraminidaz'ın görevi pili reseptöründen sialik asit artıklarını uzaklaştırmaktır.

5.3.2. Polisakkarit Kapsül

P. aeruginosa çok fonksiyonlu bir kapsüle sahiptir. Aynı zamanda mukoid eksopolisakkarid, aljinat tabaka veya glikokaliks de denir.

Polisakkarit tabaka bakterinin epitelyum hücrelere ve trakeobronşiyal müesine tutunmasını sağlar. Kapsül aynı zamanda organizmayı fagositozdan ve aminoglikosid gibi antibiyotiklerin etkisinden de korur. Mukoid yapıda ki bu polisakkaridin üretiminin düzenlenmesi karmaşıktır. *P. aeruginosa*'nın mukoid formuyla uzun süre kolonize olan kistik fibrozis ve kronik akciğer enfeksiyonu olan hastalarda polisakkarid oluşumunu kontrol eden genler aktive olur. Mukoid suşlar invitro olarak vasatta üretildiğinde mukoid olmayan fenotip kazanırlar.

5.3.3. Endotoksin

Önemli bir hücre duvarı antijenidir. Endotoksinin Lipid A komponenti sepsis sendromunun çeşitli etkilerine sebep olur.

5.3.4. Piyosyanin

P. aeruginosa 'nın ürettiği mavi pigment; oksijenin toksik formu olan süperoksid ve hidrojen peroksid üretimini katalizler eder. Piyoselin (demir bağlayan siderofor) varlığında doku hasarına sebep olan daha toksik hidroksil radikalleri üretilir. Bu pigment ayrıca inflamatuvar cevabı uyarır. Bazı bakterilerin üremesini engelleyip *P. aeruginosa* 'nın kolonizasyonunu kolaylaştırır.

5.3.5. Eksotoksin A

En önemli virulans faktörüdür. Bu toksin; ökaryotik hücrelerde protein sentezini durdurur. Bunu NAD'nin ADP-ribozil kısmını elangasyon faktör 2 üzerine transferi ile yapar. Sonuçta oluşan ADP-ribozil-EF-2 kompleksi protein sentezinde inaktiftir (Vasil, Kabat and Iglewski, 1977). Daha çok yanık yaralarında dermatonekroz oluşumunda, oküler enfeksiyonların kornea hasarında, kronik akciğer

enfeksiyonlarındaki doku hasarında rol oynar. Toksin ayrıca bağışıklık baskılayıcıdır. Hücre içindeki etki mekanizması difteri toksini ile benzerdir.

5.3.6. Eksoenzim S ve T

Eksoenzim S ve T ekstrasellüler toksinlerdir. Adenosin difosfat ribosiltransferaz aktivitesine sahiptir. ADP-ribozun GTP bağlayan bir protein üzerine naklini sağlar. Bununla beraber elongasyon faktör 2' yi modifiye etmez (Coburn et al., 1989a, 1989b). Tip III sekresyon sistemi tarafından proteinler hedef ökaryotik hücrelere salındığında özellikle epiteliyal hücre hasarı oluşturur, bakteriyel yayılım kolaylaşır, doku invazyonu ve nekroz oluşur. Bu sitotoksiste aktinin yeniden düzenlenmesi ile oluşur.

5.3.7. Elastaz

İki enzim, Las A (serin proteaz) ve Las B (çinko metalloproteaz) elastini parçalamak için sinerjik olarak çalışır. Bu da elastin içeren dokularda hasara ve hemorejik lezyonlara (ecthyma gangrenosum) sebep olur. Bu enzimler aynı zamanda komplement komponentlerini parçalar, nötrofil kemotaksisini ve fonksiyonunu inhibe eder. Akut enfeksiyonlarda doku hasarı ve bakteri yayılımına yol açar. Kronik Pseudomonas enfeksiyonları Las A ve Las B' ye karşı antikor oluşumu ile karakterizedir (Ohman, Burns and Iglewski 1980).

5.3.8. Alkalın Proteaz

Dokunun bozulmasına ve bakterinin yayılımına sebep olur. Konağın bağışık yanıtına müdahale eder.

5.3.9. Fosfolipaz C

Lipid ve lesitin yapısını bozarak dokunun parçalanmasını sağlayan ısı-labil hemolizindir (Esselmann and Liu 1961). Hemolizin üretimi ve hastalık oluşumu arasında önemli bir ilişki olmasına rağmen bu enzimin solunum ve üriner sistem enfeksiyonundaki rolü açık değildir.

5.3.10. Rhamnolipid

Lesitin içeren dokuları yaran ısı-dayanımlı hemolizindir (Sierra, 1960). Aynı zamanda solunum yolundaki siliar aktivitenin baskılanmasından sorumludur.

5.4. Antibiyotik Direnci

Pek çok antibiyotiğe karşı içsel direnci vardır. Tedavi sırasında daha da fazla direnç geliştirebilir. Pek çok direnç mekanizması tanımlandığı halde, en ilginç olanı porin proteinlerinin mutasyonu sonucu meydana gelen dirençtir. *Pseudomonas* hücrelerine antibiyotiklerin penetrasyonu dış membran porlarından olur. Porların çeperini oluşturan proteinlerin değişimi ile kanaldan geçiş kısıtlanır ve pek çok antibiyotiğe direnç gelişir. Ayrıca kromozoma bağımlı veya edinilmiş çeşitli β -laktamazların üretilmesi ile β -laktam antibiyotikleri (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler) etkisizleştirir (Murray et al. 2002). Ayrıca Drug efflux pompası MexAB-OprM; β -laktam, kloramfenikol, florokinolonlar, makrolidler, novobiosin, sulfonamidler, tetrasiklin, ve trimetoprim gibi antibiyotikler ile çeşitli boya ve deterjanları da uzaklaştırır (Livermore, 2002)

Tablo 2. *P. aeruginosa*'nın Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

<i>Antibiyotik</i>	<i>Direnç Mekanizması</i>
B-laktam antibiyotikler	B-laktam hidrolizi, Düşük permeabilite, Penisilin bağlayan proteinlerin değişimi
Aminoglikozidler	Adenilasyon, asetilasyon, veya fosforilasyon ile enzimatik hidroliz, Düşük permeabilite, Ribozomal hedefin değişimi
Kloramfenikol	Asetiltransferaz ile enzimatik hidroliz, Düşük permeabilite
Florokinolonlar	Düşük permeabilite, Hedefin değişmesi (DNA giraz)

5.5. Epidemiyoloji

*Pseudomonas*lar, her türlü ortamda bulunabilen fırsatçı patojenlerdir. Minimal besin gereksinimleri, geniş bir ısı aralığında üreyebilmeleri (4-42°C), çeşitli antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı dirençli olmaları önemli ayrıçlardır. Hastane çevresinde; çiçekler, hasta çıkartıları, tuvaletler, solunum ve diyaliz

cihazları, lavabo gibi nemli bütün ortamlarda ve dezenfektan solüsyonlarda yaşayabilirler. Özellikle hastane enfeksiyonlarında hastaların bağırsak floralarında *P. aeruginosa*'nın yerleşmesi önem taşır. İnsanlarda ve özellikle çeşitli nedenlerle savunma mekanizmaları zayıflamış kişilerde önemli hastalıklar oluştururlar (Blanc et al., 2004).

Hastalığın oluşumunda mevsimsel farklılık görülmez. Hastanede yatan hastaların solunum ve gastrointestinal sistemlerinde geçici olarak yerleşirler (özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi olanlarda, solunum cihazı kullananlarda ya da hastanede uzun süre yatanlarda) (Forbes et al. 2002).

5.6. İnsanda Yaptığı Hastalıklar

5.6.1. Akciğer Enfeksiyonları

P. aeruginosa 'nın yaptığı alt solunum yolu hastalıklarının şiddeti asemptomatik yerleşimden trakeobronşit' ve şiddetli nekrotizan bronkopnomoni' ye kadar çeşitlidir. Kistik fibrozlu hastalarda görülen invaziv enfeksiyonlar altta yatan akciğer hastalığı hastalığın kötüleşmesiyle ilişkilidir.

Bazı hastalardan izole edilen mukoid suşların antibiyotik tedavisi ile yok edilmesi zordur. Bağışıklık yetmezliği olan hastalarda *Pseudomonas* enfeksiyonlarını hazırlayan en önemli iki faktör: 1) Normal bakteri topluluklarını azaltan hatta yok eden geniş spektrumlu antibiyotiklerle ön tedavi, 2) Alt solunum yollarına (alveoller gibi) bakterilerin geçişini kolaylaştıran solunum cihazlarının kullanımınıdır.

Bu tür invazif hastalıklar küçük apse oluşumu ve doku nekrozunun eşlik ettiği yaygın tipik iki taraflı bronkopnomoni ile karakterizedir. Ölüm oranı yaklaşık %70 olarak bildirilmektedir (Murray et al. 2002).

5.6.2. Primer Deri Enfeksiyonları

P. aeruginosa çeşitli deri enfeksiyonlarına sebep olur. En çok karşılaşılanı da yanık yara enfeksiyonlarıdır. Şiddetli yanıklarda; yanık yüzeyinde yerleşme, sonrası vaskular hasar, doku nekrozu ve sonunda bakteremi görülür. Yaranın nemli yüzeyi ve doku invazyonuna karşı nötrofilik cevabın olmaması hastaların bu enfeksiyona yakalanmasına sebep olur. Topikal antibiyotiklerle yaranın tedavisi; bu enfeksiyonların kontrolünde sınırlı başarı sağlar.

Follikülit, bulaşık sularla alınan *Pseudomonas*ların sebep olduğu diğer bir

enfeksiyon tipidir.

*Pseudomonas*ların sebep olduğu ikincil enfeksiyonlar, aknesi olan veya bacaklarında kıl dönmesi olan hastalarda görülür. Ayrıca *P. aeruginosa* ile bulaşık sularla sık teması olan kişilerin ellerinde de tırnak enfeksiyonlarına sebep olur (Murray et al. 2002).

5.6.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner Sistem Enfeksiyonları genelde uzun süre idrar yolu kateteri kullanılan hastalarda görülür. Antibiyotik kullanımı da *Pseudomonas* gibi dirençli suşların yerleşmesine neden olur (Murray et al. 2002).

