



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Salmonella enterica serovar Typhimurium *marT* MUTANTLARININ BİYOFİLM
OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ AÇISINDAN DOĞAL TİP *S. Typhimurium* 14028 İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

Burcu YENER İLÇE

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Ankara

2013

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Salmonella enterica serovar Typhimurium *marT* MUTANTLARININ BİYOFİLM
OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ AÇISINDAN DOĞAL TİP *S. Typhimurium* 14028 İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

Burcu YENER İLÇE

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Ankara

2013

ETİK BEYAN

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

Burcu YENER İLÇE

İmzası

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK danışmanlığında, Burcu YENER İLÇE tarafından hazırlanan bu çalışma 13/12/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Aykut AYTAÇ İmza:

Üye : Prof. Dr. Sümer ARAS İmza:

Üye :Prof. Dr. Serdar Diker İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Adı Soyadı

Enstitü Müdürü

Salmonella enterica serovar Typhimurium *marT* MUTANTLARININ BİYOFİLM
OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ AÇISINDAN DOĞAL TİP *S. Typhimurium* 14028 İLE
KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

MarT regülatör proteininin *in-vitro* kültür koşullarında *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada; MarT protein üretiminin en yüksek düzeyde teşvik edildiği ardışık iki arabinoz konsantrasyonunda (% 0.02 ve % 0.01) biyofilm üretiminin, doğal suşa oranla istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde düştüğü saptandı. Gerçek zamanlı PZR denemeleri sonucu, *marT* geninin *S. Typhimurium*'da; *marT*, *slsA*, *misL*, *rmbA*, *fidL* ve *wzzB* genlerinin pozitif; *fliA*, *fliC*, *dps*, *fimA*, *cheA* ve *cheM* genlerinin ise negatif regülatörü olduğu belirlendi. *marT* regülasyonu yönünden araştırılan genler bakımından mutant suşların *in-vitro* koşullarda biyofilm üretme kapasiteleri doğal suş ile kıyaslandığında, istatistiki açıdan anlamlı düşmeler gösteren mutantlar; *fliA* (% 59), *fliC* (% 40), *fimA* (% 46), *fidL* (% 25) ve *misL* (% 25) olarak belirlendi. Bu çalışmada kullanılan tüm suşların biyofilm yapıları agar plaklarda **rdar** morfolipte saptanmış olmasına rağmen, steromikroskop altında yapılan incelemelerde mutant suşların oluşturdukları **rdar** morfolipteki biyofilmlerin, hem birbirinden ve hem de doğal suştan farklı fenotipik özellikler gösterdiği belirlendi. Pelikül oluşumları değerlendirildiğinde; incelenen genlerden *fimA*, *slsA*, *fliA*, *dps*, *cheA* ve *wzzB* genlerinin *S. Typhimurium*'da pelikül oluşumu üzerinde doğrudan etkili olduğu saptandı. Son olarak; *marT* ifadesi indüklenen mutantın cam, çelik ve polistiren üzerinde biyofilm oluşturma özellikleri incelendi ve tüm yüzeylerde biyofilm üretme yeteneğinin düştüğü belirlendi.

2013, Sayfa Sayısı (2013, 119 sayfa)

Anahtar Kelimeler: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *marT*, biyofilm

THE COMPARISON OF *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *marT*
MUTANTS AND WILD TYPE *S. Typhimurium* 14028 ACCORDING TO THEIR
BIOFILM PRODUCTION ABILITIES

ABSTRACT

This study investigating the effect of MarT regulator protein on the production of *S. Typhimurium* biofilm in *in-vitro* culture conditions, at the two consecutive concentration of arabinose (% 0.02 ve % 0.01) in which the production of MarT protein is promoting in the highest level, the biofilm formation showed a statistically significant decrease compared with the wild type strain. According to results of real time PCR experiments, gene of *marT* was identified as the positive regulator of the *marT*, *slsA*, *misL*, *rmbA*, *fidL* and *wzzB* genes; as the negative regulator of the *fliA*, *fliC*, *dps*, *fimA*, *cheA* and *cheM* genes. When compared the biofilm formation capacity to the wild type in *in-vitro* conditions, the mutants, contain a mutation in the genes investigated in terms of *marT* regulation, showed statistically significant reductions were identified as *fliA* (% 59), *fliC* (% 40), *fimA* (% 46), *fidL* (% 25) and *misL* (% 25) mutants. Although the biofilm structures of all strains used in this study were detected as **rdar** morfotype in agar plates, inspections carried out under stereomicroscope showed that the biofilms in **rdar** morphotype formed by mutant strains have different phenotypic features from each other and as well as from wild type strain. Among the genes examined; *fimA*, *slsA*, *fliA*, *dps*, *cheA* and *wzzB* genes were found to have a direct effect on the pellicle formation of *S. Typhimurium*. Finally; the biofilm formation features of the mutant strain, in which *marT* expression is induced, on glass, stainless steel and polystyrene were also examined and determined that the ability to produce biofilm decreased on all surfaces.

2013, Page Number (2013, 119 pages)

Key Words: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *marT*, biofilm

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince büyük desteğini gördüğüm ve arkadaşlığını her zaman hissettiğim danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e, bu tez çalışmasına başlamamda, tezimin planlanmasında ve oluşturulmasında değerli katkıları ve yönlendirmeleri için, doktora eğitimim boyunca beni her zaman yüreklendiren değerli hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e,

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

Tezimin istatistiksel analizlerinde bana bıkmadan usanmadan değerli zamanından ayırarak yardımcı olan ve bilgi birikimini yapmış olduğu yorumlara katarak tezime büyük katkı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na;

Çalışmalarım süresince benden yardımlarını esirgemeyen başta çalışmamın istatistiksel analizlerinde yardımcı olan Araş. Gör. Başar KARACA ve tüm Prokaryot Genetiği Laboratuvarındaki arkadaşlarıma;

Tez çalışmalarım süresince enerjisiyle, yardımları ve kritikleri ile bana destek olan, sadece çalışma arkadaşım olarak değil hayatım boyunca yanımda olacağına inandığım ve bunu gönülden isediğim, kıdemlim Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ'a;

Tanımdan büyük mutluluk duyduğum, çalışmalarımın her aşamasında, her sıkıştığım da zaman ayıran grup arkadaşlarım Nima BADALI ve Maryam DIANI'ye;

Laboratuvar ortamını keyifli kılan, eğlenceli çalışma ortamı yaratan ve benimle aynı yolda yürüyen merkez laboratuvardaki tüm arkadaşlarıma;

Laboratuvarda çalıştığım süre boyunca her türlü desteği ve yardımı alabildiğim tüm değerli Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma;

Bu süreçte beni en çok anlayanlardan biri olan, aynı süreçleri aynı stresle beraber yaşadığım, sabah kahvaltılarımızı özleyeceğim değerli insan Burçak KOCUKLU'ya;

Berber çalışmaktan keyif aldığım, aynı sıkıntıları yaşayıp kader ortaklığı yaptığım, beraber çok gülüp az ağladığım, bundan sonra da varlıklarıyla hep yanımda olmalarını dilediğim çok değerli arkadaşlarım Didem MOLLA, Özge ÖZGENÇ ve Cevahir ALTINKAYNAK'a;

Işık olmayan karanlık bir yolda yürürken, bana umut veren, karanlığımı aydınlatan, o yolun sonundaki ışığı gören ve bana o ışığı hep gösteren, karanlık da olsa her yolun bir sonu olduğunu söyleyen, benimle birlikte sebat eden can dostum Ayşe Çiğdem EKİNCİ'ye;

Doktora tez çalışmalarımın son iki senesinde hayatıma giren, her şeye rağmen bu süreci tamamlamak için gösterdiğim inadı anlamakta zorluk çekse de köstek olmayarak desteğini hissettiren, hayatımın en zor döneminde en tatlı hatıraları birlikte biriktirdiğim sevgilim, eşim Haktan İLÇE'ye,

Varlığıyla içimi ısıtan, bir dönem ev arkadaşım olan, yakışıklım kardeşim Volkan YENER'e;

Son olarak; tüm huysuzluklarıma ve belirsizliklerime katlanarak büyük bir sabırla öğrencilik hayatımı noktalayacağım günü bekleyen, eğitim uğruna yaptığım her şeyi sorgulamaksızın maddi ve manevi destekleyerek benim yanımda olan, en büyük şanslarım ve canlarım olarak gördüğüm biricik annem Serpil YENER ve canım babam Altay YENER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	14
2. GEREKÇE VE AMAÇ.....	16
3. KURAMSAL TEMELLER	18
3.1. <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri	18
3.2. <i>Salmonella</i> Enfeksiyonu	19
3.3. <i>Salmonella</i> 'nın Bağırsak Epiteline Tutunmasında Etkili Moleküler Elemanlar	21
3.3.1. Adezinler	21
3.3.2. Diğer yapılar	22
3.4. <i>Salmonella</i> Patojenite Adaları.....	23
3.4.1. <i>Salmonella</i> patojenite adası-3 (SPA-3).....	24
3.5. MisL Proteini ve <i>misL</i> Geninin Pozitif Regülatörü <i>marT</i> 'nin Genel Karakteristikleri	24
3.6. Biyofilm Oluşum Aşamaları	27
3.6.1. Primer tutunma (Geri dönüşümlü tutunma)	27
3.6.2. Sekonder tutunma (Geri dönüşümsüz tutunma).....	28
3.6.3. Mikrokoloni oluşumu ve olgunlaşma	28
3.6.4. Dağılıma	29
3.7. Biyofilm Matriksinin Kompozisyonu.....	29
3.8. <i>Salmonella</i> Biyofilmlerinde Rol Alan Regülatörler ve Sinyal İletimi	31
3.8.1. CsgD	31
3.8.2. BarA/SirA ve Csr sistemi	32
3.8.3. Flagellar regülatörler	33
3.9. Biyofilmi Oluşturan Kolonilerin Morfotip Karakterleri	33
3.10. <i>S. Typhimurium</i> 'da Regülasyon Karakteristikleri ve Biyofilm Üretimi İle İlişkileri Araştırılan Genler	35
4. MATERYAL VE YÖNTEM	36
4.1. Materyal.....	36
4.1.1. Bakteri suşları ve plazmidler	36
4.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler	37
4.2. Yöntem	40
4.2.1. <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunda arabinoz varlığında MarT üretiminin teşviki	40
4.2.2. Polistiren üzerinde biyofilm oluşumunun belirlenmesi	40
4.2.2.1. İnkübasyon sıcaklığı ve pH'nın biyofilm üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	41
4.2.2.2. <i>marT</i> geninin biyofilm üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	41
4.2.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)	42
4.2.3.1. RNA izolasyonu	42
4.2.3.2. cDNA sentezi	43
4.2.3.3. Primer dizaynı	44
4.2.3.4. Genlerin ifade düzeylerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR(qRT-PZR) ile belirlenmesi	46
4.2.3.4.1 Erime eğrisi analizi	47