5.6.4. Kulak Enfeksiyonları

Dış kulak iltihabı yüzücülerde görülen *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyon topikal antibiyotikler ve kurutucu ilaçlarla tedavi edilebilir. Malign (habis) dış kulak yolu iltihabı ise diyabeti olanlarda ve yaşlılarda görülen hastalığın virulan formudur. Alttaki dokulara saldırır, kranial sinirlere ve kemiğe hasar verir, yaşamı tehdit edici olabilir. Yoğun antibiyotik tedavisi ve bazen de cerrahi müdahale gerektirir. *P. aeruginosa* ayrıca süreğen orta kulak iltihabına sebep olur (Murray et al. 2002).

5.6.5. Göz Enfeksiyonları

Göz enfeksiyonları korneada meydana gelen ilk travmadan (kontak lens sıyrıkları, göz yüzeyinde çizik) sonra oluşur. Eğer gerekli tedavi yapılmazsa kornea ülserleri gelişir ve yaşamsal tehlike görülür (Murray et al. 2002).

5.6.6. Bakteremi ve Endokardit

P. aeruginosa'ya bağlı baktereminin diğer gram negatif bakteremilerden ayırt edici bir yönü yoktur. Ancak, organizmanın bağışık yanıtı düşük hastaları seçmesinden ve *Pseudomonas*ın virulansından dolayı ölüm oranı daha yüksektir.

Bakteremi sıklıkla nötropeni, diyabetes mellitus, şiddetli yanıklarda ve hematolojik kanseri olan hastalarında görülür. Pek çok bakteremi, alt solunum yolu, üriner sistem, deri ve yumuşak doku (genelde yanık yara enfeksiyonu) enfeksiyonu ile ilişkilidir.

Bakteremi hastalarının pek azında saptanmasına rağmen karakteristik deri lezyonları (ecthyma gangrenosum) gelişebilir. Lezyonlar kanamalı, nekrotik, ve ülser

haline gelen eritemli veziküller olarak açıkça görülür. Lezyonların mikroskopik incelemesinde, nötropenik hastalardan beklendiği gibi organizmanın bolluğu, damarlarda deformasyon ve nötrofil eksikliği (ya da yokluğu) görülür.

Pseudomonas endokarditi, damariçi ilaç bağımlılarında en yaygın gözlenen olaydır. Enfeksiyon hastalar tarafından, suda yaşayan organizmalarla kontamine enjektör, kaşık gibi ilaç alımında kullanılan araçlarla alınır. Trikuspit kapakçık enfeksiyonu olan hastalar aortik veya mitral kapak enfeksiyonu olan hastalardan daha kronik seyir ve prognoz gösterir (Murray et al. 2002).

5.6.7. Diğer enfeksiyonlar

P. aeruginosa ayrıca gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi ve iskelet kası enfeksiyonlarında da görülür. Enfeksiyonların pek çoğunun oluşumunda altta yatan sebepler: Organizmanın nemli, rutubetli yerlerde yaşaması, konak savunmasından kaçması, kutanöz travma, antibiyotik kullanımı veya nötropeni ile normal floranın bozulmasıdır.

Bağışıklık yetmezliği olan hastalarda tüm *Pseudomonas* türleri fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. Akciğer enfeksiyonu olan hastalarda solunum sisteminde, üriner katateri olan hastalarda üriner sistemde yerleşirler.

Bir isolatın klinik anlamını değerlendirmek genelde zordur, çünkü hastalığa özgün işaret ve semptomları görülmeyebilir ve organizma klinik önemi olmayan bir bulaşı olabilir (Murray et al. 2002).

5.6.8. Laboratuvar Tanısı

5.6.8.1. Kültür

P. aeruginosa basit besin gereksinimleri nedeniyle kanlı agar ve MacConkey agar gibi besi yerlerinde kolaylıkla ürer ve zorunlu aeroptur (Forbes et al. 2002).

5.6.8.2. Tanımlama

Koloni morfolojisi (koloni büyüklüğü, hemolitik aktivite, pigmentasyon, koku) seçilen hızlı biyokimyasal testlerle karşılaştırılır, örneğin pozitif oksidaz testi.

P. aeruginosa hızlı ürer, yaygın yassı koloniye sahiptir, β hemoliz yapar, yeşil pigmentasyonu vardır (mavi piyosiyenin ve sarı fluorescein), kokusu tatlı üzüm kokusuna benzer. *P. aeruginosa*'nın kesin tanımı oldukça kolay olmasına rağmen, diğer *Pseudomonas*ların tanımlanması için ek fizyolojik testler gereklidir.

Biyokimyasal profili, antibiyotik labillik kalıbı, faj tipi, piyosin üretimi, serolojik tiplendirme, DNA'nın ya da rRNA'nın moleküler yapısı sınıflandırma için kullanılmaktadır (Forbes et al. 2002).

5.6.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol

Pseudomonas enfeksiyonlarında antibiyotik tedavisi kolay olamamaktadır çünkü bakteri ya çoğu antibiyotiğe karşı dirençlidir ya da enfeksiyonu olan bağışıklığı baskılanmış hastalar tedaviye cevap vermezler. Öte yandan duyarlı suşlar da tedavi sırasında dirençli hale gelebilir. İlaç kombinasyonları ; özellikle antipseudomonal β -laktam ile birlikte aminoglikozid veya florokinolon kullanmak tedavide etkili olabilir. Çünkü iki antibiyotiğin birlikte kullanılmasıklinik etkiyi arttıracak ve dirençli suşların oluşumunu engelleyecektir (Venezia et al., 2005).

Pseudomonas'ları hastane ortamından yok etmeyi denemek pratik olarak mümkün değildir. Etkili bir enfeksiyon kontrolü için solunum ekipmanı ve diyaliz cihazlarının bulaşından olabildiğince korunması ve hasta ve sağlık personeli arasındaki çapraz geçişin önlenmesi gereklidir. Normal floranın baskılanmaması ve dirençli *Pseudomonas*'ların ürememesi için geniş spektrumlu antibiyotiklerin gereksiz kullanımının engellenmesi önerilir (Murray et al. 2002).

5.7. Protein sentezi

Protein sentezi için gerekli genetik bilginin DNA'da depolanması ve DNA'da kodlanan bu bilginin RNA tarafından taşınmasına rağmen pek çok biyolojik aktivite proteinler tarafından yerine getirilir. DNA'daki şifre kullanılarak ribonükleotidler sentez başlangıç dizisine eklenir. DNA molekülünden bu şekilde RNA molekülü oluşmasına transkripsiyon denir. Transkripsiyonda RNA sentezi için DNA molekülünün sadece tek zinciri kullanılır. İki zincir arasında hemen hiçbir zaman şifrenin üst üste bindiği görülmez. Bununla birlikte nadir de olsa her iki yönde de kodlama bölgesi görülmesi olasıdır. Fakat bu son derece riskli bir durum yaratır. Çünkü tek bir mutasyon bile iki geni aynı zamanda işlevsiz hale getirebilir. Protein sentezinin doğru yapılması hücrelerin ve organizmaların fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için kritik bir öneme sahiptir. Bu yüzden aminoasitlerin DNA'da kodlandığı şekilde doğru bir sırada dizilmesi fonksiyonel proteinlerin sentezinde anahtar rol oynar. Protein sentezinde birbirleri ile uyumlu çalışan, üç farklı RNA molekülü vardır.

Messenger RNA (mRNA) DNA'dan kopyaladığı genetik bilgiyi her biri bir aminoasidi şifreleyen, üç üniteli kodlar halinde taşır. 300–50000 nükleotid uzunluğundadır. Protein sentezinde kalıp görevi görür.

Transfer RNA (tRNA) mRNA'da yer alan kodonların taşıdığı genetik mesaj ribozomlarda adım adım deşifre edilirken uygun aminoasitleri ribozoma getirir. Her aminoasidin kendine özel tRNA'sı vardır ve bu tRNA'lar aminoasitlere bağlanarak onları polipeptid zincirine taşır. Her aşamada doğru tRNA seçilmelidir, çünkü özgül tRNA molekülleri mRNA'daki kodonlara tamamlayıcı antikodonlar taşır.

Ribosomal RNA (rRNA) ribozomları oluşturmak üzere proteinlerle birlikte koordine çalışırlar. Bu karmaşık yapı mRNA molekülü boyunca hareket ederek aminoasitlerin protein zincirine eklenmesini katalizler. Aynı zamanda tRNA'ya ve protein sentezi için gerekli diğer aksesuar moleküllere bağlanır. Ribozomlar küçük ve büyük alt birimden oluşur. Bu alt birimlerin her birisi kendi rRNA molekülüne veya moleküllerine sahiptir.

Hücre sitoplazmasında 20 çeşit aminoasit bulunmaktadır. Ribozomlarda tRNA'ların bağlanabilecekleri çeşitli bölgeler bulunur ve aminoasitlerini bırakan tRNA'lar ribozomlardan ayrılırken polipeptid zinciri de sentezlenmiş olur. tRNA'lar üzerinde bulunan nükleotitlere antikodon denir. Örneğin CCC şeklinde olan bir mRNA zincirine uyan tRNA antikodonunun nükleotid sırası GGG şeklindedir. CCC şeklinde bir kodon da Prolin aminoasidinin şifresidir (Lodish et al. 2000).

5.7.1. mRNA

RNA adenin, sitosin, guanin ve urasil ribonükleotidlerini; DNA ise adenin, sitosin, guanin ve timin deoksiribonükleotidlerini içerir. Hücreler tarafından üçlü kod sistemi kullanılır ve buna kodon denir. 64 kodondan 61 tanesi çeşitli aa'leri kodlarken 3 tanesi stop kodonu olarak görev yapar. Pek çok aa birden fazla kodon tarafından kodlanır. Sadece metionin ve triptofan tek bir kodon tarafından şifrelenir. Bunun yanında lösin, serin ve arginin 6 farklı kodon tarafından tanınır. Hem prokaryotik hem ökaryotik hücrelerde tüm protein zincirlerinin sentezleri metionin aminoasidi ile başlar. Pek çok mRNA'da metionin 'i belirten başlangıç kodonu AUG, birkaçında GUG, ökaryotlarda ise CUG'dir. UAA, UGA ve UAG ise hiçbir aminoasidi şifrelemeyen, protein sentezinin bittiğini belirten stop kodonlarıdır. Spesifik başlangıç bölgesini belirten kodondan bitiş kodonuna kadar olan diziye okuma

çerçevesi denir. mRNA'daki üçlü ribonükleotid grupları bir proteindeki aminoasit dizisini ve protein zincirinin sentezinin nerde başlayıp biteceğini belirtir. Genetik kod virgülsüz olduğu için üçlü kodun üst üste binmesi ile mRNA teorikte üç farklı okuma çerçevesine sahiptir. Gerçekten de bazı mRNA çeşitleri farklı polipeptid zincirleri oluşturabilen değişik okuma çerçevelerine sahiptir. mRNA'ların büyük çoğunluğu bir okuma çerçevesine göre çalışır çünkü stop kodonları diğer iki olası okuma çerçevesinde translasyonu durdurarak fonksiyonel bir proteinin sentezini engelleyebilirler. Başka bir hata okuma çerçevesinin yön değiştirmesi olabilir. Bu olayda protein sentez mekanizması bir aminoasit için dört nükleotid okuyabilir ve sonrada üçlü kodonlar halinde devam edebilir veya bir baz geriye gider ve yeni çerçevedeki geçerli kodonları bitiş kodonuna kadar okur.

Bilinen tüm organizmalarda her kodonun anlamı aynıdır. Son zamanlarda birkaç kodonun mitokondrilerde, silyalı protozoonlarda ve tek hücreli bir bitki olan *Acetabularia*'da farklı anlam ifade ettiği bulunmuş. Tüm bunları stop kodonlarının aa gibi okunmasından kaynaklandığı görülmüştür.

Yapılan araştırmaların bir kısmında deneysel çalışmalarda kullanmak üzere protein sentezi için gerekli tüm komponentleri içeren (tRNA, ribozomlar (aa), enerji sağlayıcı nükleotidler ATP ve GTP), mRNA'sı ve hücresi olmayan bakteri ekstratları hazırlanmıştır. Daha sonra tek bir tip nükleotid içeren sentetik mRNA'lar bu bakteri ekstratlarına eklenmiş ve sonuçta polipeptid zinciri oluşturmuş aa'lar gözlemlenmiştir. Örneğin sadece Urasil (U) [poly(U)] konduğunda fenilalanin, sadece (C) Sitosin [poly(C)] eklendiğinde prolin, sadece Adenin (A) [poly(A)] eklendiğinde ise lizin elde edilmiştir. Fakat [poly(G)] bu deneyde çalışmamıştır, yapısından dolayı translasyon yapılamamıştır. Bu deneyle hem pek çok kodon elde edilmiş hem de kodonların üç bazdan meydana geldiği doğrulanmıştır.

Prokaryotlarda translasyon ve transkripsiyon aynı anda gerçekleşir. Transkripsiyon gerçekleşirken aynı anda ribozomlar yeni transkript RNA'ya bağlanmaya başlar ve eşzamanlı protein sentezi gerçekleşir. Bu da bize iki olay arasında direk bağlantı olduğunu gösterir. (Ökaryotlarda bu mümkün değildir. Çünkü RNA sentezi nukleusta gerçekleşirken proteinler sitoplazmada sentezlenir) (Lodish et al. 2000).

5.7.2. tRNA Yapısı ve Fonksiyonu

mRNA gibi tRNA da çekirdekte sentezlenir ve sitoplazmaya taşınır. Yaklaşık 80 nükleotid uzunluğunda tek bir zincir yapıdadır. Farklı tRNA bölgeleri hidrojen bağları ile birbirleri ile bağlanmış haldedir. tRNA'nın 3' ucu ACC nükleotid dizisine sahiptir ve aminoasitlerin bağlandığı bölgedir. Antikodonlar 3'→ 5' yönündedir ve mRNA'da ise kodonlar 5'→ 3' yönündedir. Örneğin antikodon baz sırası 3'-AAG-5' ise mRNA'daki kodon 5'-UUC-3' biçimindedir. mRNA'daki her bir aminoasit kodonuna özgü bir tRNA olsaydı 61 çeşit tRNA olması gerekirdi oysa sadece 45 çeşit tRNA vardır. Sebebi aynı antikodon bölgesine sahip tRNA'ların verilen aminoasitlere uyumlu birden çok kodonu tanıma yeteneğidir. Kodonların 3. pozisyonlarındaki baz ile onun antikodonundaki eşi olan 1. baz arasında standart olmayan baz eşleşmesi veya wobble(kararsızlık) özelliği nedeniyle bir tRNA çok sayıda kodonu tanıyabilir. Bu konuda en değişken tRNA Wobble pozisyonunda inosin(I) bulunduran tRNA'lardır. İnosin bir guanin analogu olup 2. karbon atomunda amino grubu taşımaz. tRNA antikodonunun wobble pozisyonundaki inosin başarılı bir şekilde adenin, sitosin veya urasil ile eşleşebilir. Örneğin tRNA antikodonu CCI olan bir tRNA, GGU, GGC ve GGA şeklinde mRNA kodonlarına uyup glisin amino asidini protein sentezine katabilir.

Kodon-antikodon eşleşmesinden önce tRNA'nın doğru aminoasidi taşıması gerekmektedir. Her bir aminoasiti tRNA'ya bağlayan 20 çeşit aminoaçil-tRNA sentetaz enzimi vardır. Bu enzimin aktif yüzeylerinden birine önce aminoasitin bağlanması gerekir. ATP, AMP'ye dönüşerek aminoasite bağlanır ve aktive edilmiş aminoasit de özgün enzime bağlanır. Daha sonra bu enzime ve aminoasite özgü tRNA enzime bağlanır. Aminoasit ve tRNA arasında bir bağ oluşur, bu sırada AMP açığa çıkar. tRNA ile birleşen aminoasit enzimden ayrılarak sitoplazmaya geçer (Lodish et al. 2000).

5.7.3. Ribozomlar

Ribozomlar protein sentezinin yapıldığı mRNA ile tRNA arasındaki bağlantının kurulduğu organellerdir. Büyük ve küçük alt birim olmak üzere sadece protein sentezinde birleşen iki kısımdan oluşur. Protein ve ribosomal RNA'lardan meydana gelmiştir. Ökaryotlarda alt birimler çekirdekte sentezlenir. Her bir ribozomda üç

bağlanma bölgesi vardır. Polipeptide eklenmek için bekleyen aminoasıl-tRNA A (Aminoasıl-tRNA bağlanan site) yüzeyinde beklerken sentezlenen polipeptid P (Peptil-tRNA bağlanan yüzey) yüzeyinde durur. Yükünü boşaltan tRNA ise ribozomdan çıkmak için E yüzeyine geçer. Bu işlemlerin olabilmesi için mRNA'nın kodonu ile tRNA'nın antikodonu arasındaki eşleşmenin kurallara uygun olarak gerçekleşmesi gerekir. Prokaryot ve ökaryot ribozomları arasında benzerlikler ve farklılıklar vardır. Prokaryot ribozomları bazı antibiyotiklerden büyük ölçüde etkilenir ve protein sentezi bu sayede durur (Lodish et al. 2000).

5.7.4. Polipeptid Yapımı

Translasyonun ana teması mRNA'da bulunan genetik bilginin fonksiyonel bir protein haline çevrilmesidir. Protein yapımını (translasyon) üç aşamaya ayırabiliriz. Başlama, uzama ve sonlanma. Bazı protein faktörleri ile birlikte mRNA, tRNA ve ribozomlar translasyon için gereklidir. Enerji ise GTP (Guanosin trifosfat) den sağlanır (Lodish et al. 2000).

5.7.4.1. Protein Sentezinin Başlaması

Protein sentezinin başında küçük alt birim mRNA ile birleşir ve başlatıcı tRNA ile sentez başlar. mRNA 5' ucundan okunmaya başlar. AUG kodonu protein sentezini başlatıcı kodondur. Daha sonra büyük alt birimle küçük alt birim birleşir ve protein sentezi ilerler. Gerkli olan enerji GTP'den sağlanır. Başlatıcı kodona uyan tRNA ribozomun P bölgesine yerleşerek A bölgesine kodona uygun yeni bir aminoasıl-tRNA gelmesi beklenir (Lodish et al. 2000).

5.7.4.2. Uzama

Ribozomun A yüzeyine uygun antikodona sahip tRNA gelir ve zayıf hidrojen bağlarıyla kodona bağlanır. Bu sırada 2 mol GTP harcanır. İkinci basamakta P yüzeyde bulunan polipeptid A yüzeyine gelen aa ile birleşecek biçimde oraya aktarılır. Ribozom mRNA üzerinde 3' yönüne doğru hareket ederek A yüzeyinde bulunan tRNA ile birlikte polipeptidi P yüzeyine aktarır. P yüzeyinde bulunan tRNA ise E yüzeyine geçerek ribozomdan uzaklaştırılır. Enerji GTP' den sağlanır. Ribozom mRNA üzerinde 5'→3' yönünde hareket eder. Okuma ise kodon seviyesinde

gerçekleşir (Lodish et al. 2000).

5.7.4.3. Sonlanma

Uzama mRNA üzerinde durma kodonlarına raslayıncaya kadar devam eder. A yüzeyine serbest bırakıcı faktörler geldiğinde okuma sonlanır. Bu faktörlerin A yüzeyine gelebilmesi için mRNA'daki kodonun UAG, UAA veya UGA şeklinde olması gerekir. Hidroliz enzimleri yardımıyla P yüzeyinde bulunan polipeptid serbest bırakılır. Böylece protein sentezi sonlanmış olur (Lodish et al. 2000).

5.7.5. Poliribozomlar

Aynı anda birçok ribozomun tek bir mRNA'yı okuması aynı proteinden fazla miktarda yapılmasını sağlar. Bir ribozom mRNA üzerinde ilerlerken diğer ribozomda mRNA'nın 5' ucuna eklenip ilerlemeye devam eder. Böyle ribozom zincirleri poliribozomları oluşturur. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunabilirler. Böylece kısa zamanda aynı proteinden çok sayıda yapılmış olur. Proteinler sentez edildikten sonra görevlerine göre değişik işlemlerden geçerek görevli oldukları yerlere giderler.

Hücrede ribozomların bir kısmı sitoplazmada serbest halde bulunup yaptıkları proteini sitoplazmaya verirken bazı ribozomlar (Endoplazmik retikulum, Golgi, lizozom) zar sistemlerine bağlı halde bulunurlar. Ribozomların hepsinde protein sentezi sitoplazmada serbest haldeyken başlar. Sentez ilerlerken Endoplazmik retikulum'a bağlanma gerçekleşir. Büyüyen polipeptidde sinyal peptid kısmında (20aa) sentezlenince sitoplazmada bulunan SRP(sinyal tanıma tanecikleri) ile birleşir. Protein sentezi ilerler ve polipeptid ER'ye bağlı kanallardan organelin boşluğuna serbest bırakılır. Böylece sinyal peptidler yardımıyla hedef proteinler istenen organelle iletilmiş olur (Lodish et al. 2000).