4.2.3.4.2	Amplifikasyon verimliliğinin belirlenmesi.....	49
4.2.3.4.3	Normalizasyon.....	50
4.2.3.4.4	Normalize edilen verilerinin istatistiksel analizi	51
4.2.4.	Gen mutasyonlarının oluşturulması.....	51
4.2.4.1.	Homoloji bölgelerini içeren fonksiyonel kanamisin kasetinin eldesi.....	52
4.2.4.2.	Doğal tip <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşuna pRed/ET ifade plazmidinin transformasyonu	42
4.2.4.3.	Kanamisin gen kaseti insersiyonu ile gen spesifik mutasyonların oluşturulması	43
4.2.4.4.	Transformantlarda kanamisin kasetinin varlığının PZR ile doğrulanması	44
4.2.4.5.	Agaroz jel elektroforezi	45
4.2.5.	Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm morfoloilerinin belirlenmesi	46
4.2.6.	Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu	47
4.2.7.	Kalkoflor bağlanma uygulaması	48
4.2.8.	Doğal ve <i>marT</i> ifadesi teşvik edilen mutant suşların farklı yüzeylerde biyofilm üretme potansiyellerinin karşılaştırması.....	48
4.2.9.	İstatistiksel analizler.....	50
5.	ARAŞTIRMA BULGULARI	51
5.1.	<i>S. Typhimurium</i> 'da <i>marT</i> Geninin Biyofilm Üretimi Üzerine Etkisi	51
5.2.	<i>S. Typhimurium</i> 'da <i>marT</i> Geninin Regülasyon Karakteristiklerinin Belirlenmesi.....	56
5.3.	<i>marT</i> geni Regülasyonu Bakımından Araştırılan Genlerin Biyofilm Üretimindeki Rollerini.....	68
5.4.	Araştırmada Kullanılan Genlerin Biyofilm Morfoloisi ve Yapısal Özellikleri Üzerine Etkisi	72
5.5.	<i>marT</i> Geni İndüksiyonunun Farklı Abiyotik Yüzeylerde Biyofilm Üretme Yeteneği Üzerine Etkileri	76
6.	TARTIŞMA VE SONUÇ	78
	KAYNAKLAR	88
	EKLER	98
	EK 1: İzole edilen RNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri.....	98
	EK 2: Doğal tip14028 suşunun farklı konsantrasyonlarda arabinoz teşviki sonucunda <i>marT</i> ifadesine bağlı gen değişimlerinin Ct değerleri	99
	EK 3: MZ1627 suşunun farklı konsantrasyonlarda arabinoz teşviki sonucunda <i>marT</i> ifadesine bağlı gen değişimlerinin Ct değerleri.....	100
	EK 4: Doğal suş ve mutantların paslanmaz çelik kupon yüzeyinde biyofilm üretimi değerleri	101
	EK 5: Doğal suş ve mutantların cam yüzeyinde biyofilm üretimi değerleri	101
	EK 6: Doğal suş ve mutantların polistiren yüzeyinde biyofilm üretimi değerleri	101
	ÖZGEÇMİŞ	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kümelenmiş Gram-negatif <i>S. Typhimurium</i> bakterisinin renklendirilmiş tarama elektron mikroskop görüntüsü	19
Şekil 3.2. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1970-2011 yılları arasında hastalık kontrol ve önleme merkezlerine (CDC) bildirilen laboratuvar onaylı insan <i>Salmonella</i> enfeksiyonu insidansı.	20
Şekil 3.3. <i>S. Typhimurium</i> 'un neden olduğu gastroenteritte doku hasarı.	21
Şekil 3.4. <i>Salmonella</i> patojenite adası III'ün genetik organizasyonu.	24
Şekil 3.5. MisL ototransporter proteininin aktif bölgelerinin şematik görünümü	25
Şekil 3.6. Biyofilm oluşum aşamaları	27
Şekil 3.7. Selülöz biyosentezi, CsgD regülasyonu	32
Şekil 4.1. pBAD/gIII A, B, C vektörlerinin genetik haritası.....	37
Şekil 4.2. <i>fidL</i> geni için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi	48
Şekil 4.3. <i>rmbA</i> geni için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi.....	49
Şekil 4.4. pRED/ET plazmid vektörünün genetik haritası.....	43
Şekil 4.5. 1 kb'lık (a) ve 100 bp'lik (b) DNA standartlarının % 1 agaroz jel göç planı	46
Şekil 4.6. a. Rdar morfotipine özgü sıvı-hava arafazında gözlenen pelikül yapısı, b. Aynı pelikülün karıştırıldıktan sonra dağılmadan kalan yapısı, c. Bdar morfotipine özgü sıvı-hava arafazında gözlemlenen pelikül yapısı, d. Aynı pelikülün karıştırıldıktan sonra dağılan yapısı.....	47
Şekil 5.1. <i>S. Typhimurium</i> doğal suşu (14028) ve <i>marT</i> geni indüklenmiş mutantında (MZ1627) biyofilm üretiminin inkübasyon süresine bağlı değişimi	52
Şekil 5.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının bakteriyel üreme ve biyofilm üretimi üzerine etkisi	53
Şekil 5.3. Ortam pH'sının bakteriyel üreme ve biyofilm üretimi üzerine etkisi.	54
Şekil 5.4. Farklı arabinoz konsantrasyonlarına bağlı olarak gerçekleştirilen <i>marT</i> geni ifadesinin biyofilm üretimi üzerine etkisi.....	56
Şekil 5.5. Saflaştırılan RNA'ların % 0,8'lik agaroz jel görüntüsü	57
Şekil 5.6. cDNAların %1'lik agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 5.7. Optimize koşullarda her bir primer çifti için gerçekleştirilen PZR denemelerine ait jel görüntüsü.....	58

Şekil 5.8. <i>gapA</i> geni için $10 - 10^{-6}$ dilüsyonlarla oluşturulan (a) Amplifikasyon eğrileri, (b) standart eğrisi, (c) erime eğrileri, (d) erime eğrisi analizine göre oluşan erime pikleri görülmektedir.	61
Şekil 5.9. <i>marT</i> geni ifadesine bağlı olarak gerçekleşen gen ifade değişimleri	64
Şekil 5.10. <i>marT</i> 'nin diğer genlerle olan korelasyonunu gösteren ifade ağı grafiği.	66
Şekil 5.11. Tüm hedef genlerin birbirleriyle olan korelasyonunu gösteren ifade ağı grafiği	67
Şekil 5.12. <i>marT</i> ifadesi teşvik edilmiş MZ1627 örneklerindeki hedef gen ifadelerinin hiyerarşik kümeleme analizi ve ısı haritası ile simgelemesi.	68
Şekil 5.13. Gen spesifik homoloji bölgeleri içeren kanamisin kasetleri.	69
Şekil 5.14. Hedef genlerde kanamisin kaseti (193 bç) varlığının tespiti.	70
Şekil 5.15. Gen mutasyonlarının biyofilm üretimi üzerine etkisi.	71
Şekil 5.16. Doğal tip 14028 suşuna kıyasla mutant suşların biyofilm üretimindeki % azalmalar.	72
Şekil 5.17. Mutant suşlarda “rdar” morfotipindeki fenotipik değişimler	73
Şekil 5.18. Kalkoflor içeren LB besiyerinde pelikül oluşumunun tanımlanması.	75
Şekil 5.19. Biyofilm yapılarında selülöz içeriği bakımından farklılığın tespiti	75
Şekil 5.20. Doğal suş ve mutantların polistiren yüzeyde biyofilm üretim özellikleri.	76
Şekil 5.21. Doğal suş ve mutantların cam yüzeyinde biyofilm üretim özellikleri.	77
Şekil 5.22. Doğal suş ve mutantların paslanmaz çelik kupon yüzeyinde biyofilm üretim özellikleri	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez kapsamında çalışılan genler ve görevleri	35
Çizelge 4.1. <i>S. Typhimurium marT</i> mutantlarının özellikleri	36
Çizelge 4.2. Luria Bertani (LB) besiyeri bileşimi	37
Çizelge 4.3. NaCl içermeyen Luria Bertani (LB) besiyeri bileşimi	38
Çizelge 4.4. Kongo kırmızısı içeren (40 µg/mL) LB agar (NaCl'siz) besiyeri bileşimi.....	38
Çizelge 4.5. Kalkoflor içeren (50 µg/mL) LB agar (NaCl'siz) besiyeri bileşimi.....	39
Çizelge 4.6. Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	39
Çizelge 4.7. %33'lük Glasiyel asetik asit çözeltisi	39
Çizelge 4.8. Tris-asetat tamponu (TAE Tamponu).....	39
Çizelge 4.9. Jel yükleme tampon çözeltisi	40
Çizelge 4.10. Ters transkripsiyon protokolü	43
Çizelge 4.11. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü	43
Çizelge 4.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR denemelerinde kullanılan primerler.....	44
Çizelge 4.13. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı.....	46
Çizelge 4.14. LightCycler cihazında kullanılan q-RT-PZR programı	47
Çizelge 4.15. Kanamisin kaseti ve ilgili genlere homolog bölgeler içeren primer dizileri.	40
Çizelge 4.16. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık döngüsü	41
Çizelge 4.17. Polimeraz zincir reaksiyonu (50 µl) içeriği	41
Çizelge 4.18. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı (50 µl) içeriği	45
Çizelge 5.1. Gen spesifik primer çiftlerinin amplifikasyon verimlilikleri	61
Çizelge 5.2. Normalize gen ifade verileri	62
Çizelge 5.3. Normalize gen ifade verilerinin log2 tabanındaki değerleri	63
Çizelge 5.4. <i>marT</i> geni ifadesine bağlı olarak değişen gen ifade profillerinin birbiri ile korelasyonu.	65
Çizelge 5.5. Doğal suş ve mutantların sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma karakteristikleri	74

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
(x)	X konsantrasyonu
amp	Amplitüd
Amp	Ampisilin
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
Ct	Eşik döngüsü (threshold cycle)
ddH ₂ O	Çift distile (double distilled) su
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	DNA parçalayıcı enzim
dNTP	Deoksiribonükleotit
E	Verimlilik (efficiency)
EPS	Ekzopolisakkarit
-f	İleri primer
-r	Geri primer
g	Gram
H ₂ O	Su
HCl	Hidrojen klorür
ID	Kimlik (identitiy)
Kan	Kanamisin
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
kHz	Kilohertz
kob	Koloni oluşturan birim
L/l	Litre
LB	Luria Bertani besiyeri (Luria's Broth)
LPS	Lipopolisakkarit
log	On tabanlı logaritma
M	Molarite

MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Normal
Na ₂ HPO ₄	Sodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre
°C	Santigrad derece
OD	Optik yoğunluk (density)
PBS	Fosfat tuz tamponu (buffered saline)
PCR / PZR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu (reaction)
pH	Hidrojenin gücü-asitlik (Power of hydrogen)
pmol	Pikomol
qRT-PZR	Kantitatif gerçek zamanlı PZR (Quantitative real time PCR)
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	RNA parçalayıcı enzim
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (rotation per minute)
SPA	<i>Salmonella</i> patojenite adası
sn.	Saniye
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
T _m	Erime ısı (melting temperature)
U/u	Ünite
UV	Ultraviyole
V	Volt
Δ	Mutasyon
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Salmonella enterica türüne ait patojenik suşlar, insanın da dahil olduğu birçok memeli türünde; enterik ateş, enterokolit/diyare, bakteremi ve asemptomik taşıyıcılık ile tanımlanan dört temel semptomun birine yol açmaktadırlar. Hastalığın (salmonelloz) seyri, konak duyarlılığı ve *S. enterica* türü serovaryetisine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. İnsanda *S. Typhi*, *S. Paratyphi* ve *S. Sendai* enterik ateşe, *S. Choleradis* ve Dublin bakterimiye, diğer birçok serovaryete ise enterokolit/diyare'ye neden olmaktadır (1). *S. Typhi* enfeksiyonu insanlar ile sınırlı iken, diğer serovaryeteler ya yüksek düzeyde konak adaptasyonu gösterirler ya da farklı konakçılarda farklı sendromlara yol açarlar (2). Gıda kökenli enfeksiyon etkenlerinin en önemlilerinden biri olan *Salmonella*'ya bağlı olarak tüm dünyada her yıl 16 milyon enterik ateş, 1.3 milyon gastroenterit ve bunlardan kaynaklanan 3 milyon ölüm vakası gerçekleşmektedir (3).

Salmonella enfeksiyonlarından korunmayı güçleştiren temel etken, neredeyse tüm serovaryetelerin özellikle stres koşullarında oluşturduğu biyofilm yapılarıdır. Bu bakterilerin biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yetenekleri, oluşturdukları enfeksiyonların çapraz kontaminasyonlarla hızlı bir şekilde yayılmasına yol açmaktadır (4–6). Bakteriyel biyo-filmler; bir nesneye, ara yüzeye ya da birbirine yapışık halde duran bakteri toplulukları olarak tanımlanmaktadır (7). Biyofilm yapıları içerisinde bulunan bakteriler, kendi ürettikleri ve dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan bir matriks içinde gömülü olarak bulunmakta ve üzerlerinde çeşitli bileşiklerin birikmesine neden olmaktadır (8). Tıp alanında bakteriyel biyo-filmlerin yarattığı en önemli sorun, söz konusu yapıların yüksek antibiyotik dirençlilik içermesi nedeniyle, enfeksiyonların süreklilik kazanmasıdır. Diğer yandan biyofilm yapıları, sterilizasyon/dezenfeksiyon ajanlarına ve işlemlerine karşı yüksek düzeyde dirençlilik göstererek, kontaminasyonların engellenmesini neredeyse olanaksız hale getirmektedir. Bu temel nedenlerle günümüzde *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisi ve *Salmonella* kontaminasyonlarının engellenmesi biyofilm yapılarının eradikasyonu ile bağlantılı hale gelmiştir (9–12).

Salmonella'da, kendi transportunu gerçekleştiren (ototransporter) ve konakçı hücre işgalinde rol oynayan MisL adezin proteininin pozitif transkripsiyonel regülatörü olan *marT* geninin (MarT proteinini kodlamaktadır) biyofilm üretimi üzerindeki etkinliğine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Oysa söz konusu regülatörün, *S. Typhimurium*'da

patojenite ve biyofilm üretimi ile ilgili birçok genin regülasyonuna katıldığına dair mikrodizin analizlerini esas alan ön bulgular, çalışma grubumuz tarafından tespit edilmiştir (13). Bu ön bulgular ışığında tez çalışmasında, *marT* geninin *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerine etkisi ve regülasyon karakterlerinin detaylı analizlerinin yapılması suretiyle, söz konusu bakteride global metabolik düzenlemelerin irdelenmesi amaçlanmıştır. Tez kapsamında ayrıca *marT* tarafından regüle edilen genlerin biyofilm üretimi üzerine etkileri de tanımlanmıştır.

2. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu araştırmada temel amaç, *S. Typhimurium*'da bir ototransporter protein olan MisL'nin pozitif regülatörü *marT*'nin biyofilm oluşumu üzerinde etkisinin belirlenmesidir. MisL ototransporter proteini, *S. Typhimurium*'da *in vivo* koşullarda üretilen ve konak hücrelere tutunmada rol alan bir proteindir (14,15). *S. Typhimurium* konak sisteme dahil olduğunda, epitel hücrelere tutunmayı yönlendiren söz konusu proteinin üretimi *marT* geninin aktivasyonu yolu ile yapılmaktadır (16). *marT* bu anlamda konak hücrelerin işgalinde ilk aşama olan tutunmanın regülasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu veriler aynı zamanda, söz konusu genin *Salmonella*'da *in-vivo/in-vitro* fazlar arasında gerçekleşen metabolik regülasyonunun bir parçası olduğuna kanıt teşkil etmektedir. *marT* geninin bu regülasyonda oynadığı rolün tanısı, yukarıda açıklanan gerekçe doğrultusunda, tezin temel hedefini oluşurmaktadır.