5.7.6. Prokaryotik ve Ökaryotik Protein Sentezi Farkları

Aralarında pek çok benzerliğin yanı sıra bazı farklılıklar da bulunmaktadır. Prokaryotlardaki ve ökaryotlardaki polimerazlar birbirinden farklıdır. Ayrıca ribozomlar arasında da farklılıklar görülmektedir. Prokaryotlarda çekirdek zarının olmaması transkripsiyon ve translasyonun aynı anda olmasını sağlar. Ökaryotlardaki

organellerin gelişmiş olması hedef proteinleri meydana getiren sinyallerin de gelişmesine sebep olur bu sistemler prokaryotlarda görülmez (Lodish et al. 2000).

5.7.7. *Housekeeping genler*

HK genler, hücresel fonksiyonların sürdürülebilmesi için gelişmenin her aşamasında hemen hemen her hücrede sürekli ekspresse olan genlerdir (Watson et al. 1965). Bundan dolayı daima aktiftirler. HK proteinleri kodlarlar. Her koşulda sürekli ama sabit miktarda internal veya harici kontrole gerek duymadan ekspresse olurlar.



6. **MATERYAL ve METODLAR**

6.1. **Bakteriler**

Deneylerde standart *P. aeruginosa* kökeni (PA01) ve ülkemizin farklı bölgelerinde yoğun bakım servislerinde hastalardan elde edilmiş dört adet suş kullanılmıştır.

P. aeruginosa PA01 Tilo Kohler tarafından gönderilmiş ve laboratuvarımızda bulunan bir kökendir [Kohler et al., 1997].

Diğer dört klinik izolat ise otomatik sistemlerle tanımlamaları yapılarak bir başka çalışma için laboratuvarımıza gönderilmiş suşlardan oluşan koleksiyondan seçilmiştir[Kolaylı et al., 2005]. Bu bakteriler ayrıca laboratuvarımızda klasik metotlarla tekrar tanımlanarak doğrulanmıştır.

6.2. **Bakteri tanımlanması**

6.2.1. **Kültür**

İncelenecek bakteri kanlı agara (%5-7 koyun kanlı), EMB besi yerine ve Mueller Hinton agara ekilmiş, 37°C’ de 18 saatlik inkübasyon sonrası bakteri kolonileri incelenmiştir. Kanlı agarda beta hemoliz yapan, EMB besi yerinde laktoz negatif ve tercihen MH agarda pigmentasyon gösteren koloniler, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri ve KOH testi ile doğrulanmıştır.

Gram negatif, katalaz ve oksidaz pozitif olanlar için biyokimyasal tanımlama testleri uygulanmıştır (Forbes et al. 2002).

6.2.2. **Gram boyama**

Üç eriyik ve bir zıt boya kullanılmış, lam üzerine tespit edilmiş preparatlar 2 dakika Jansiyen moru veya kristal moru ile boyanmış, saf su ile yıkanıp 2 dakika lugol eriyiğinde bekletilmiş ve % 96’lık etil alkol ile renksizleştirilmiştir. Gram pozitif bakteriler, önceden aldıkları boyayı alkolün etkisi ile bırakmazlar ve dolayısı ile mor renkte boyalı kalırlar. Gram negatif bakteriler ise alkol ile aldıkları boyayı bırakarak renksizleşirler. Bu bakterileri görünür hale getirmek için 30 saniye zıt boya eriyiği uygulanmıştır (sulu fuksin) (Forbes et al. 2002). Gram negatifler bu boya ile kırmızı renk alırlar. Sonuçta distile su ile yıkanan preparat havada kurumaya bırakılmış ve daha sonra immersiyon objektifi (x1000’lik büyütme) ile incelenmiştir. Sonuçta kırmızı, çomak şeklinde bakteriler gözlemlenmiştir.

6.2.3. KOH testi

Saf kültürden alınan örnek bir damla %3' lük KOH ile karıştırılmış, Gram negatif bakterilerin hücre duvarı parçalandığı için bakteri DNA' sı ortaya çıkmış ve uzama meydana gelmiştir (Forbes et al. 2002).

6.2.4. Oksidaz testi

%1' lik tetra methyl-p-phenilene diamine hidroklorid ile sitokrom oksidaz olumlu bakteriler mor-mavi-siyah renk verdiler (Forbes et al. 2002).

6.2.5. Glukoz ve laktoz fermentasyonu ve oksidasyonu

Saf kültürden Triple Sugar Iron Agar besi yerine ekim yapılmış, iğne öze ile saf kültürden alınan örnekten önce besi yerinin yatık kısım yüzeyine bir çizgi ekimi, sonra dip kısma bir batırma ekimi yapılmıştır. Sonra tüpler 35°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

TSI besi yeri glukozdan asit ve gaz oluşumunu, sukroz ve laktoza etkiyi, H₂S oluşmasını incelemede değer taşır. Besi yerinde bulunan fenol kırmızısı ayırıcı asit ortamda sarıya dönüşür. Glukoz fermentasyonu nedeni ile dip kısımda sarı renk, gaz oluşumundan gaz kabarcıkları, laktoz ve/veya sukroza etki halinde besi yerinin yatık kısmında sarı renk, H₂S oluşumunda, miktarına göre az ya da çok siyahlanma görülür. *P. aeruginosa* yatık kısımda alkali, dik kısımda alkali reaksiyon oluşturur (Forbes et al. 2002).

6.2.6. Katalaz deneyi

Katalaz enzimi hidrojen peroksidi su ve oksijene ayrıştırırlar. Bu enzim hidrojen peroksit ile araştırılır. İçersinde kan bulunmayan bir besi yerinde üretilmiş bakteri kolonilerinden örnek öze ile alınıp bir lamın üzerine bırakılmış, üzerine bir iki damla H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılıp bir kürdan ile karıştırılmıştır. Katalaz olumlu olan bakteriler gaz kabarcıkları oluştururlar (Forbes et al. 2002). *P. aeruginosa* katalaz olumlu bulunmuştur.

6.2.7. Hareket testi

SIM agar (Oxoid) besi yerine batırma yöntemi ile ekim yapılmış. Ekim çizgisinin besi yerinin yarısına kadar olmasına dikkat edilerek, 24 saat inkübasyondan sonra ekim çizgisinden yanlara ve aşağıya doğru bulanıklık oluşup oluşmadığı gözlenmiştir (Forbes et al. 2002).. Kökenler hareket testi pozitif bulunmuştur.

6.2.8. İndol

Bu test bakterilerin triptofandan indol oluşturan triptofonaz enzimine sahip olup olmadıklarını araştırır. İncelenecek bakteri indol besi yerine [SIM agar(Oxoid) besiyetine batırma kültür yöntemi ile] ekim yapılmış., 24 saat inkübasyondan sonra Kovacs ayırıcı damlatılıp, indol oluşumu olup olmadığı aranmış Fakat renk oluşumu görülmemiştir (Forbes et al. 2002; Bilgehan, 2002).

6.2.9. Metil kırmızısı-Voges Proskauer (MR-VP) testi

Metil kırmızısı deneyi bakterilerin karbonhidratları (glikozu) fermente etmeleri esnasında oluşan laktik, asetik ve formik asit gibi ürünlerin besi yerinin pH sını metil kırmızısı ayırıcı ile saptanabilecek derecede düşürmeleri temeline dayanır. Bu amaç için tamponlanmış glikozlu besi yeri ve metil kırmızısı ayırıcı kullanılır. Metil kırmızısı ayırıcı 4.4 ve daha aşağı pH larda kırmızı, 6.0 ve daha yukarı pH larda sarı renk verir. Metil kırmızısı olumlu olan mikroorganizmalar kırmızı, olumsuzlar sarı renk oluştururlar.

Glukozun fermentatif parçalanması esnasında oluşan piruvik asit, bir kısım bakterilerde bulunan enzimatik sistemlerle daha ileriye doğru parçalanarak son ürün olarak acetoin (asetil metil karbinol) oluşturulur. Özel ayıraçla ortaya çıkarılan bu ürünü oluşturan bakteriler Voges Proskauer (VP) olumlu kabul edilir. Kökenler 2 tane MR-VP buyyonuna inoküle edilip, 35°C ' de 18-24 saat inkübe edilmiş. İnkübasyon sonunda tüplerin birisine 5 damla MR miyarı eklenip kırmızı renk oluşumu gözlemlendi. Diğerine ise 0.6 ml VP 1 ve 0.2 ml VP2 miyarı eklenip, 1 saat kadar kırmızı renk oluşumu gözlemlendi. Her iki test içinde kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir (Forbes et al. 2002; Bilgehan, 2002).

6.2.9.1. Üre hidrolizi

Saf kültürden Christensen üre agar besi yerinin yüzeyine ekim yapılmıştır. 24 saat, bazen 48 saat 35° C' de inkübasyondan sonra üreyi hidroliz eden bakteriler besi yerindeki fenol kırmızısı ayırıcınının sarı rengini kırmızıya çevirirler (Forbes et al. 2002).. *Pseudomonas* türleri üre testinde negatif kalmıştır .

6.3. Hedef gen bölgeleri ve primerler

Hedef gen bölgeleri internet aracılığı ile elde edilen PA01 bütün genom dizisi üzerinden seçilmiştir (PubMed DEFINITION: *Pseudomonas aeruginosa*, complete

genome; ACCESSION: NC_002516). Bakteri yaşamında kritik öneme sahip olacağı düşünülen yedi bölge ve fonksiyonu bilinmeyen ancak dış membran proteini vasfında olabileceği varsayılan bir bölge belirlenmiştir. Bu bölgeler seçilirken daha önce yayınlanmış bir çalışma temel alınmıştır [Savli et al., 2003].

Primer dizileri OLIGO 5.0 programı kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 3. Kullanılan primer dizileri

Gen	Özellikleri *	Dizi
<i>fabD</i>	7U19	5' GCATCCCTCGCATTCGTCT 3'
<i>fabD</i>	151L19	5' GCGCTCTTCAGGACCATT 3'
<i>oprB</i>	507U22	5' CGAGGGCGAGGACTTCAACAGC 3'
<i>oprB</i>	681L22	5' CTCCAGGTTTCGACGGGTTCTGC 3'
<i>proC</i>	436U20	5' CAGGCCGGGCAGTTGCTGTC 3'
<i>proC</i>	596L20	5' GGTCAGGCGCGAGGCTGTCT 3'
<i>rodA</i>	853U21	5' CTGATCAGTCGTGGCCTGGTG 3'
<i>rodA</i>	1040L21	5' GAACCCCGAACCCTGACAACA 3'
<i>rpoB</i>	26U21	5' AACGTATCCGCAAGGACTTTA 3'
<i>rpoB</i>	172L20	5' ATAATCGGGAAAACGGACTT 3'
<i>rpoD</i>	1133U20	5' GGGCGAAGAAGGAAATGGTC 3'
<i>rpoD</i>	1291L20	5' CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA 3'
<i>rpoS</i>	104U21	5' CTCCCCGGGCAACTCCAAAAG 3'
<i>rpoS</i>	281L21	5' CGATCATCCGCTTCCGACCAG 3'
<i>X1</i>	68U20	5' ATGAGGGGGAAGCCAAAGAA 3'
<i>X1</i>	204L20	5' GCGTGTAGCCGGACTGAAAG 3'

* özellikleri; primer başlangıç pozisyonu – U (upper), L(Lower) – primer uzunluğu

6.4. *P. aeruginosa*'nın değişik koşullarda ve değişik ıslarda üretilmesi:

6.4.1. Müeller-Hinton Agarın Hazırlanması

Mueller-Hinton (MH) agar (MERCK), ticari olarak satılan preperatından üreticinin önerisine uygun olarak hazırlanmıştır. Otoklavdan çıktıktan sonra su banyosunda 45-50 °C ' e kadar soğutulmuş ve besi yeri, steril plastik petrilere, derinliği 3-4 mm olacak şekilde dökülmüştür. Besi yeri dökülen petrilere düzgün bir yüzeyde soğumaya bırakılıp, agar oda ısısına gelince kullanılmış veya aynı gün

kullanılmayacaksa buzdolabında saklanmıştır. Besi yerleri azami 7 gün içinde kullanılmıştır.

6.4.2. Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması

Mueller-Hinton (MH) broth (OXOID), Brain Heart Infusion (BHI) broth (OXOID) ve Tryptic Soy (TSB) broth (OXOID) ticari olarak satılan preperatından üreticinin önerisine uygun olarak hazırlanmıştır.

Besiyerleri her deney için taze hazırlanmış sterilite kontrolü için daima 10 ml broth 35°C'de ve 42°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

6.4.3. Deney düzeneği

P. aeruginosa (PAO1) suşu ve Türkiye'nin dört farklı ilinde (Ankara, Trabzon, İzmir, Kayseri) hastalardan izole edilmiş birer *P. aeruginosa* suşu Mueller Hinton Agara pasajlanmıştır.

Deney 1

Üç farklı sıvı besi yeri (MH, BHI, TSB) oda sıcaklığına geldiğinde katı besi yerinde üreyen taze *P. aeruginosa* PAO1'den tek koloni alınarak besi yerlerine inoküle edilmiş, 37°C'de 9 ve 16 saat inkübasyon sonrası total RNA izole edilerek cDNA'ya çevrilmiştir.

Deney 2

Üç farklı sıvı besi yerleri (MH, BHI, TSB) oda sıcaklığına geldiğinde katı besi yerinde üreyen taze *P. aeruginosa* PAO1'den tek koloni alınarak besi yerlerine ekilmiş, 42°C'de 9 saat ve 16 saat inkübasyon sonrası total RNA izole edilerek cDNA'ya çevrilmiştir.

Deney 3

Ticari olarak satılan Mueller Hinton Broth un NaCl oranı %2'dir. Bu deney için MHB'da %2 - %4 - %6 - %8'lik tuz yoğunluğu hazırlanarak PAO1 bu sıvı besi yerlerine ekilmiş, 37°C'de 9. saat inkübasyon sonrası total RNA izole edilerek cDNA'ya çevrilmiştir.

Deney 4

Türkiye'nin dört farklı ilinden (Ankara, Trabzon, İzmir ve Kayseri) hastalardan izole edilmiş *P. aeruginosa* suşlarından MHB'a tek koloni ekimi

yapılarak 37°C'de 9 saat inkübasyon sonrası total RNA izole edilmiş ve cDNA'ya çevrilmiştir.

Deney 5

Bu dört farklı suş MHB' da 42°C 9 saat inkübasyon sonrası total RNA izole edilerek cDNA'ya çevrilmiştir.

Tüm cDNA'lardan 8 farklı HK genin mRNA anlatım düzeylerine bakılmıştır.

6.4.4. Total RNA ve cDNA elde edilmesi

Total RNA 5 ml sıvı besi yerinden asit guanidin denaturasyonu ve asit-fenol kloroform ekstraksiyonu prensibine dayanan bir kit kullanılarak yapılmıştır (EZ-RNA, Biological Industries, Israel). Metodun detayları daha önce labotatuvarımızda yapılan bir çalışmada da anlatılmıştır [Kolayli et al., 2004]. Temel olarak kit yapımıcısının tarif ettiği yöntem uygulanmış ancak ek olarak son aşamada bir kloroform ekstraksiyonu eklenmiştir. Bu aşama daha sonra yapılacak enzim bağımlı cDNA dönüştürülmesi aşamasında reaksiyonun verimliliğini artırmaktadır.

Metot kısaca guanidin-HCl ile hücre duvarı eritilmesi ve DNaz enzimlerinin etkisizleştirilmesini takiben asit-fenol ve kloroform ile hücre artıklarının ve kromozomal DNA'nın çöktürülmesi prensibine dayanmaktadır. Nihai kloroform aşaması ise fenolün uzaklaştırılmasını sağlar. Daha sonra izopropanol ve tuz yoğunluğunun yardımı ile çözünürlüğü azalan RNA santrifüj ile çöktürülür, %70 yüksek saflıkta alkol ile yıkanan çökelti, beş dakika oda derecesinde kurutulur ve 50 µl RNAz-DNAz içermeyen yüksek saflıkta H₂O ile çözülür.

RNA içeriği yapısal RNA, tRNA ve mRNA'dan oluşmaktadır. Bu hali ile mRNA çok dayanıksızdır, dolayısı ile hemen cDNA'ya dönüştürülmesi önerilir. Bu metot ile RNA izole edildiğinde DNaz terbiyesi yapılması çok anlamlı değildir. Bir miktar DNA bulaşığı kalsa da genlerin mRNA anlatımları birbirlerine göre kıyaslandığı için sonucu etkilemez. Oysa DNaz terbiyesi aşaması mRNA kaybına sebep olmaktadır.

cDNA elde edilmesi MMuLV reverse transkriptaz enzimi (Fermentas) aracılığı ile sağlanmış, 1x RT Buffer (enzimle birlikte geliyor), 1 mM dNTP karışımı, 0.1mM Random Hexamer Primerler, 2 u RNaz önleyici, 200 u MMuLV (MBI, Fermentas, Lithuania) ve 8 µl RNA 20 µl nihai hacim içerisinde 42°C de 120 dakikada cDNA ya dönüştürülmüştür. cDNA daha sağlam ve dayanıklı bir yapıdır, dolayısı ile de -20°C de saklanabilir.

6.5. Quantica cihazı ile gerçek zamanlı PZR deneyi

6.5.1. Deneyin iyileştirilmesi

Deney 96 kuyulu bir ısıtıcı plaka ve ışık yansımalarını dört dalga boyunda ölçebilen bir PZR cihazı ile yapılmış (Quantica; Techne, UK), ışık yansıması için SYBR Green I boyası kullanılmıştır. SYBR Green I çift sarmal DNA ya bağlanma kapasitesi olan ve bağlandığında floresan yansıması anlamlı olarak artan bir boyadır. Ortamda çift sarmal DNA miktarı arttıkça floresans yansıma da artar. Başka bir deyişle PZR döngülerinde ürün miktarı arttıkça ışıma artar. Hedef DNA'nın miktarı ne kadar fazla ise o kadar erken ve o kadar çok yansıma başlar (Ririe et al., 1997; Wittwer et al., 1997) .

Bu amaçla klasik PZR karışımlarına SYBR eklenir. Bu tür reaksiyonlarda Mg yoğunluğu deneyin etkinliğine katkıda bulunur (Oste, 1988). Bu deneyler esnasında reaksiyon karışımına 1,5 mM MgCl₂ eklenmiş, primer yoğunlukları 50 pmol/50 µl olacak şekilde ayarlanmış, Taq polimeraz enzimi (Fermentas, Lituanya) 2 u/reaksiyon olarak kullanılmıştır.

Deney döngüsü 95⁰C de 5 dakikalık denaturasyonu takiben 57⁰C de 1 dakika, 72⁰C de 2 dak., 84⁰C de 5 saniye ve 94⁰C de 30 saniye olarak ayarlanmış, 84⁰C de SYBR ışması ölçülmüştür. Dimer oluşumu halinde kaynaklanacak ışıma 84 derecede dimer sarmalları tamamen ayrıldığı için düşmekte ve dimer dolayısı ile oluşan yansıma kalmamaktadır. Bunun için okumalar 84⁰C de yapılmıştır.

Deneylerde amaç miktar tayini olmadığı için Pozitif kontrol sulandırılmaları kullanılmış olmasına karşın değerlendirmeye alınmamıştır.

Reaksiyon bitiminde “melting curve” yani çift sarmal DNA ayrışma ısısı eğrisi analizleri yapılarak beklenen ürünlerin varlığı saptanmış ayrıca ürünler %1 agaroz jelde yürütülerek gözlemlenmiştir.

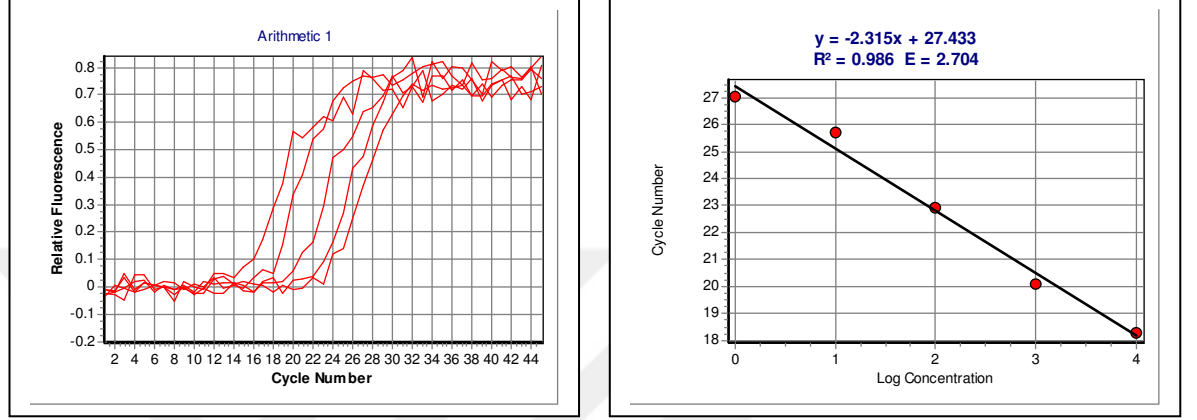
6.5.2. Sonuçların okunması

Sonuçlar crossing point (CP) denilen ışıma seviyelerinin gerçek zamanlı PZR cihazı ile birlikte gelen program tarafından değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu program her örneğin ışıma değerinin artmaya başladığı döngüyü o örnek için CP değeri olarak belirlemektedir. CP değeri ne kadar küçükse çoğalma o kadar erken başlamıştır. Yani gen miktarı fazladır.