Salmonella ve birçok diğer patojen bakterilerde biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunma ve kalıcılıkta rol oynayan biyofilm oluşurma özelliği, oldukça karmaşık bir fizyolojik süreçtir. Biyofilm oluşturan bakteriler, antibakteriyel ajanlara ve dezenfeksiyonlara karşı çok yüksek düzeyde direnç kazandıklarından ciddi endüstriyel ve tıbbi sorunlara yol açmaktadırlar (9–12). Bu nedenle söz konusu yapıların oluşumu ve regülasyonunun analizi, yoğun bilimsel çalışmaların odağı haline gelmiştir. *marT* geni aktive edilmiş ve susturulmuş mutantlarla yürütölen karşılaştırmalı mikrodizin analizleri; hücresel süreçlerde çok önemli görevler üstlenen; *dps*, *yliH*, *cheA*, *cheM*, *wzzB*, *fliA* (sigma28) ve *fliC* gibi genlerin ifadelerinde değişiklik olduğunu göstermiştir (13). *marT* geninin *Salmonella*'da global bir regülatör olabileceğine işaret eden bu ön bulgular, söz konusu genin biyofilm üretimindeki etkinliğinin belirlenmesini ve regülasyon karakteristiklerinin doğrulanmasını zorunlu hale getirmiştir.

Salmonella serovaryetelerinde biyofilm üretme özelliğinin global regülatörlerle sıkı bir ilişkide olduğu gerçeğinden hareketle, tez çalışmasının ilk aşamasında global bir regülatör olabileceği yönünde ön görümüz olan *marT* geninin biyofilm üretimi üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamayı takiben *marT* geninin regülasyon karakteristikleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları ile tanımlanmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise, *marT* tarafından regüle edilen genlerin biyofilm üretimi ve biyofilmin yapısal özellikleri üzerine etkileri belirlenerek, biyofilm üretiminin moleküler

tanısına bilimsel katkı sağlanması ve ayrıca bu bilgiler ışığında biyofilm eradikasyonu uygulamaları için yeni stratejilerin temelini atılması hedeflenmiştir.

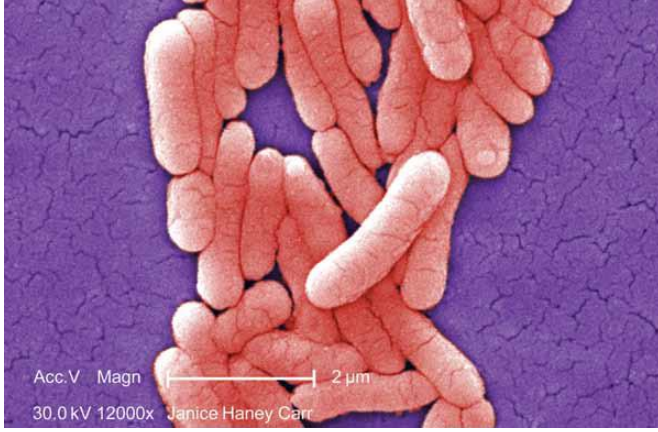
3. KURAMSAL TEMELLER

3.1. *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella cinsi bakteriler; Gram-negatif, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob özellikte olup, Enterobacteriaceae familyasına dahildir. Çubuk şeklindeki hücreler yaklaşık 0.5-1.0 (en) x 1-5 (boy) µm boyutlarındadır (Şekil 3.1.). *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hariç, *Salmonella* üyelerinin hepsi peritrik flagella içerirler ve hareketlidirler. *Salmonella*'nın üreme sıcaklığı 2-47 °C arasındadır. Çoğalmaları için gerekli optimum sıcaklık ise 37 °C'dir. *Salmonella* üyeleri düşük pH, düşük su aktivitesi ya da yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda sıcaklığa dirençlidir. Gıdaların dondurularak depolanmasında, özellikle donma sıcaklığı civarında canlılık düşer. pH 4.5-9.0 arasında çoğalabilirler ancak üremeleri için gerekli optimum pH değeri 6.5-7.5 aralığındadır (17).

Son çalışmalara göre 2500 civarında olduğu bildirilen *Salmonella* serotiplerinin hepsi, özellikle moleküler genetik ve ileri biyokimyasal teknikler kullanılarak elde edilen veriler ışığında *S. enterica* ve *S. bongori* (22 alt tür) olarak adlandırılan iki tür altında toplanmıştır. *S. enterica* daha sonra; *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *houtaenae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* ve *S. enterica* subsp. *arizonae* olarak adlandırılan altı alt türe ayrılmıştır. Serotipler (serovaryete) ile türlerin karıştırılmasını engellemek ve adlandırmayı sadeleştirmek için, serotip esas alındığında alt tür adının gözardı edilmesi (*S. enterica* subsp. I serotype Typhimurium yerine, *S. enterica* serotype Typhimurium gibi) ve kısa form (*S. Typhimurium* gibi) kullanımı önerilmiştir (18).

S. Typhimurium kromozomu, yaklaşık 4×10^6 baz çifti uzunlukta olan tek bir çevrimsel DNA molekülüdür. Çoğu *S. enterica* üyesi bir virülans plazmid ve lizojenik faj içermektedir. *S. Typhimurium* ve Typhi'nin genom dizi analizleri tamamlanmıştır (19,20).



Şekil 3.1. Kümelenmiş Gram-negatif *S. Typhimurium* bakterisinin renklendirilmiş tarama elektron mikroskop görüntüsü (21).

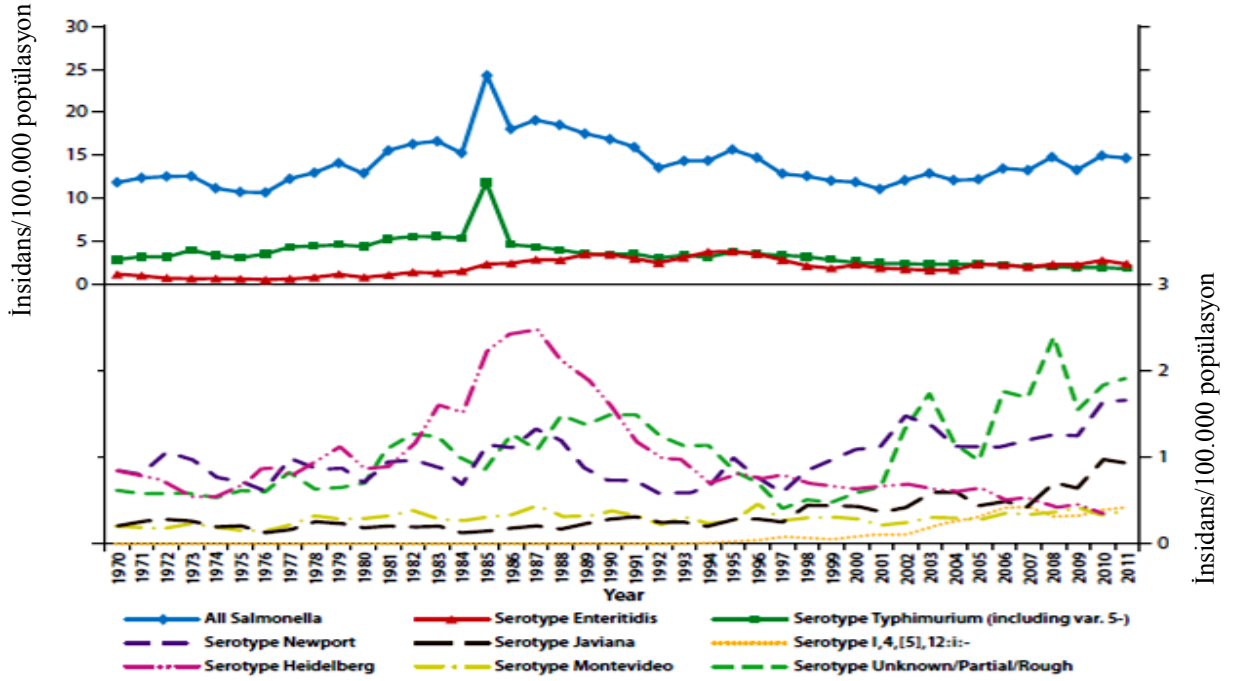
3.2. *Salmonella* Enfeksiyonu

Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları tüm dünyada büyük bir dikkatle takip edilmekte ve değerlendirilmektedir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri (Şekil 3.2), İngiltere, Belçika, Fransa ve Kanada'da yapılan çalışmalar, gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları ve gastroenterit vakalarının son yıllarda artış gösterdiğini ortaya koymaktadır (22). Ülkemizde ise gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve zehirlenmeler ile ilgili veriler sağlıklı bir şekilde toplanıp istatistiksel olarak değerlendirilmediği için bu konuda net bilgi birikimi sağlanamamaktadır.

Salmonella türleri esas olarak fekal-oral yol ile bulaşır ve insanlarda gastrointestinal enfeksiyonların veya salmonellozun ana nedenidir. Dünya çapında, milyonlarca insan enfeksiyonları ve binlerce ölüm yıllık olarak rapor edilmektedir. Sanayileşmiş ülkelerde, et, yumurta ve taze ürünler *Salmonella* kontaminasyonu için en önemli risk faktörleri iken, gelişmekte olan ülkelerde kirlenmiş içme suları da *Salmonella* patojeni için önemli bir bulaş kaynağıdır.

Serotiplerin ağırlıklı bölümü günümüzde *S. enterica* türü içinde toplanmıştır. *S. bongori* serotipleri soğukkanlı hayvanlara adapte olup, insan hastalıkları ile ilgili değildir. İnsandan ve sıcakkanlı hayvanlardan en çok izole edilen alt tür *S. enterica* subspecies *enterica*'dır. *S.*

enterica, bağırsak enfeksiyonlarına veya ciddi sistemik hastalıklara (tifo gibi) neden olan pek çok serotip içermektedir (19).



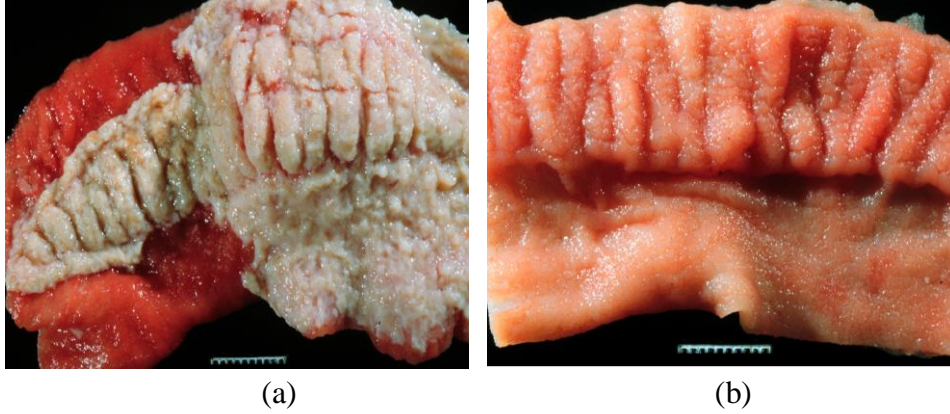
Şekil 3.2. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1970-2011 yılları arasında hastalık kontrol ve önleme merkezlerine (CDC) bildirilen laboratuvar onaylı insan *Salmonella* enfeksiyonu insidansı (22).

Bazı *Salmonella* üyeleri konakçıya adapte olmuş ya da konakçı spesifiktir. Bunun en tipik örnekleri tifo ateşine neden olan ve yalnız insan patojenleri olan *S. Typhi* ve *Paratyphi*'dir. Tifoid olmayan *Salmonella* suşları ise geniş konakçı dizisine sahiptirler. Bunlardan en yaygın olanı insan gastroenteritine yol açan *S. Typhimurium*'dur (2).

Salmonella enfeksiyonunun ilk aşaması, patojenin ince bağırsağın bir bölümünü teşkil eden ve ileoçekal valfe yakın bölgede yer alan ileum'a, adezinler aracılığı ile tutunması ve mukozal hücreler üzerinde kolonize olmasıdır. İntestinal invazyon *Salmonella* patojenitesinin karakteristik özelliğidir. Bu tutunma ve kolonizasyonu, ökaryotik hücrelerin işgali (invazyon) takip eder (23).

Salmonella'nın ince bağırsak epitel hücrelerine tutunması, lümeni kaplayan mukoz tabakadan geçme yeteneği sayesinde gerçekleşir. Hayvan konakçılarda, *S. Typhimurium* bağırsak epitelinde yer alan Peyer plaklarını (ince bağırsakta ve esas olarak da ileumda -incebağırsağın son kısmında- yer alan, lenfatik doku plakları) istila etmekte ve doku

hasarına yol açmaktadır (Şekil 3.3.). Bakteriler, epitel dokuyu makrofajların içerisinde geçer. Bu bakteriler serovaryete ve konakçı tipine bağlı bir şekilde; makrofajlar içerisinde hayatta kalarak replike olurlar ve mezenterik lenf nodüllerine, dalağa ve karaciğere yayılabirler (24). Enfekte olmuş fagositlerin retikuloendotelyal sistemde bulunan diğer organlara göç etmesi, bakterinin konakçı içinde yayılmasını kolaylaştırmaktadır (25,26).



Şekil 3.3. *S. Typhimurium*'un neden olduğu gastroenteritte doku hasarı.
(a) Enfekte buzağı ince bağırsak epitelini (b) normal epitel dokusunu (27).

3.3. *Salmonella*'nın Bağırsak Epiteline Tutunmasında Etkili Moleküler Elemanlar

3.3.1. Adezinler

Enfeksiyon hastalığının oluşması için, patojen bakterinin konak ile temasa geçmesi, konak hücrelerine tutunması, kolonize olması, hücre ve dokuların içine girmesi ve sonunda hasar oluşturması gereklidir. Mikroorganizmalar konağa çeşitli yollardan girse bile, ilk basamak yüzeye tutunmadır (aderans). Patojenlerin tutunmasını sağlayan faktörler, kolonizasyon yapan fakat patojen olmayan bakterilerinkiyle aynıdır. Ancak, patojenler her zaman kolonizasyon basamağında kalmaz. Adezyon süreci, adezin olarak adlandırılan bakteri yüzey yapılarının konak hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasını içermektedir. Adezinler arasında; bakteri yüzey proteinleri, polisakkaritler (kapsül veya glikokaliks) ve lipoteikoik asit sayılabilir. Adezinler yapılarına göre; fimbriyal adezinler, nonfimbriyal protein yapıda adezinler, karbonhidrat ve lipid yapıdaki adezinler olmak üzere üç grupta incelenmektedir (28).

Fimbriyal adezinler, *Salmonella* için bilinen adezinlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Fimbriya'lar, değişik çevresel koşullarda üretilen ve bakterilerin aktif yüzey tutunmasında rol oynayan saç benzeri yapılardır. Bir ya da daha fazla protein monomerinden oluşan bu yapılar hücre yüzeyinden dışarıya doğru sentezlenirler. *S. Typhi*'nin genom dizi analizi sonucunda 13 farklı fimbriyal operon ve 1 tane de tip IV pili operonu içerdiği saptanmışken, bu operonlardan 5 tanesi ve tip IV pili serovar Typhimurium'da bulunmamaktadır (29).

Nonfimbriyal protein yapısındaki adezinler; fimbriya görünümünde olmayan, dış membran ototransporter proteinleri veya bakteri yüzeyine bağlı kalan salgı proteinlerini kapsayan adezinlerdir. Bunlar, genellikle konak hücre proteinlerine veya karbonhidrat moleküllerine bağlanırlar. *Salmonella*'da nonfimbriyal protein yapısındaki adezinler ya tip I sekresyon sisteminden salınırlar ya da bakteriyel membranlarından ototransport edilirler. Şu anda 800'den fazla üyesi olan ototransporter ailesi, Gram-negatif cinslerde tip V salgı sistemi (T5SS) olarak da adlandırılmaktadır. *Salmonella*'da ototransporter ailesinden 3 adezin tanımlanmıştır. Bu 3 adezinden, MisL ve ShdA ototransporter proteinleri monomerikken, SadA adezini trimeriktir (30).

Karbonhidrat veya lipid yapıdaki adezinlere örnek olarak ise, negatif yüklü polisakkarit yapısı ile bakterilerin mukozal yüzeylerde mikrokoloniler oluşturarak üremesini sağlayan glikokaliks veya kapsül yapıları verilebilir.

3.3.2. Diğer yapılar

Salmonella'nın, ana fonksiyonu adezyon olmayan çeşitli yüzey yapıları da konakçı dokulara tutunmaya ve kolonizasyona kısmen katkıda bulunurlar.

Bu yüzey yapılarından bir tanesi bakteriyel hareketlilik için gerekli, uzun bir polimerik protein uzantısı olan flagelladır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar flagellanın yapısal ve montaj genlerindeki mutasyonlar sonucunda oluşan mutantlarda, kolesterol kaplı yüzeylere tutunma yeteneklerinin bozulduğu belirlenmiştir. Tutunma fonksiyonu üzerinde etkinlik gösteren genlerden biri *fliC* genidir. *Salmonella*'nın FliC üzerinden kolestrole tutunumunun, insan safra taşları üzerinde kolonize olması ve burada biyofilm oluşturması için ilk adım olabileceği düşünülmektedir (31).

Flagella sistemine benzer şekilde olan diğere bir sistem de, tip III salgı sistemidir (T3SS). *Salmonella* patojenite adası-1 (SPA-1), Tip III salgı sistemi için gerekli proteinleri kodlar ve fagositoz yapmayan hücrelerin invazyonundan sorumlu 31 geni içerir. Yapılan moleküler çalışmalar SPA-1'in, *Salmonella* enfeksiyonlarının enterik ateş (sistemik) veya yangılı ishallerin görüldüğü intestinal fazı için önemli olduğuna işaret etmiştir (32,33).

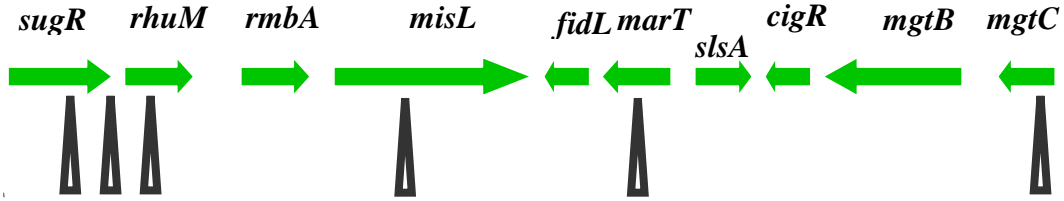
T3SS ve flagellanın aksine, lipopolisakkarit (LPS) için tanımlanmış spesifik bir tutunma faktörü yoktur. Hücre duvarı bileşeni olan LPS'nin tutunma etkisi daha çok kendi amfifilik karakterinden kaynaklanmaktadır. LPS molekülünün konakçı doku kolonizasyonu için gerekli olduğu, fare bağırsağında yürütülen kolonizasyon denemeleri ile kanıtlanmıştır (34).

3.4. *Salmonella* Patojenite Adaları

Farklı türler arasında gerçekleşen yatay gen transferi aracılığıyla virülans özellik ile ilgili genetik lokusların belirli genom bölgelerinde toplanması sonucu *Salmonella*'da patojenite adalarının (SPA) oluştuğu görüşü giderek yaygınlık kazanmaktadır. *Salmonella* patojenite adaları, çoğunlukla kromozom üzerinde bulunan 10-200 kilobaz (kb)'lık oldukça büyük genomik bölgeler olup, virülans faktörleri kodlayan çok sayıda gen içermektedirler. Virülans faktörler; bakterinin konak organizmaya adezyonu, kolonizasyonu, invazyonu, immün sistemden kaçışı ve toksin üretimi gibi özellikleri sağlayan yapılardır. Patojenite adacıkları sayesinde *Salmonella* türleri; makrofaj, dendritik ve epitelyal hücreleri enfekte edebilmektedir. Bazı patojenite adaları *Salmonella* cinsi içinde korunmuş olarak bulunurken, bazıları belirli serotipler için özgüdür. Bu nedenle konakçı adaptasyonu, patojenite ve oluşturulan enfeksiyonun şiddeti açısından serotipler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bugüne dek *Salmonella*'da 10 adet farklı patojenite adası ve 2 adet patojenite adası benzeri genomik organizasyon tespit edilmiştir (32,33). Bunlar içinde çalışmamızı doğrudan ilgilendirmesi nedeniyle sadece SPA-3 üzerinde durulacaktır.

3.4.1. *Salmonella* patojenite adası-3 (SPA-3)

Bu adacık *S. Typhi* ve *Typhimurium* ile *S.bongori*'de bulunmaktadır. SPA-3 tarafından kodlanan temel virülans faktörü, yüksek afiniteli magnezyum transport sistemi (MgtS)'dir. Sitoplazmik membranda yerleşim gösteren MgtS, *Salmonella* türlerinin gerek hücre ve gerekse makrofajların içinde canlı kalabilmesi için gereklidir. MgtS, *mgtC* geni tarafından kodlanmakta ve Mg^{2+} taşınmasını sağlamaktadır (32,33). 17 kb büyüklüğünde olan bu bölgenin G+C içeriği % 47.5'tur ve genomun diğer bölgelerindeki G+C içeriğinden (% 52) farklılık gösterir. SPA-III'ün en az 10 gen içerdiği (Şekil 3.4.) ve merkezinde yer alan 4 genlik grubun, (*rmbA*, *misL*, *fidL* ve *mar*) yalnız bazı alt türlerde bulunduğu saptanmıştır. Bu genler insersiyon seri kalıntıları ile birbirinden ayrılmaktadır (35).



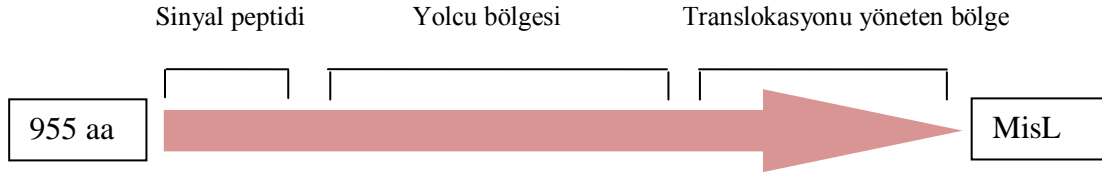
Şekil 3.4. *Salmonella* patojenite adası III'ün genetik organizasyonu (35).

3.5. MisL Proteini ve *misL* Geninin Pozitif Regülatörü *marT*'nin Genel Karakteristikleri

Salmonella enfeksiyonunun ilk aşaması, konakçı hedef doku yüzeyine (ince bağırsak epiteli) patojenin tutunmasının sağlanmasıdır. Bu süreç, *Salmonella*'da, 13 adet operon tarafından kodlanan değişik fimbriya'lar, mukoid kapsül yapılar ve diğer enterik bakterilerde tanımlanan ototransporter proteinlerle yüksek düzeyde homoloji gösteren MisL ve ShdA adezinleri tarafından gerçekleştirilmektedir (15,36).

Tip V salgı sistemi (T5SS), Gram-negatif bakterilerin dış membran üzerinden protein transportunun ana yoludur. T5SS'nin tipik bir özelliği, salgılanan substratın ve transport fonksiyonlarının tek bir polipeptit zinciri üzerinde kodlanmasıdır. Bu sebeple T5S sisteminin üyeleri ototransporter proteinler olarak da bilinmektedirler (37). Ototransporter

proteinleri genellikle bir N-terminal sinyal peptit, bir iç yolcu domaini ve bir C-terminal translokator domaini içermektedirler (Şekil 3.5.). Bu ototransporter proteinlerinin sitoplazmik membrandan geçişleri esnasında sinyal peptidinin kesildiği, C terminal bölgesinin dış membranda beta formları oluşturduğu ve iç domaininin hücre yüzeyine salgılandığı belirlenmiştir (38).



Şekil 3.5. MisL ototransporter proteininin aktif bölgelerinin şematik görünümü (14).

Ototransporter proteinlerin iç yolcu domaini genellikle konak-patojen etkileşimi için önemli fonksiyonlara aracılık eder (39). Örneğin *S. Typhimurium*'un ototransporter proteini olan ShdA konakçı hücre heparini gibi davranarak yolcu domaini ile ekstraselüler matriks proteinleri olan fibronektin ve kollajene bağlanmaktadır. *S. Typhimurium shdA* geninin delesyonu sonucunda; farelerde bağırsaktan ve fekal örneklerden geri alınan bakteri sayısında düşmenin gözlenmesi ile, hücre dışı matriks proteinlerine tutunmanın, bağırsak sisteminde kalıcılığın sağlanabilmesi için gerekli bir mekanizma olduğu belirlenmiştir (14,40,41).

S. Typhimurium'un ikinci ototransporter proteinini, SPA-III üzerindeki *misL* geni kodlanmaktadır. MisL proteini, sadece *Neisseria gonorrhoeae* gibi patojenik bakterilerde bulunan immunoglobulin A1 proteaz (AIDA-I) ailesi üyesi ototransporter proteinlerle benzerlik göstermektedirler. Fakat MisL ve AIDA-I proteinleri arasındaki bu benzerliğin C terminal bölgeleriyle sınırlı olması spesifik fonksiyonel benzerliklerinden çok ototransporter fonksiyonlarının benzerliğini düşündürmektedir. Bu iki protein de membran translokasyonu açısından önemli olan disülfid bağıını oluşturabilecek sistein amino asitlerini içermemektedirler (42).

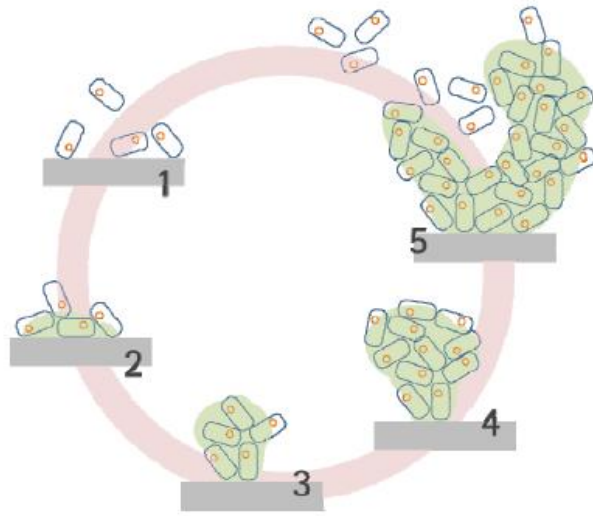
S. Typhimurium'un *misL* mutanı ile tavuk ve fare model sistemlerinde yürütölen çalışmalar, söz konusu genin *Salmonella* patojenitesinde önem taşıdığını göstermiştir. Daha sonra yapılan araştırmalarda MisL'nin, bağırsak yüzeyinde *Salmonella*'nın kolonizasyonu için gerekli bir ekstraselöler matriks proteini olduğu kanıtlanmıştır (14,43).