Eğer amaç miktar tayini ise deneye içindeki gen miktarı bilinen pozitif kontrol

miktarının katlı seyreltikleri eklenir ve bu örneklerden elde edilen değerler ile bir grafik çizilir (Şekil 1). Elde edilen standart eğri bilinmeyen örneğin CP değerine karşılık o örneğe denk gelen gen miktarını gösterir.

Bu çalışma gen anlatım düzeyini sayısal değer olarak hesaplamayı amaçlamamaktadır.



Şekil 1. Pozitif örneğin azalan 10 kat seyreltikleri ile elde edilen 1A, bağlı ışma değerleri ve 1B, standart eğri

6.6. mRNA anlatımlarının sabitlik ve uygunluk açısından değerlendirilmesi

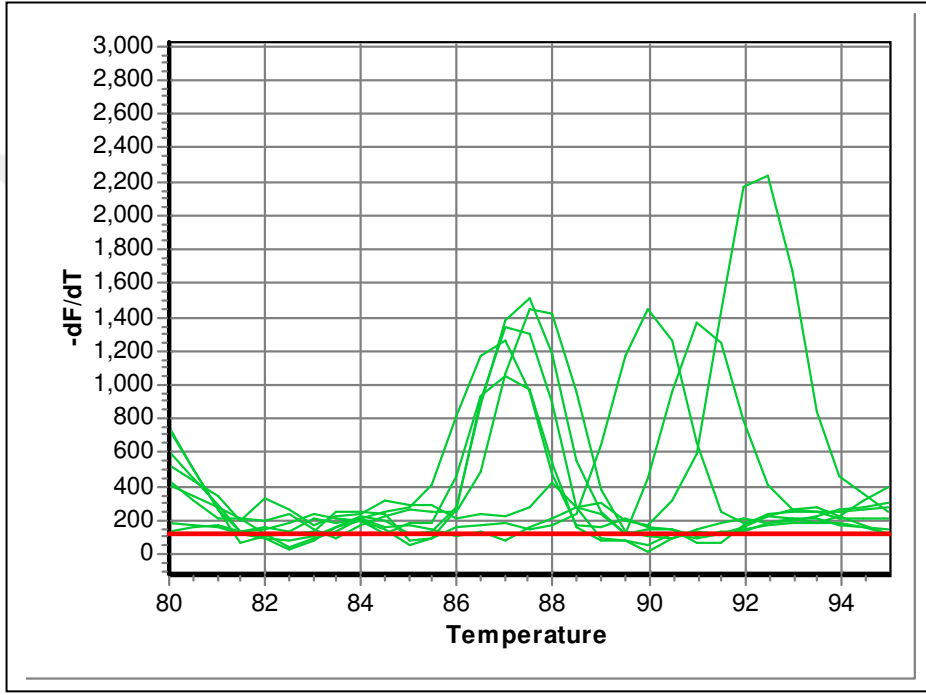
Amaç örnekler arasında ve değişik ısı, besi yeri ve tuz ortamlarında anlatımları en az değişen genleri bulmak olduğu için deneylerde elde edilen CP değerleri değişkenlik ve anlatım uyumlulukları açısından incelenmiştir.

Sonuçlar elde edilen CP değerleri üzerinden ücretsiz bir program olan BestKeeper ver. 1.0 (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) ve NCSS (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA) aracılığı ile değerlendirilmiştir [Pfaffl et al., 2004; Savli et al., 2003]. Gen anlatımları arasındaki uyum repeated pair-wise correlation ve regresyon analizlerine dayanarak değerlendirilmiştir.

7. BULGULAR

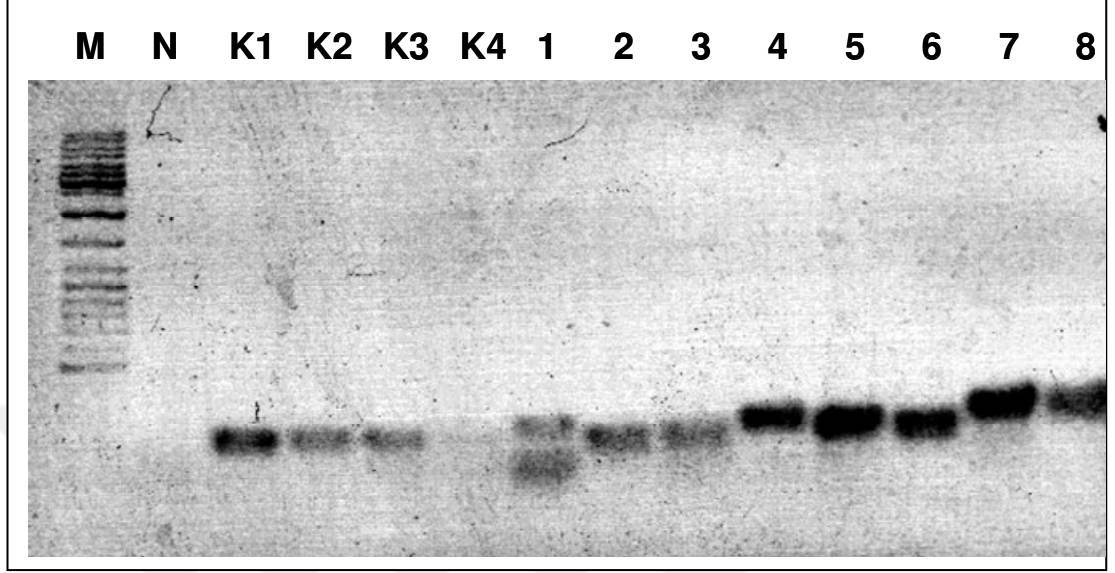
7.1. Gerçek zamanlı PZR deneyi

Quantica cihazının programı ile CP değerleri “First Derivate Maximum” ayarında değerlendirilmiştir. Ayrışma ısıları uygun olan örneklerin CP değerleri esas alınmıştır (Şekil 2).



Şekil 2 . Çalışılan gen ürünlerinin ayrışma ısıları

Ayrıca ürünler agarose jelde yürütülerek gözlemlenmiş ve böylece ayrışma ısılarının doğruluğu gösterilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Ürünlerin jel elektroforezde görüntülenmesi. M, Gene Ruler (Fermentas); M1 – M4, 10 kat seyreltik pozitif kontrol gen ürünleri; 1-8, HK gen ürünleri.

7.2. *P. aeruginosa* PA01 için elde edilen CP değerlerinin istikrar açısından değerlendirilmesi

P. aeruginosa PA01 için elde edilen CP değerleri tabloda gösterilmiştir. Ayrıştırma ısısı analizi uygun olan ve çoğalma olan örneklerin CP değerleri **Tablo 4** de gösterilmiştir.

Tablo 4. *P. aeruginosa* PA01 için CP değerleri

<i>Isı (°C)</i>	<i>Ortam *</i>	<i>rpoB</i>	<i>FabD</i>	<i>rpoS</i>	<i>rpoD</i>	<i>proC</i>	<i>rodA</i>	<i>oprB</i>	<i>x1</i>	<i>BestKeeper</i>
37	BH (16)	17.45	21.18	19.11	18.17	20.69	19.90	19.23	20.50	19.49
37	BH (16)	17.45	21.18	19.11	18.17	20.69	19.90	19.23	20.50	19.49
37	BH (9)	21.25	27.60	24.81	28.68	34.22	21.48	22.38	26.58	25.57
37	BH (9)	21.25	27.60	24.81	28.68	34.22	21.48	22.38	26.58	25.57
37	MH (9)	20.88	29.74	29.23	29.08	26.66	18.94	26.86	21.80	25.07
37	MH (9)	21.51	28.30	29.72	29.36	26.64	18.94	26.80	21.88	25.09
37	MH (9)	20.72	21.33	21.25	20.78	22.64	21.26	20.95	21.26	21.27
37	MH (9)	20.72	21.33	21.25	20.78	22.64	21.26	20.95	21.26	21.27
37	TSB (9)	21.70	19.46	24.04	21.84	23.83	22.06	21.53	23.19	22.16
37	TSB (9)	21.70	19.46	24.04	21.84	23.83	22.06	21.53	23.19	22.16
42	BH (9)	26.73	25.84	27.19	30.68	26.51	18.17	31.88	31.90	22.82
42	BH (9)	34.52	19.49	27.19	19.20	34.19	19.91	23.31	33.71	20.41
42	BH (16)	22.00	21.47	25.15	21.09	22.97	18.92	25.43	26.59	27.00
42	BH (16)	18.62	20.40	17.81	18.12	22.62	18.67	21.87	26.59	25.66
42	MH (9)	16.35	19.83	17.80	16.37	17.92	19.29	19.33	18.11	20.02
42	MH (9)	18.30	17.35	19.29	16.71	17.92	18.81	19.76	18.11	15.47
42	MH (16)	19.33	20.06	21.55	18.85	18.57	18.08	21.63	22.56	18.08
42	MH (16)	13.48	15.88	14.30	15.04	18.22	15.37	16.78	15.19	18.26
42	TSB (9)	22.33	23.51	21.80	21.77	25.86	21.67	22.56	22.00	21.90
42	TSB (9)	18.15	17.59	19.42	18.67	20.85	17.71	19.38	22.00	17.98
42	TSB (16)	21.06	20.24	23.84	20.35	21.55	19.97	24.07	24.74	22.65
42	TSB (16)	17.23	18.17	18.11	17.84	19.28	17.41	17.72	18.15	19.17
37	Tuz (0.05) †	15.27	17.29	16.7	15.53	18.6	16.76	16.79	16.71	16.68
37	Tuz (0.1)	14.88	16.71	14.95	14.34	16.36	16.46	16.34	15.3	15.64
37	Tuz (0.2)	15.22	16.66	16.69	14.69	16.98	16.86	16.9	16.83	16.33
37	Tuz (0.4)	14.87	15.96	14.88	13.87	15.76	15.14	14.9	14.32	14.95

* Ortam: Besi yeri (saat). BH, Brain heart broth; MH, Mueller-Hinton broth; TSB, Tryptic soy broth

† Tuz: NaCl (g/L)

İlgili CP düzeyleri için istatistik değerler Tablo 5 de gösterilmiştir.