MisL proteininin ifadesinin *in vivo* koşullarda gerçekleştiği, *Typhimurium* serotipi ile enfekte edilmiş farelerde indirekt bir yöntem olan MisL'ye karşı antikor oluşununun incelenmesi sonucu saptanmıştır (14). Ayrıca bu proteinin, *S. Typhimurium*'un makrofajlara girişi aşamasında üretildiği Western blot yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır (44). Diğer yandan, *S. Typhimurium*'da *misL::lacZYA* transkripsiyonel füzyonu ile yürütölen çalışmalarda β -galaktozidaz aktivitesinin belirlenememesi ve yine Western blot yöntemi kullanılarak Luria-Bertani (LB) broth içerisinde geliştirilen *Typhimurium* hücrelerinde MisL ifadesinin saptanamamasından dolayı MisL ototransporter proteininin *in vitro* koşullarda üretilemediği öne sürölmüştür (14,35). MisL proteininin *in vitro* koşullarda üretiminin sağlanması amacı ile, *misL* yapısal geni vektör sistemde arabinoz tarafından indüklenen bir promotora bağlanarak *Typhimurium* serotipine aktarılmış ve böylece LB broth költüründe anti-MisL serumu saptanmıştır (14). MisL ototransporter proteinini kodlayan genin *in vivo* koşullarda ifadesinin ise, *misL* geninin pozitif regölatörü olan *marT* geni tarafından gerçekleştirildiği Tökel vd. (2007)'nin çalışmaları ile ortaya konmuştur (16). MisL proteininin pozitif regölatörü olan *marT* geninin tanımlanmasından sonra, *in vitro* koşullarda MisL üretiminde temel yaklaşım; aktif regölatör proteinin (MarT) konakçı sistemde ifadesinin sağlanması olmuştur.

Salmonella patojenite adası III (SPA-III) üzerinden kodlanan *marT* geni; *rmbA* (dizi homolojisi esas alınarak olası bir sitoplazmik protein tanımı yapılmıştır), *misL* (ototransporter protein), *fidL* (dizi homolojisi esas alınarak olası bir iç membran proteini tanımı yapılmıştır) ve *slsA* (dizi homolojisi esas alınarak olası bir iç membran proteini tanımı yapılmıştır) genleriyle komşudur. Bu grupta *fidL* ve *marT* operon oluşturmakta, diğer genler ise bağımsız transkribe edilmektedir (35,45). Bu gen grubu içerisinde yalnız MisL ve MarT proteinlerinin fonksiyonu hücresel süreçlerde tanımlanmıştır. Aminoasit dizi homolojileri esas alınarak adlandırılan diğer proteinlerin fonksiyonları hakkında ise herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

3.6. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunan mikroorganizmaların kendi ürettikleri bir matriks (genellikle polisakkarit, protein, DNA ve su içerir) içerisinde oluşturduğu topluluklar olarak tanımlanan biyofilm yapılarında; primer tutunma (geri dönüşümlü tutunma), mikrokoloni oluşumu/olgunlaşma ve dağılma olmak üzere dört gelişim süreci bulunmaktadır (46,47) (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Biyofilm oluşum aşamaları. 1- bakteri hücrelerinin yüzeye temasa geçmeleri, 2- EPS üretimi ile yüzeye geri dönüşümsüz tutunmanın induksiyonu, 3- biyofilm yapısının erken gelişimi, 4- biyofilmin olgunlaşması, 5- olgun biyofilm üzerinden hücrelerin koparak ayrılması (48).

3.6.1. Primer tutunma (Geri dönüşümlü tutunma)

Birçok fizikokimyasal değişkenin rol oynadığı bu tutunma, geri dönüşümlü bir bağlanma olup, mikroorganizma ile uygun inert yüzeyler arasında gerçekleşmektedir. Bu aşamada etkinlik gösteren güçler; hidrofobik etkileşimler, elektrostatik çekim ve Van der Waals güçleri olarak tanımlanmıştır. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir. Çünkü mikroorganizmalar ve katı yüzeylerin her ikisi de negatif yüklüdür. Yüzeyler ile mikroorganizmalar arasında gerçekleşen primer tutunmada hidrofobik etkileşimler en etkin gücü oluşturmaktadır (7). Hücreler bu fazda, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Geri dönüşümlü tutunma durumu, yapışan ve durgun haldeki

hücreler arasındaki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Burada mikroorganizma yüzeyin yakınındadır, ama henüz yüzeye temas etmemiştir (49).

3.6.2. Sekonder tutunma (Geri dönüşümsüz tutunma)

Geri dönüşümsüz tutunmada; yüzeye kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol, iyon-dipol ve hidrojen etkileşimlerinin yanında, iyonik ve kovalent bağlar da rol oynamaktadır. İkincil (sekonder) tutunma; mikroorganizma yüzeyindeki pili, fimbriya veya fibriller gibi ligandların biyotik yüzeylere bağlanması ile oluşan spesifik ve geri dönüşümsüz tutunmadır. Biyofilmin olgunlaşması, mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmasından sonra başlar (49).

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan yüzeye tutunma sırasında, bazı genlerin ifade düzeylerinde artış olduğuna yönelik kanıtlar mevcuttur. Örneğin, *P. aeruginosa*'da yürütülen çalışmalarda polisakkarit sentezinde gerekli olan *algC*, *algD* ve *algU* genlerinin transkripsiyonunda, yüzeye tutunma sırasında artış olduğu saptanmıştır. Bu durum bakterinin yüzeye teması algılayabildiğini ve spesifik genlerin ifadesini yönlendirdiğini göstermektedir (9).

3.6.3. Mikrokoloni oluşumu ve olgunlaşma

Bu aşamada mikroorganizmalar yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik mikroorganizmalar da yapışarak kolonizasyon sağlanır. Bu basamakta, biyofilm içerisinde organize olmuş karışık mikrobiyal toplulukta yer alan mikroorganizmalar ve mikro çevrenin doğası, biyofilmi tanımlayan ekstrasellüler matriksi meydana getirir (49).

Daha sonraki evrede ise, mikrokoloniler büyümekte ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşmektedirler. Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar, bu topluluklardaki bakterilerin kompleks ekzopolisakkarit (EPS) ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını kanıtlamıştır. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin

uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (50). Biyofilm yapısındaki su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla olmaktadır. Hücresel atık, biyofilmin yüzeyindeki kanallara iletilmektedir. Taşıma işlemi, esas olarak su yardımıyla ya da pasif difüzyonla gerçekleştirilmektedir. Ayrıca su kanallarının, içteki alanlara oksijen taşıdığı da saptanmıştır (7).

3.6.4. Dağılma

Biyofilmlerin ilerleyen safhalarında bu karmaşık yapıdan kopmalar görülebilir. Bu evrede biyofilm hücre topluluğundan köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilmden ayrılabilirler. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucu da olabilmektedir. Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Bu süreç dengeye oturduktan sonra sürekli hale gelmektedir (51).

3.7. Biyofilm Matriksinin Kompozisyonu

Bakteriyel türlere bağlı olarak biyofilmler; % 10-25 mikroorganizma ve % 75-90 ekzopolisakkarit matriksten oluşmaktadır. Çok hücreli bir komünite oluşturmak üzere bir araya gelen hücrelerin yapısallığı, hücre dışı bileşenler tarafından belirlenmektedir. Bu bileşenlerin çeşitliliğine göre de biyofilmlerin çeşitliliklerinden söz edilebilir (52). Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturmaktadır. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; EPS (%1-2) , globuler glikoproteinler ve diğer proteinler (%1-2), nükleik asit, lipit ve fosfolipitlerdir (%1-2). Ancak bu oranlar biyofilmi oluşturan organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine ve genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (53).

Biyofilmler bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu sebeple matriks, sulu bir tabiata sahip olup birçok türün biyofilminde anyonik bir karakter

sergileyerek temel besinlerin ve minerallerin yakalanarak konsantre hale getirilmesine ve oksijenin difüzyonuna olanak sağlayan bir sistem oluşturur (54).

Bakteriyel ekzopolisakaritler biyofilm matriksinin en temel ögesidir. Hücre dışı polisakkaritler; kapsüler polisakkaritler ile ekzopolisakkaritleri (EPS) kapsar. Üretilen bakteri kültürleri santrifüj edildikten sonra, hücreyle bağlantılı şekilde kalan ekstraselüler polisakkaritler kapsül olarak adlandırılırken, üst sıvı içerisinde kalan hücre dışı polisakkaritler, ekzopolisakkaritler olarak tanımlanmaktadır (52).

Ekzopolisakkaritler, bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadırlar. Biyofilmler içerisinde yer alan bakteriler için ekzopolisakkaritler; çevresel tehditlere, antibiyotiklere, biyositlere, antikorlara, sürfaktanlara, serbest yaşayan amip gibi predatörlere ve beyaz kan hücrelerine karşı koruyucu bir avantaj sağlar. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler. Buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korurlar. Matriks üç boyutlu bir kuvvet alanı yaratarak bakterileri çevreler ve bakterilerin yüzeylere sıkıca tutunmalarını sağlayarak bakterilere direnç ve stabilite kazandırır (54,55). EPS yapısında, bakteriyel türlerin farklılığına bağlı olarak ekzopolisakkaritlerin tip ve miktarının çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır (56).

Çözünmez bir β -(1,4) glukoz homopolimeri olan selülöz, birçok bakteriyel matriks kompozisyonunda bulunan önemli bir polisakkarit bileşenidir. Selülöz, klasik rdar morfolipinin ifadesi ile ilgili olan, yapışkanlığın yol açtığı hücre-hücre etkileşimlerini destekleyen komponentlerden birisidir (57). *Salmonella*'da tanımlanan son ekzopolisakkarit yapı ise kolonik asittir. Kolonik asit, *Salmonella* tarafından HEp-2 epitel hücreleri üzerinde oluşturulan biyofilmin geniş üç boyutlu yapı kazanması için kritik bir rol üstlenen ekstraselüler bir polisakkarittir (58).

Proteinler biyofilm matrikslerinin bir diğer önemli bileşenidir. Proteinlerin miktarları ve tipleri biyofilm içerisindeki mevcut bakterinin türüne göre değişim gösterir. Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir. Proteinler yapıların en tipiği olan fimbriyalar bakterilerin inert yüzeylerle olan etkileşiminde önemli rol oynarlar. *S. Typhimurium* genomu 13 fimbriyal operon içermektedir ve bunların bazılarının biyofilm oluşumunda önemli olduğu gösterilmiştir. Amiloid benzeri hücre

yüzey proteini olan kıvrımlı fimbriya (curli) konakçı kolonizasyonu, persistans, motilite ve invazyon gibi süreçlerde rol oynayan önemli bir proteindir. *Salmonella*'da kıvrımlı fimbriya, ilk önce hücre-yüzey etkileşimini ve sonrasında da hücre-hücre interaksiyonlarını teşvik ettiği için biyofilm oluşumunda önemlidir (59,60).

Biyofilm matriksini oluşturan diğer bir protein yapısı ise flagelladır. *Salmonella* biyofilm oluşumunda farklı rollere hizmet eden flagella sadece başlangıç tutunması için önemli gibi görünürken, biyofilmin olgunlaşması için gerekli bulunmamıştır (31).

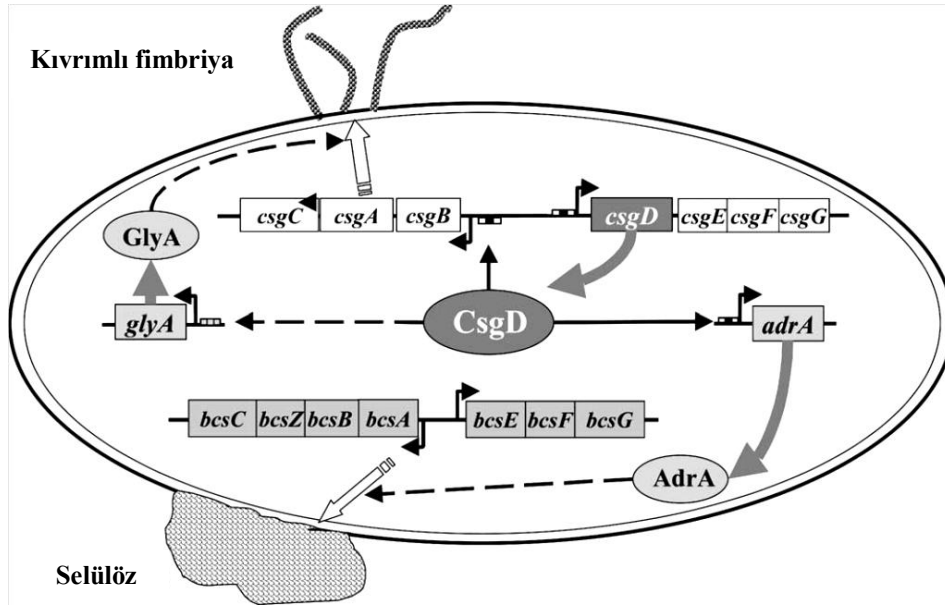
3.8. *Salmonella* Biyofilmlerinde Rol Alan Regülatörler ve Sinyal İletimi

3.8.1. CsgD

csgD geni (curli subunit gene D, *S. Typhimurium*'daki eski adı *agfD*) LuxR süper ailesinin transkripsiyonel regülatörünü kodlamakta ve iki ekstraselüler matriks bileşenini (kıvrımlı fimbriya ve selülöz) pozitif şekilde regüle etmektedir (61).

Salmonella'da biyofilm bileşeni olarak önemli bir rol üstlenen selülozun biyosentezi, CsgD'nin doğrudan *adrA*'ya bağlanması ile pozitif şekilde regüle edilmektedir (62). *adrA*, bakteriyel selülöz sentez operonu olan *bcsABZC*'yi, hücre içindeki c-di-GMP seviyesini değiştirmek suretiyle regüle etmektedir. Selülöz kompleksi, *bcsA* ve *bcsB* genleri tarafından kodlanmaktadır. *bcsZ* gen ürünü ise selülaz aktivitesi gösteren bir enzimdir (63). CsgD, kıvrımlı fimbriyanın sentezine de katılır ve promotora bağlanarak *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu başlatır (Şekil 3.7.).

csgD mutantlarının çok hücreli bir davranış özelliğinden yoksun olduğu ve Kongo kırmızısı içeren agar plaklarında düz ve beyaz koloni (saw) morfoloji sergilediği belirlenmiştir (64). *csgD* mutantları kullanılarak cam üzerinde gerçekleştirilen biyofilm denemelerinde, CsgD proteininin biyofilm olgunlaşması için gerekli olduğu ama mikrokoloni oluşumu için önem taşımadığı saptanmıştır (65).



Şekil 3.7. Selülöz biyosentezi, CsgD regülasyonu (66).

3.8.2. BarA/SirA ve Csr sistemi

BarA/SirA önemli bir virülans, hareketlilik ve biyofilm oluşum regülatörüdür. Öncü çalışmalar global transkripsiyonel regülatör olan SirA'nın, SPA-1 genlerinin ifadesini pozitif şekilde regüle ettiğini göstermiştir. SirA, sensör kinaz protein BarA ile birlikte 2 komponentli bir regülatör sistemi oluşturmaktadır (67). SirA/BarA ortologları; *Escherichia coli* (UvrY/BarA), *Pseudomonas* spp. (GacA/GacS), *Vibrio cholerae* (VarA/VarS) gibi birçok bakteride mevcut olup; virülanslık, sekonder metabolizma, hareketlilik, yeter sayı algılama (quorum sensing) veya biyofilm oluşumu ile ilgili genlerin ifadesini kontrol ederler (68). SirA, transkripsiyonel olarak *csrB* ve *csrC* sRNA'larını ve virülans genlerin regülatörleri olan *hilA* ve *hilC* genlerini aktive eder. Her iki sRNA da *Salmonella*'nın Csr (karbon depolama regülatörü) sisteminin parçasıdır ve RNA bağlama proteini olan CsrA'nın aktivitesini antogonize ederler (69).

BarA ve SirA'nın tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonunu da regüle ettiği saptanmıştır. Tip I fimbriyanın *Salmonella* biyofilm oluşumunda önemli olduğu bilinmektedir (70). Bundan dolayı SirA/BarA regülununun tüm bileşenlerinin *Salmonella*'da biyofilm oluşumundaki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda *sirA*, *csrB* ve *csrC* (ikili mutant) ve *fimI* mutantlarının plastik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneklerini kaybettiği saptanmıştır (71).

3.8.3. Flagellar regülatörler

Teplitski vd. (2003)'nin yaptığı çalışmada, flagellar regülatörlerin *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir (67). *FlhDC* regülatörü, flagellar regülasyon çağlayanının en üst noktasındadır. *S. Typhimurium*'da *flhD* ve *flhC* geni mutantlarında biyofilm üretiminin yaklaşık olarak 5 misli arttığı saptanmıştır (71). *E. coli*'nin *flhDC* mutantlarında da, biyofilm üretiminin düştüğü belirlenmiştir (72). Teplitski vd. (2003)'nin çalışmalarında kullandığı bütün hareketsiz mutant suşlar (*csrA*, *flhD*, *flhC*, *fliF*, *fliA*, *cheZ*, *motA* ve flagellasız *fliB/fliC* ikili mutantları), biyofilm oluşumunda doğal tiplerden farklı kabiliyetler göstermişlerdir. Bu mutasyonlardan (*flhD*, *flhC*, *fliA*, *cheZ* ve *motA*), *FlhDC* regülona aittir. Alternatif bir sigma faktörünü kodlayan *fliA*'da meydana gelen bir mutasyon, *flhD* mutasyonunda olduğu gibi biyofilm miktarında artışa sebep olmuştur. *fliF*'yi kısıtlayan mutasyon (*fliF* mutantları motor aparata sahip olup, yüzeyde flagella bulundurmaz) aynı şekilde doğal tiptekinden daha fazla biyofilm üretimine yol açmıştır. Flagellin üretimi kısıtlanmış; fakat flagellar salgı sistemine sahip ikili *fliB/fliC* mutantında da biyofilm artışı gözlenmiştir. Paralize flagella bulunduran *motA* mutantı ile flagellaya sahip fakat kemotaktik olmayan *cheZ* mutantının ise doğal tiptekinden daha az biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Bu bulgular flagellanın, bakterinin yüzeyinde fonksiyonel olsun ya da olmasın biyofilm üretimini inhibe ettiğine işaret etmektedir (71,73,74).

3.9. Biyofilmi Oluşturan Kolonilerin Morfotip Karakterleri

Doğal olarak meydana gelmiş biyofilmler, çoğunlukla farklı bakteriyel türleri içermektedir. Kolonilerin oluşturduğu matriks bileşeninin içeriğine göre biyofilm yapılarının morfotip karakterlerinin değiştiği bilinmektedir. *Salmonella*'da ekstraselüler matriksin ana komponentleri olduğu bilinen selülöz ve kıvrımlı fimbriyanın sentezi sıklıkla birlikte olur. Kongo kırmızı içeren agar besiyerinde geliştirildiğinde kıvrımlı fimbriya ve selülöz ifadesinden kaynaklı agregatif koloniler şeklinde gözlenen ve *Salmonella*'nın çok hücreli davranış biçimini karakterize eden koloni morfotipi, rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfotipidir (75). Bu morfotip ilk olarak *S. Typhimurium*'da tanımlanmıştır. Katı besiyerinde bu koloni morfotipini sergileyen hücreler, genellikle sıvı kültürde hücre kümelenmesi, sıvı-hava ara fazında son derece sıkı bir pelikül yapısı ve abiyotik

yüzeylerde biyofilm oluşumu ile karakterize edilirler (64). *Salmonella* yaşam döngüsüne bakıldığında, rdar morfortipinden kaynaklı olan sıvı kültürde gözlenen hücre kümelenmesinin; *S. Typhimurium*'un virülans adaptasyon stratejisi olmasından daha çok, ortamda kalıcılığın sağlanabilmesi için geliştirdiği bir strateji olduğu düşünülmektedir (76).

Kıvrımlı fimbriyanın alt ünitesini (AgfA) kodlayan genin baskılanmasıyla biyofilm matriksi için yalnız selülöz sentezlenmekte ve söz konusu bakterilerde koloni morfortipi “pdar” olmaktadır (pembe, kuru ve pürüzlü) (77,78). Ekzopolisakkarit olarak yalnızca selülöz sentezleyen bakterilerin sıvı-hava arafazındaki biyofilmleri gevşek ve elastik bir yapı gösterir. Ancak sıvı kültürlerde pelikül yapısı oluşturmazlar. Bu veriler, kıvrımlı fimbriyanın *Salmonella* suşlarının oluşturdukları biyofilmlerde ne kadar önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

Diğer yandan insersiyonel mutasyonla inaktif hale getirilen ve muhtemelen bir transmembran proteini kodlayan *adrA* geni hasarlı suşların oluşturduğu koloniler “rdar” morfortipi yerine sadece kıvrımlı fimbriyayı sentezleyebilen “bdar” (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfortipe sahip olmaktadır. Bu durumda görevi tam olarak anlaşılamayan ekstraselüler bileşenin yokluğu sıvı kültürlerde görülen pelikül yapılarının çok daha kırılğan olmasına yol açmaktadır (64).

Çok hücreli davranış durumuyla ilişkili olan ve durağan gelişme fazında ifade olunan kıvrımlı fimbriya ve selülöz, *agfD* (*csgD*) tarafından pozitif şekilde regüle edilmektedir. *agfD*'nin delesyonu kırmızı, buruşuk, kuru ve yayılan bir koloni morfortipi olan “rdar”ı; kıvrımlı fimbriya ve selülozu üretemeyen beyaz ve düz bir koloni morfortipi olan, “saw” morfortipine çevirmektedir (77).

3.10. *S. Typhimurium*'da Regülasyon Karakteristikleri ve Biyofilm Üretimi İle İlişkileri Araştırılan Genler

Çalışma grubumuz tarafından yürütülen bir araştırmada, mikrodizin denemeleri sonucunda; *dps*, *yliH*, *wzzB*, *misL*, *sIsA*, *fidL*, *marT*, *rmbA*, *cheM*, *cheA*, *fliA* ve *fliC* genlerinin, *marT* geni indüksiyonuna bağlı ifade değişimleri gösterdiği saptanmıştır (13). Çizelge 3.1.'de bilinen fonksiyonları tanımlanan bu genlerin çalışmamız kapsamında regülasyon karakteristikleri ve biyofilm üretimi ile ilişkileri incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında çalışılan genler ve görevleri (13).

Gen adı	Görevi
<i>dps</i>	Stresten sorumlu DNA-bağlanma proteini
<i>yliH</i>	Olası sitoplazmik protein
<i>wzzB</i>	Lipopolisakkarit zincirinin O-antijeninin büyüklük belirleme regülatörü
<i>misL</i>	Ototransporter protein (<i>S. typhimurium</i> 'un konakçı hücrelere tutunması ve kolonizasyonunda görev yapmaktadır)
<i>sIsA</i>	Olası iç membran proteini
<i>fidL</i>	Olası iç membran proteini
<i>rmbA</i>	Olası sitoplazmik protein
<i>cheM</i>	Metil akseptör kemostaz protein II (MCPII), aspartat reseptör protein (Kemotakside görev yapmaktadır)
<i>cheA</i>	Sensor histidin protein kinaz (Kemotakside görev yapmaktadır)
<i>fimA</i>	Fimbriyanın ana yapısal alt ünitesini kodlamaktadır
<i>fliA</i>	RNA polimerazın sigma F (sigma 28) faktörü, geç flagella genlerinin transkripsiyonunu düzenlemektedir
<i>fliC</i>	Flagella biyosentezi; flagellin, filament yapısal protein
<i>marT</i>	MisL ototransporter proteininin pozitif regülatörü

4. MATERYAL VE YÖNTEM

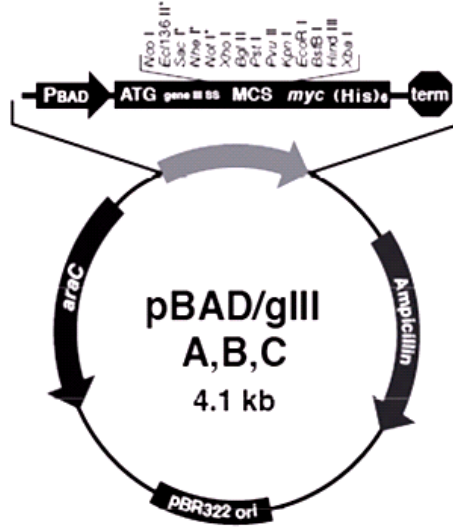
4.1. Materyal

4.1.1. Bakteri suşları ve plazmidler

Tez çalışmasında kullanılan; *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu, *marT* geni mutantları ($\Delta marT$) (Çizelge 4.1.) ve pBAD24 plazmidi (Şekil 4.1.) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *Salmonella* suşları Luria-Bertani (LB) sıvı ortamında 37 °C’de 18 saat süreyle geliştirilmiş ve % 60 gliserol içeren LB sıvı besiyeri ile 1:1 (hacim/hacim) oranında karıştırılarak -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 4.1. *S. Typhimurium marT* mutantlarının özellikleri

Suş Kodu	Özellikleri	Antibiyotik Dirençliliği
MZ1627	SL14028 $\Delta marT::kan$ (pBAD24+ <i>marT</i> geni)	KanR-AmpR
MZ1629	SL14028 $\Delta marT::kan$ (pBAD24)	KanR-AmpR
MZ1641	SL14028 $\Delta marT::kan$	KanR



araBAD promotörü: 4-276. bazlar arası
ATG baz bölgesi: 319-321. bazlar arası
Çoklu klonlama bölgesi: 374-428. bazlar arası
Ampisilin dirençlilik: 1032-1892. bazlar arası
AraC geni: 3241-4139. bazlar arası

Şekil 4.1. pBAD/gIII A, B, C vektörlerinin genetik haritası. pBAD/gIII plazmidler pBR322'den türetilen ifade vektörleridir. Bu çalışmada MarT proteininin üretiminin induksiyonu amacı ile kullanılmıştır (Invitrogen, USA).