Tablo 5. *P. aeruginosa* PA01 HK genlerinin CP değerleri için istatistik analiz sonuçları

Faktör*	<i>rpoB</i>	<i>fabD</i>	<i>rpoS</i>	<i>rpoD</i>	<i>proC</i>	<i>rodA</i>	<i>oprB</i>	<i>x1</i>	<i>BestKeeper</i>
S	26	26	26	26	26	26	26	26	26
geo Ortalama [CP]	19.33	20.57	20.87	19.86	22.16	18.99	20.86	21.41	20.48
ar Ortalama [CP]	19.73	20.91	21.31	20.40	22.70	19.10	21.17	21.91	20.78
min [CP]	13.48	15.88	14.30	13.87	15.76	15.14	14.90	14.32	14.95
Maks [CP]	34.52	29.74	29.72	30.68	34.22	22.06	31.88	33.71	27.00
std dev [± CP]	3.07	3.01	3.67	3.86	3.99	1.62	2.85	3.6	2.93

* Faktör: s: örnek sayısı; geo ortalama[CP]: geometrik ortalama; ar ortalama [CP]: aritmetik ortalama; min [CP] ve maks [CP]: en düşük ve en yüksek değerler; SD [± CP]: standart sapma

İstatistik değerler 8 HK gen arasında anlatım değişkenlikleri açısından (SD) değerlendirildiğinde *rodA* geninin en düşük değişkenliği gösteren gen (1.62) olduğuna işaret ediyor. Bu *rodA*'nın tüm örneklerde yaklaşık benzer salındığını ifade ediyor. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta bu genin CP değerinin 18.99 ile en düşük olduğunu yani miktarının fazla olduğudur. Miktar arttıkça PZR daha istikrarlı çalışmaktadır. Yani bir anlamda standart sapma gen miktarı ile de ilişkilidir. HK genlerin kendi aralarında anlatım açısından korelasyon (bağlaşım değeri) **Tablo 6** da Pearson correlation coefficient (*r*) ları ile irdelenmiştir.

Tablo 6. HK gen anlatım düzeylerinin Pearson correlation coefficient değerleri

Pearson correlation coefficient (r)							
	rpoB	fabD	rpoS	rpoD	proC	rodA	oprB
fabD	0.449	-	-	-	-	-	-
p-value	0.021	-	-	-	-	-	-
rpoS	0.787	0.798	-	-	-	-	-
p-value	0.001	0.001	-	-	-	-	-
rpoD	0.558	0.935	0.873	-	-	-	-
p-value	0.003	0.001	0.001	-	-	-	-
proC	0.769	0.742	0.771	0.781	-	-	-
p-value	0.001	0.000	0.001	0.001	-	-	-
rodA	0.531	0.510	0.571	0.521	0.622	-	-
p-value	0.005	0.008	0.002	0.006	0.001	-	-
oprB	0.716	0.764	0.888	0.845	0.622	0.419	-
p-value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.033	-
x1	0.890	0.530	0.748	0.634	0.794	0.520	0.781
p-value	0.001	0.005	0.001	0.001	0.001	0.007	0.001

En yüksek bağlaşım değerleri veren iki anlatım rpoD-FabD ve rpoB-x1 arasında gözlenmiştir.

Bestkeeper indeksi her örnek için ayrı olarak belirtilen denklem (Denklem 1) ile hesaplanmaktadır. Bir anlamda tüm genlerin geometrik ortalamalarıdır ve hayali en iyidir.

Denklem 1. Bestkeeper indeksi (z, gen sayısı)

$$\sqrt[3]{CP_1 \times CP_2 \times CP_3}$$

Bu indekse karşı gen salınım istikrarlılığı denendiğinde en uyumlu genlerin rpoS, rpoD ve proC olduğu görülmüştür (Tablo 7).

Tablo 7. Gen CP değerlerinin “repeated pair-wise correlation” metodu ile Bestkeeper indeksine karşı kıyaslanması

BestKeeper indeksine karşı	rpoB	fabD	rpoS	rpoD	proC	rodA	oprB	x1
Korelasyon koef. [r]	0.828	0.843	0.943	0.909	0.892	0.659	0.891	0.864

7.3. Klinik kökenlerin HK gen anlatımları

Klinik izolatların CP değerleri **Tablo 8** de gösterilmiştir.

Tablo 8. Klinik örneklerin CP değerleri

Örnekler*	rpoB	FabD	rpoS	rpoD	proC	rodA	oprB	x1	BestKeeper
1	15.30	17.85	16.64	15.41	18.47	16.94	17.63	16.58	16.82
	16.94	18.98	16.84	18.48	19.73	17.60	15.93	18.31	17.81
2	14.83	17.30	15.87	14.53	16.93	16.50	16.39	15.99	16.02
	14.88	20.98	16.29	17.88	23.02	15.21	15.06	16.20	17.23
3	14.85	17.07	16.33	14.79	16.76	16.83	16.63	15.84	16.12
	17.63	19.06	15.16	20.11	21.45	16.14	18.43	17.67	18.11
4	14.35	15.92	14.73	13.96	15.26	15.34	14.88	13.35	14.70

* 4 numaralı örneğin ikinci deneyi uygun çalışmadığı için eklenmedi.

Klinik izolatların CP değerleri HK genlerin istikrarlı anlatımı açısından incelenmiş ve sonuçların Bestkeeper indeksi ile uyumlulukları regresyon analizi ile **Tablo 9** da gösterilmiştir.

Tablo 9. Klinik örneklerin HK gen anlatımlarının Bestkeeper indeksi ile uyumluluğu (regresyon analizi)

	<i>rpoB</i>	<i>fabD</i>	<i>rpoS</i>	<i>rpoD</i>	<i>proC</i>	<i>rodA</i>	<i>oprB</i>	<i>x1</i>
Korelasyon koef. [r]	0.84	0.80	0.44	0.92	0.84	0.36	0.51	0.94
p-value	0.017	0.032	0.325	0.003	0.017	0.429	0.238	0.002
HK'lerin uyum gücü [x-kez]	1.85	2.18	1.22	3.58	3.96	1.20	1.48	2.41

Burada x-katı güç HK genlerin Bestkeeper ile uyumluluğu açısından gücünü göstermektedir. En güçlü genlerin proC ve rpoD olduğu görülmüştür.

8. TARTIŞMA

P. aeruginosa insanlarda ciddi hastalıklara sebep olan önemli bir bakteridir. Özellikle kistik fibrozlu hastalarda sık görülen enfeksiyon etkenlerindedir [Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2003; Saiman and Siegel, 2004]. Piyosiyenin salgısı, biofilm yapma yeteneği ve antibiyotik direnç mekanizmaları ciddi tedavi sorunları yaratmaktadır [Ciofu, 2003; Haussler, 2004; Lau et al., 2004]. *P. aeruginosa* enfeksiyonları açısından ikinci önemli alan hastane enfeksiyonlarıdır. Özellikle yoğun bakım servislerinde ülkemizde de en önemli enfeksiyon etkenlerindedir [Erbay et al., 2003; Esen and Leblebicioglu, 2004]. *P. aeruginosa* çeşitli içsel mekanizmalarını kullanarak [Chen et al., 1995; Masuda et al., 1999; Okamoto et al., 2001] ya da direnç genleri olarak [Vahaboglu et al., 1995; Vahaboglu et al., 1997; Danel et al., 1999; Docquier et al., 2001; Yong et al., 2003; Bahar et al., 2004] direnç geliştirebilmektedir.

Gerek hastalık patogeneğinde yer alan mekanizmaların gerek de içsel direnç mekanizmalarının araştırılmasında mRNA ekspresyonu çalışmaları önemli ipuçları verecektir. Bu amaçlarla yapılacak çalışmalarda değişik ortamlarda anlatımı değişmeyen HK genlerin iç kontrol olarak kullanılması son derece önemlidir [Thellin et al., 1999; Pfaffl et al., 2004]. mRNA anlatımlarını kıyaslayacağımız iki örneğin total mRNA miktarları ile aranan gene ait mRNA miktarlarının birlikte değerlendirilmesi gerekir. Total mRNA miktarı düşük olan bir örnekte doğal olarak oransallık kurulmazsa aranan genin mRNA miktarı gerçekte eşit olsa bile düşük çıkacaktır. Laboratuvar koşullarında özellikle bakterilerde mRNA dizisi polyA uzantısı taşımayabileceği için özgün olarak mRNA izole etme şansı yok gibidir [Majumdar and McFadden, 1984]. Yapılan şey total RNA izolasyonudur. Total RNA içerisinde ne kadarının mRNA olduğu önceden bilinemez. Yani sabit bir oranı yoktur. İşte total RNA içerisinde mRNA fraksiyonu hakkında bize bilgi veren ve sonuçlarımızı düzeltme şansı sağlayan deney koşullarında değişmeden salgılanan bir başka gen olacaktır.

Bu amaçla çeşitli HK genler önerilmektedir. HK genler anlatımı koşullardan az etkilendiği varsayılan hücre için olmazsa olmaz ürünler kodlayan genlerdir. Biz bu çalışmada *P. aeruginosa* için kritik fonksiyonları olan genleri seçtik. Seçim yaparken daha önce bir çalışmamızda kullandığımız pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*),

malonyl CoA:acyl carrier protein (ACP) transacylase (*fabD*), sigma factors RpoD (*rpoD*) ve RpoS (*rpoS*) genlerini [Savli et al., 2003] ve ayrıca dış zar proteini oprB, “rod shape-determining protein” yapımından sorumlu gen *rodA*, DNA-directed RNA polymerase geni *rpoB*, ve dış membran proteini yapısında fonksiyonu bilinmeyen gen *x1* çalışmaya alındı. Seçim yaparken iki kıstas önemsendi: 1) seçilen genin hücre için hayati derecede önemli olması ve 2) daha önce yapılmış çalışmalarda yeterli anlatımının olduğunun bilinmesi [Wei et al., 2001].