4.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler

Tüm *Salmonella* suşları, Luria-Bertani (LB) sıvı ve agar besiyerlerinde üretilmiştir (Çizelge 4.2.). Klonlama uygulamalarında ve sonrasında vektörün içerdiği dirence uygun seçici antibiyotikler ortama ilave edilmiştir.

Çizelge 4.2. Luria Bertani (LB) besiyeri bileşimi

İçerik	g/L
Tripton (Fluka,France)	10 g
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5 g
Sodyum klorid (Merck, Germany)	10 g
Agar (Merck,Germany)	15 g

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak, sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. Sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılarak, katı besiyeri ise agar ilave edilerek, otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilmiştir.

Tüm biyofilm çalışmalarında besiyeri olarak NaCl içermeyen LB sıvı ve agar ortamı kullanılmıştır (79) (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. NaCl içermeyen Luria Bertani (LB) besiyeri bileşimi

İçerik	g/L
Trypton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Agar	15 g

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak, sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. Sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılarak, katı besiyeri ise agar ilave edilerek, otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilmiştir.

Çalışılan tüm suşların morfotiplendirilmesi kongo kırmızısı (Sigma-Aldrich, USA) içeren LB agar besiyerinde yapılmıştır (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Kongo kırmızısı içeren (40 µg/mL) LB agar (NaCl'siz) besiyeri bileşimi

İçerik	g/L
Trypton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Kongo kırmızısı	0,04 g
Agar	15 g

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak, sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121 °C'de 15 dk. süre ile yapılmıştır.

Çalışılan tüm suşların selüloz içerikleri kalkoflor (Sigma-Aldrich, China) içeren LB agar ortamında değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Kalkoflor içeren (50 µg/mL) LB agar (NaCl'siz) besiyeri bileşimi

İçerik	g/L
Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Kalkoflor	0,05 g
Agar	15 g

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak, sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121 °C'de 15 dk. süre ile yapılmıştır.

Çizelge 4.6. Fosfat Tuz Tamponu (PBS)

İçerik	g/L
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dk. süre ile yapılmıştır.

Çizelge 4.7. %33'lük Glasiyel asetik asit çözeltisi

İçerik	100 mL için
Glasiyel asetik asit	33 mL
Distile su	67 mL

Çizelge 4.8. Tris-asetat tamponu (TAE Tamponu)

İçerik	g/L
Tris Baz (Sigma-Aldrich, USA)	242 g
Glasiyal asetik asit	54.1 mL
EDTA (0.5 M pH8.0) (Ambion, USA)	100 mL
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır

Çizelge 4.9. Jel yükleme tampon çözeltisi

İçerik	100 mL için
Bromfenol blue (Merck, Germany)	0.25 g
Sakkaroz (Merck, Germany)	40 g
Distile su	100 mL

4.2. Yöntem

4.2.1. *S. Typhimurium* 14028 suşunda arabinoz varlığında MarT üretiminin teşviki

marT geni, pBAD24 vektörü kullanılmak suretiyle *E. coli*'nin indüklenebilir arabinoz BAD promotorunun önüne klonlanmıştır (13). Bu sebeple MarT'nin üretiminin teşviki bakteri gelişme ortamına L-arabinoz (Sigma-Aldrich, USA) ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Uygun antibiyotikleri içeren LB sıvı ortamında 37 °C'de 18 saat üretilen MZ1627 (*S. Typhimurium* Δ *marT*, pBAD24+*marT* geni) suşu, süre bitiminde yine uygun antibiyotikleri içeren 5 mL LB sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilmiştir. 200 rpm çalkalama hızında, 37 °C'de OD₅₉₅=0.2 düzeyine kadar geliştirildikten sonra besi ortamlarına, *marT* geninin ifadesi için optimum düzey olarak belirlenen % 0.02 oranında L-arabinoz ilave edilerek 30 dakika daha inkübasyona tabi tutulmuştur (13).

4.2.2. Polistiren üzerinde biyofilm oluşumunun belirlenmesi

Salmonella suşlarının polistiren üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (80). Bu amaçla, NaCl içermeyen 5 mL'lik LB sıvı (LBwo/NaCl) ortamlarında 37 °C'de çalkalamalı koşullarda 18 saat geliştirilen aktif kültürlerden, LBwo/NaCl besiyerine ekim yapılarak bakteriyel üreme OD₅₉₅= 0.4 düzeyine gelene kadar inkübe edilmiştir (Shimadzu spektrophotometer, Japan). Bu süspansiyonlardan, 100 µl/kuyu LBwo/NaCl içeren 96 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plaklarına 30 µl aktarılmıştır. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrodilüsyon plakları, 72 saat süresince 20 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde, kuyular 2 defa steril distile su ile yıkanmış ve her kuyuya 150 µl metanol ilave edilerek 10 dakika inkübasyon ile oluşan biyofilm yapısının fiksasyonu

gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde metanol uzaklaştırılmış ve kuyular kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra 130 µl % 0.1'lik kristal viyole kuyulara aktarılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Plaklar steril distile su ile 2 kez yıkanmış ve kuyulara biyofilm tabakasına bağlanan boyayı çözmek amacıyla 130 µl %33'lük glasiyal asetik asit aktararak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (81). İnkübasyon bitiminde çözünen kristal viyole boyasının optik yoğunluğu 595 nm dalga boyunda Elisa okuyucusunda (Biorad, USA) ölçülmüştür. Alınan OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca NaCl'siz LB sıvı içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamasının çıkarılması suretiyle üretilen biyofilm düzeyleri belirlenmiştir.

4.2.2.1. İnkübasyon sıcaklığı ve pH'nın biyofilm üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Biyofilm üretimi için gereken optimum sıcaklık ve pH düzeyinin belirlenmesi amacı ile; doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu, MarT üretimi teşvik edilen MZ1627 suşu ve *marT* geni bakımından mutant MZ1629 (boş pBAD 24 plazmidi ihtiva eden) suşu kullanılmıştır. Bu denemelerde endüstriyel süreçlerde en yaygın kullanılan üç sıcaklık derecesi (4, 20 ve 37 °C) ve 5 pH düzeyinin (4.5, 5.5, 6.5, 7.0 ve 8.5) biyofilm üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Besiyeri pH'sı 1 N NaOH (Merck, Germany) ve 1 N HCl (Merck, Germany) kullanılarak sterilizasyonundan önce ayarlanmıştır. Sıcaklığın biyofilm oluşumu üzerine etkisinin inceleneceği denemenin dışındaki denemelerde, inkübasyonlar literatür verilerinde de biyofilm üretimi için optimum sıcaklık olan 20 °C'de gerçekleştirilmiştir (78,82). Denemeler mikrodilüsyon plaklarında 2 tekrar ve 8 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm üretim düzeyleri 4.2.2.'de anlatıldığı şekilde saptanmıştır.

4.2.2.2. *marT* geninin biyofilm üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

marT geninin *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için, arabinoz ilavesi ile bu genin indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için hem doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu ve hem de MZ1627 mutantının üreme ortamlarına % 0.02, % 0.01, % 0.005, % 0.0025, % 0.00125 ve % 0.000625 oranlarında L-arabinoz eklenmiş ve yarım saat 37 °C'de çalkalamalı koşullarda inkübe edilmişlerdir. İndüksiyon sonrasında, 4.2.2.'de anlatıldığı gibi, doğal tip *S. Typhimurium* 14028 ve mutant MZ1627 suşları biyofilm üretme miktarları açısından değerlendirilmiştir.

4.2.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)

Farklı arabinoz seyreltme oranlarına ulaşılmıştır) teşviki ile *marT*'nin ifadesi kademeli olarak azaltılmış ve bu koşullarda hedef genlerin ifadelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle, *marT* geni ifadesi farklı arabinoz konsantrasyonları ile teşvik edilmiş ve edilmemiş koşullarda üretilen doğal tip *S. Typhimurium* 14028 ve MZ1627 mutant suşlarından toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolatları cDNA sentezine tabi tutulduktan sonra hedef genlere özgü primerler kullanılarak elde edilen cDNA'lar kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır.

4.2.3.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonunda, kullanılan kite (High Pure RNA Isolation Kit, Roche/Germany) spesifik, üretici firma tarafından önerilen basamaklar izlenmiştir.

- Hücre çöktelleri 200 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) içerisinde çözülür.
- Bu çözelti üzerine 4 µl lizozim (50 mg/mL) ilave edilerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edilir.
- Süre bitiminde 400 µl lizis/bağlama tamponu ilave edilerek iyice karıştırılır.
- Solüsyon kitin içerisinde bulunan spin kolona aktarılarak 8000 g'de 15 sn. santrifüj edilir.
- Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra spin kolondaki filtrenin üzerine 90 µl DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I karıştırılarak eklenir.
- 15-25 °C arasında bir sıcaklıkta 1 saat inkübasyona bırakılır.
- Süre bitiminden sonra filtrenin üzerine 500 µl yıkama tamponu I'den eklenerek 8000 g'de 15 sn. santrifüj edilir ve toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır.
- 500 µl yıkama tamponu II eklenir ve 8000 g'de 15 sn. santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır. Bir kez daha 200 µl yıkama tamponu II eklenip 2 dk. santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda spin kolon steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
- Spin kolonda bulunan filtrenin üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklenir ve 800 g'de 1 dk. santrifüj edilir.

- Elde edilen RNA'lar bekletilmeden cDNA eldesine alınır. Geri kalanı bir sonraki kullanımına kadar -80 °C'de saklanır.

Saflaştırma sonrası elde edilen RNA'larda saflık ve miktar tayini (Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre) yapılmış ve saflıkları agaroz jel elektroforezinde de kontrol edilmiştir. Beklenen RNA görüntüsü elde edildikten sonra cDNA sentezine geçilmiştir.

4.2.3.2. cDNA sentezi

RNA örneklerinden (2000 ng) cDNA sentezi için "cDNA synthesis kit"i (Roche, Germany) kullanılmıştır. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımları ve uygulanan sıcaklık döngüsü Çizelge 4.10. ve Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Elde edilen her cDNA, qRT-PZR denemelerinde kullanılmak üzere ddH₂O ile 1:5 oranında seyreltilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 4.10. Ters transkripsiyon protokolü

İçerik	Konsantrasyon	Final Konsantrasyon	µl
Distile su			*
Random hexamer primer	600 pmol/µl	60 µM	2
RNA		2000 ng	
65 °C'de 10 dk. RNA'nın denatürasyonu için inkübe edilir ve hemen buza alınır!			
Reverse Transcriptase Buffer	5 (x)	1 (x) (8mM MgCl ₂)	4
RNase Inhibitor	40 U/ µl	20 U	0.5
dNTP Mix	10 mM (her biri)	1 mM (her biri)	2
Reverse Transcriptase	20 U / µl	10 U	0.5
Son Hacim			20

*Toplam hacim distile su ile 13 µl'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 4.11. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü

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

4.2.3.3. Primer dizaynı

Kantitatif gerçek zamanlı PZR'dan doğru sonuçlar alabilmek için dikkat edilmesi gereken en önemli basamak, kullanılacak olan primerlerin dizaynıdır. Belirleyici ajan olarak SYBR Green kullanılacaksa, dizayn edilecek primerlerin ortalama uzunluğu yaklaşık 100-200 bp olmalıdır. İleri ve geri primerlerinin erime sıcaklıkları, aralarında sadece 0.5 °C'lik bir fark olacak kadar benzer olmalıdır. Amplifikasyon reaksiyonlarında yüksek verimlilikler elde edebilmek için dimer ve spesifik olmayan bağlanmalar yapmayan primer çiftlerinin kullanılması önemlidir (83–85).

Gerçek zamanlı PZR deneylerinde kullanılan gen spesifik primerler “Primer 3” [<http://frodo.wi.mit.edu>] programı kullanılarak tasarlanmıştır. Çalışılan genlere ait diziler NCBI'dan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) temin edilmiştir. Primer çiftlerinin spesifitesini belirlemek amacıyla bu diziler veri tabanında bulunan diziler ile karşılaştırılmış ve yalnızca hedef genlere homolog oldukları belirlenmiştir. Genlerin ifadeleme analizinde görece kantifikasyon yapabilmek için referans gen (housekeeping gen) olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz-A (*gapA*) geni seçilmiştir. İfade düzeyi analizinde kullanılacak gen spesifik primerlerin dizileri ve ID numaraları Çizelge 4.12.'de listelenmiştir.