PA01 suşu bütün genom dizilimi çözümlenmiş standart bir kökendir [Stover et al., 2000]. Toplam 6.3 milyon bp ile dizi çözümlenmesi yapılmış en büyük bakteri genomudur. Birçok çalışmada, özellikle antibiyotik direnç mekanizmalarını hedefleyen çalışmalarda [Kohler et al., 1997] ve patojenisite araştırmalarında bu köken kullanılmaktadır [Chieda et al., 2005]. Bunun için PA01 suşu ile elde edilen bilgiler önemlidir.

Bu çalışmada denen 8 HK genin değişik ısı, besi yeri ve tuz ortamlarında anlatımları ölçülmüş ve tüm ortamlarda en az değişkenlik gösteren genler saptanmaya çalışılmıştır. Bu sekiz gen arasında *rpoS*, *rpoD* ve *proC* genleri en istikrarlı genler olarak bulunmuştur. Daha sonra farklı hastanelerden elde edilmiş 4 klinik örnekte denendiğinde *rpoD* ve *proC* en istikrarlı genler olarak bulunmuştur.

Savli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada porin-efflux sistemlerini oluşturan oprM, oprN ve oprD genlerinin bağıl değerlerini çalışmayı amaçlayan araştırmalarda kullanılmak üzere 5 HK gen istikrarlı anlatım açısından araştırılmıştır (Savli et al., 2003). Bu çalışmada *proC* ve *rpoD* en istikrarlı genler olarak bulunmuştur. Daha sonra bir başka çalışmada *proC* ve *rpoD* genleri iç kontrol olarak kullanılmış ve porin efflux genleri çalışılmıştır [Kolayli et al., 2004] ve bu çalışma da *proC* ve *rpoD* genlerinin eşzamanlı çalışılmasının uygun olacağını doğrulanmıştır.

9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gerek PA01 kökeni gerekse de klinik izolatlar çeşitli ısı ve besi yeri ortamlarında sekiz HK genin istikrarlı anlatımı açısından incelenmiştir. Bu çalışma bize proC ve rpoD genlerinin tek tek ya da daha iyisi birlikte bağıl nicelik araştırmayı hedefleyen çalışmalarda iç kontrol olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir.



10. KAYNAKLAR

10.1. Kitaplar

10.2.

BİLGEHAN H. (2000). *Klinik Mikrobiyoloji. Onuncu baskı.* İzmir: Fakülteler Kitabevi. 1-68

BİLGEHAN H. (2002). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Üçüncü baskı.* İzmir: Fakülteler Kitabevi. 465-474

BROOKS GF, BUTEL JS, MORSE SA. (1998). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology.* Yirmibirinci baskı. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange. 231-236

COLLIER L, BALOWS A, SUSSMAN M. (). Introduction to the aerobic *Pseudomonas*. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections (9th ed.) Vol 2, Systematic Bacteriology.* 1091-1108.

FORBES BA, SAHM DF, WEISSFELD AS. (2002). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* (11th ed.) St Louis: Mosby Company. 365-75.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL JE. (c2000). The Three Roles of RNA in Protein Synthesis. *Molecular Cell Biology* . New York: W.H. Freeman & Co.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA. (2002) *Pseudomonas* and Related Organisms. *Medical Microbiology*, Chapter 32, 297-304

WATSON JD, HOPKINS NH, ROBERTS JW, STEITZ JA, AND WEINER AM. (1965). *Molecular biology of the gene*, vol.1. p 704. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.

10.3. Periyodikler

ACHARYA A., PATERSON D. (2005). *Pseudomonas aeruginosa*. In Yu VL, Weber R, Raoult D, edss. *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. 2ed. *Advanced in Pharmacy*. Vol. 3(2):119-130.

BAHAR G, MAZZARIÒL A, KONCAN R, MERT A, FONTANA R, ROSSOLÌNÌ GM, CORNAGLÌA G. (2004). Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 54(1):282-283.

BLANC DS, NAHÌMANA I, PETIGNAT C. et al. (2004). Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med*. 30: 1964-1968.

BUSTIN SA. (2000). Absolute quantification of mRNA us

CHEN HY, YUAN M, LÌVERMORE DM. (1995). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 43(4):300-309.

CHÌEDA Y, IÌYAMA K, YASUNAGA-AOKÌ C, LEE JM, KUSAKABE T, SHÌMÌZU S. (2005). Pathogenicity of gacA mutant of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiol Lett* 244(1):181-186.

CÌOFU O. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. *APMIS Suppl*(116):1-47.

- COBURN J. DILLON ST et al., (1989a). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylates the intermediate filament protein vimentin. *Infect Immun.* 57:996-8.
- COBURN J.WYATT RT et al., (1989b). Several GTP-binding proteins, including P21 c-Hras, are preferred substrates of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Biol Chem.*264:9004-8.
- DANEL F, HALL LM, DUKE B, GUR D, LIVERMORE DM. (1999). OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43(6):1362-1366.
- DOCQUIER JD, LUZZARO F, AMICOSANTE G, TONILOLO A, ROSSOLINI GM. (2001). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 7(5):910-911.
- ERBAY H, YALCIN AN, SERIN S, TURGUT H, TOMATIR E, CETIN B, ZENCIR M. (2003). Nosocomial infections in intensive care unit in a Turkish university hospital: a 2-year survey. *Intensive Care Med* 29(9):1482-1488.
- ESEN S, LEBLEBICIOGLU H. (2004). Prevalence of nosocomial infections at intensive care units in Turkey: a multicentre 1-day point prevalence study. *Scand J Infect Dis* 36(2):144-148.
- ESSELMAN MT, LIU PV. (1961). Lecithinase production by gram negative bacteria. *J Bacteriol.* 81:939-45.
- HAUSSLER S. (2004). Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 6(6):546-551.

- KOHLER T, MİCHEA-HAMZEHPUR M, HENZE U, GOTOH N, CURTY LK, PECHERE JC. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 23(2):345-354.
- KOLAYLI F, GACAR G, KARADENİZLİ A, SANİC A, VAHABOGLU H. (2005). **PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *P. aeruginosa* and *Acinetobacter***. FEM' S Microbiol. Letters.
- KOLAYLI F, KARADENİZLİ A, SAVLI H, ERGEN K, HATIRNAZ O, BALIKCI E, BUDAK F, VAHABOGLU H. (2004). Effect of carbapenems on the transcriptional expression of the oprD, oprM and oprN genes in *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 53(Pt 9):915-920.
- LAU GW, HASSETT DJ, RAN H, KONG F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol Med 10(12):599-606.
- LIVERMORE DM. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?. Clinical Infectious Diseases. 34:634-40.
- MAJUMDAR PK, MCFADDEN BA. (1984). Polyadenylated mRNA from the photosynthetic procaryote *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol 157(3):795-801.
- MARIANI-KURKDJIAN P, BİNGEN E. (2003). [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. Arch Pediatr 10 Suppl 2:342s-346s.
- MASUDA N, GOTOH N, ISHII C, SAKAGAWA E, OHYA S, NISHINO T. (1999). Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux

system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*.
Antimicrob Agents Chemother 43(2):400-402.

OHMAN DE, BURNS RP, IGLEWSKI BH. (1980). Corneal infections in mice with
toxin A and elastase mutants of *Pseudomonas aeruginosa* . J Infect Dis.
142:547-55.

OKAMOTO K, GOTOH N, NISHINO T. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* reveals
high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms
and their interplay. Antimicrob Agents Chemother 45(7):1964-1971.

OSTE C. (1988). Polymerase chain reaction. BioTechniques. 6:162-167.

PFAFFL MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-
time RT-PCR. Nucleic Acids Research, Vol. 29(9):2005-2007.

PFAFFL MW, TÍCHOPAD A, PRGOMET C, NEUVÍANS TP. (2004)
Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target
genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise
correlations. Biotechnol Lett 26(6):509-515.

RIRIE KM., RASMUSSEN RP. and WITTWER CT. (1997). Product differentiation
by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.
Anal. Biochem. 245: 154-160.

SAÍMAN L, SÍEGEL J. (2004). Infection control in cystic fibrosis. Clin Microbiol
Rev 17(1):57-71.

SAVLÍ H, KARADENİZLÍ A, KOLAYLÍ F, GUNDES S, OZBEK U,
VAHABOGLU H. (2003). Expression stability of six housekeeping genes: A
proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas*

aeruginosa by real-time quantitative RT-PCR. J Med Microbiol 52(Pt 5):403-408.

SIERRA G. (1960). Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol. 26:189-92.

STOVER CK, PHAM XQ, ERWIN AL, MIZOGUCHI SD, WARRENER P, HICKEY MJ, BRINKMAN FS, HUFNAGLE WO, KOWALIK DJ, LAGROU M, GARBER RL, GOLTRY L, TOLENTINO E, WESTBROCK-WADMAN S, YUAN Y, BRODY LL, COULTER SN, FOLGER KR, KAS A, LARBIG K, LIM R, SMITH K, SPENCER D, WONG GK, WU Z, PAULSEN IT, REIZER J, SAIER MH, HANCOCK RE, LORY S, OLSON MV. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature 406(6799):959-964.

THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, DE BORMAN B, COUMANS B, HENNEN G, GRISAR T, IGOUT A, HEINEN E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 75(2-3):291-295.

VAHABOGLU H, HALL LM, MULAZIMOGLU L, DODANLI S, YILDIRIM I, LIVERMORE DM. (1995). Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. J Med Microbiol 43(4):294-299.

VAHABOGLU H, OZTURK R, AYGUN G, COSKUNKAN F, YAMAN A, KAYGUSUZ A, LEBLEBICIOGLU H, BALIK I, AYDIN K, OTKUN M. (1997). Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 41(10):2265-2269.

VASIL ML., KABAT D., IGLEWSKI BH. (1977). Structure-activity relationships of an exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*16:353-61.

VENEZIA SN, AMI RB and CARMELI Y. (2005). Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 18:306-313.

WEI Y, LEE JM, RICHMOND C, BLATTNER FR, RAFALSKI JA, LAROSSA RA. (2001). High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183(2):545-556.

WITTEWER CT., HERRMANN MG., MOSS AA. and RASMUSSEN RP. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* 22:130-138.

YONG D, SHIN JH, KIM S, LIM Y, YUM JH, LEE K, CHONG Y, BAUERNFEIND A. (2003). High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 47(5):1749-1751.

ZAMORANO PL, MAHESH VB & BRANN DW. (1996). Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. *Neuroendocrinology* 63:397-407