Çizelge 4.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR denemelerinde kullanılan primerler

Gen sembolü	Gen ID/ primer dizisi [5'-3']	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>fimA</i> İleri Geri	1202063 <i>TGTGCCGTCAGCACTAAATC</i> <i>TGGTGTTATCTGCCTGACCA</i>	181
<i>rmbA</i> İleri Geri	1255280 <i>CAGTGGCATGCATATTGTCC</i> <i>AGCGTTCGTCCACGTTTACT</i>	183
<i>fidL</i> İleri Geri	1255282 <i>GGGCTTGGACATCTTTTCA</i> <i>ATCACGCCGCTCATTTTATT</i>	194
<i>slsA</i> İleri Geri	1255285 <i>TGGGATAATGCCGATTTTGT</i> <i>TACCGGAGGCATCAATTACC</i>	154

Çizelge 4.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR denemelerinde kullanılan primerler (devam)

Gen sembolü	Gen ID/ primer dizisi [5'-3']	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>misL</i> İleri Geri	1255281 TGATCCGACAATTCCTGACA TGTCGGTGTACTGGGTTTCA	161
<i>fliA</i> İleri Geri	1253477 TTGCGGAGTATCGTCAGATG CGGGTTTTCTGTGATGTT	125
<i>fliC</i> İleri Geri	1253480 ACGAAATCGACCGTGTATCC GCACATTCAGCGTATCCAGA	165
<i>dps</i> İleri Geri	1252350 ATGAGATGCTGGATGGCTTC GCGGATAGCTTTTCAGTGGA	137
<i>yliH</i> İleri Geri	1257372 GCTCCACGATCACGCTTTAC AATCATGGTGTCCGCTCATT	122
<i>cheA</i> İleri Geri	1253442 CTCTGCGTTTTCCGCATTAT TCACATAAGAAACCGAGAGTGG	116
<i>cheM</i> İleri Geri	1253440 GTGGCGGTAGAGAAAGTGGA ATGAGATCGCCGTGGTTTAC	176
<i>wzzB</i> İleri Geri	1253600 ATCTGACGAAAACGCTCACC ACGGGAAGAGAGGTCGGTAT	113
<i>marT</i> İleri Geri	11754149 CTGCCGCTTTCGATATCTTC GTATGTCAGGGCGTTGGTTT	193
<i>gapA</i> İleri Geri	11755204 GGAACGCCATACCAGTCAG AACCCAGAAAACCGTTGAC	152

4.2.3.4. Genlerin ifade düzeylerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) ile belirlenmesi

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

Çizelge 4.13. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı

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

LightCycler cihazında amplifikasyon için kullanılan döngü programı Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. LightCycler cihazında kullanılan q-RT-PZR programı

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

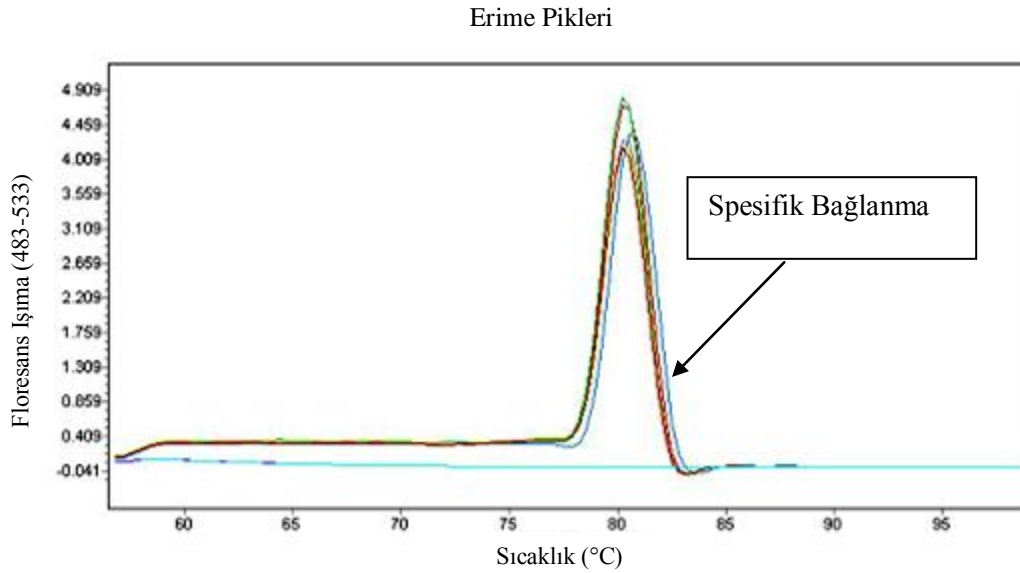
* *rmbA* ve *marT* genleri için optimizasyon çalışmaları sonucunda amplifikasyonun primer bağlanma basamağındaki sıcaklık, erime eğrisi analizi sonucunda 60 °C olarak ayarlanmıştır.

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

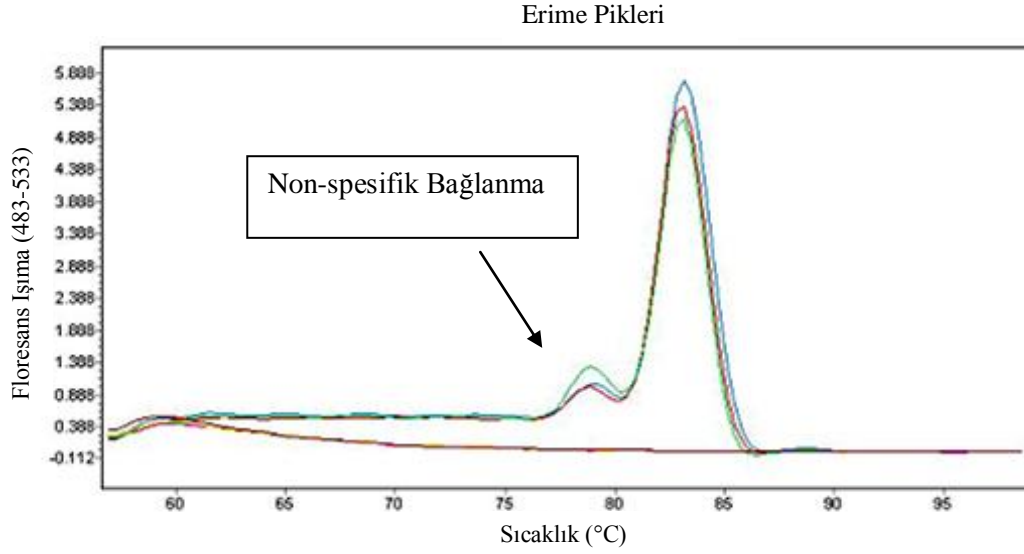
4.2.3.4.1 Erime eğrisi analizi

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında etiyum bromit yerine daha az toksik, primerlerden bağımsız, daha spesifik ve daha duyarlı floresan bir dsDNA inter kalatör ajanı olan "SYBR Green I" boyası kullanılmıştır. Bu özgül olmayan yöntemde kullanılan floresan boya reaksiyonda çoğalan çift zincir DNA'ya özgül olmayan bir şekilde bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışıyla orantılı olarak floresan ışımaya gerçekleşir. Her farklı çift zincir DNA molekülünün kendine özgü bir erime sıcaklığı (T_m) vardır. Bu çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Tipik bir erime eğrisi analizi sonucunda, her örnek için tanımlanan ayrılma sıcaklığında tek bir pikin

görülmesi beklenir. Fazladan oluşan herhangi başka bir pik, reaksiyonda spesifik olmayan amplikonların veya primer dimerlerinin oluştuğu anlamına gelmektedir. Çalışmamızda erime eğrisi analiz sonuçları, yukarıda özetlenen literatür bilgileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Şekil 4.2. tek bir ürünle tanımlanan erime eğrisi sonucunu ve Şekil 4.3. ise nonspesifik amplikon ve primer dimeri içeren bir erime eğrisi sonucunu göstermektedir. Bu çalışmada, her gen spesifik primer çifti için PZR koşulları, gerçek zamanlı PZR’de istenilen erime eğrisini verecek şekilde optimize edilerek (*rmbA* ve *marT* genleri için amplifikasyonun primer bağlanma sıcaklığı, erime eğrisi analizi sonucunda 60 °C olarak saptanmıştır) belirlenmiştir.



Şekil 4.2. *fidL* geni için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi



Şekil 4.3. *rmbA* geni için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi

4.2.3.4.2 Amplifikasyon verimliliğinin belirlenmesi

q-RT-PZR verilerinin doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için kantifikasyon yönteminin seçimi, gerçek zamanlı PZR'nin en önemli basamağını oluşturmaktadır. Bu çalışmada; bir örnekteki belli bir genin mRNA düzeyindeki değişimin, bir başka örnekteki o hedef genin mRNA düzeyindeki değişimine oranlanmasını esas alan görel kantifikasyon stratejisi seçilmiştir. Görel kantifikasyonda; bir hedef genin ifadesini referans gen ile ilişki kurarak hesaplayabilmek için birçok matematiksel model geliştirilmiştir. Hesaplamalar, eşik döngü değeri (Ct) farklılıklarının amplifikasyon verimi de göz önünde bulundurularak karşılaştırılması esasına dayanmaktadır.

Amplifikasyon verimliliği PZR reaksiyonunun mükemmel ne kadar yakın gerçekleştiğinin göstergesidir. Çalışmada, kullanılan her primer çifti için PZR amplifikasyon verimlilikleri (E) hesaplanmıştır. Bunun için, arabinoz ile indüklenmemiş doğal tip 14028 suşundan elde edilen cDNA örneğinin (kalibratör örnek) 1/10 seri dilüsyonları yapılmış (1-1:100 000 dilüsyonları) ve dilüsyon serilerinden elde edilen log₁₀ kopya sayısının Ct değerlerine (eşik döngüsü değerleri) karşı çizilen grafiği oluşturulmuştur. Bu grafikten elde edilen amplifikasyon pikinin eğiminden üstel amplifikasyon (Denklemler 1.1.) ve amplifikasyon verimliliği (Denklemler 1.2.) hesaplanmıştır.

Üstel amplifikasyon 2'ye, amplifikasyon verimliliği ise 1'e yaklaştıkça PZR reaksiyonunun mükemmelliği artar (86). Amplifikasyon verimi 1'e eşitse (=100%), reaksiyondaki kopya sayısı her döngüde ikiye katlanmış demektir.

Denklem 1.1: Üstel amplifikasyon: $10^{(-1/eğim)}$

Denklem 1.2: Verimlilik (E): $(10^{(-1/eğim)})-1$

Bu çalışmada kullanılan her primer seti için gerçekleştirilen üstel amplifikasyon hesaplamaları sonucunda, PZR reaksiyonlarının neredeyse mükemmel yakın bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Bu sebeple; PZR sonuçlarının değerlendirilmesi (kantitasyon), reaksiyon verimini hesaba katmayan yaklaşım metodu ile gerçekleştirilmiştir (Denklem 1.3.) (87).

Denklem 1.3. $R= 2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.2.3.4.3 Normalizasyon

Görelî kantitasyonun, yaklaşım metodu ile gerçekleştirilen analizinde normalizasyon basamağı mevcuttur ve bunun için farklı koşullarda dahi ifade düzeyi değişmediği bilinen (en az etkilenen) ve referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genlere ihtiyaç vardır (88).

Reaksiyon sonunda her örnek için ayrı ayrı elde edilen hedef genlerin ifade değerleri (eşik döngüsü; Ct); ilk önce referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin (*gapA*) her örnekteki ifade seviyelerine göre oranlanarak normalize edilmiştir. Bu işlem ile amaçlanan, izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarından kaynaklanan örnekler arası başlangıç farklılıklarını ve deneysel hataları normalize etmektir. Bu normalizasyon basamağı sonrasında elde edilen *marT* ifadesi teşvik edilmiş MZ1627 örneklerinin Ct değerleri, kontrol örneklerinin Ct değerleri ile normalize edilmiştir. Bu son normalizasyon, arabinozun *marT* ifadesi teşvik edilen MZ1627 örneklerinde araştırılan hedef genlerin ifadeleri üzerine olan etkisini çıkarmak için uygulanan bir yaklaşımdır (88).

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

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

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

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

Kontrol: Dt suşun Ct değerleri

Test: MarT üretimi indüklenmiş suşun Ct değerleri

Ct (threshold cycle-eşik döngüsü) değerleri, analiz sonunda elde edilen pik profilleri aracılığı ile belirlenmiştir. Yukarıdaki formülde “referans” için *gapA* geninin Ct değeri kullanılmıştır. “Kontrol” için indüklenmemiş doğal tip 14028 örnekleri kullanılırken, “test” için ise *marT* ifadesi teşvik edilmiş örneklerin Ct değerlerinden yararlanılmıştır.

4.2.3.4.4 Normalize edilen verilerinin istatistiksel analizi

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

4.2.4. Gen mutasyonlarının oluşturulması

Bakteriyofaj lambda'nın Red rekombinaz sistemi, çeşitli bakterilerin kromozomal genlerini inaktive etmek için kullanılan bir sistemdir. Yöntem, her iki ucunda da hedef lokusun bir bölgesi ile homoloji gösteren bölgeler içeren ve antibiyotik kaseti taşıyan bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürününün, lambda Red rekombinazı ifade eden bir suşa elektroporasyon yöntemi ile transformasyonunu içermektedir. Yöntemde, ilgilenilen hedefteki kromozomal bölge ile bahsedilen PZR ürünü arasında gerçekleşen homolog

bölge rekombinasyonu sonucu gen içerisine kanamisin gen kaseti sokularak mutasyon gerçekleşmektedir. PZR ürünü ve kromozom arasındaki en etkili rekombinasyon, lambda fajının Red operonunun indüksiyonu ile gerçekleşir. Red operonu, nükleaz inhibitörü olan Red γ (*gam*) ve homolog rekombinasyonu gerçekleştirecek bölge-spesifik rekombinazlar olan Red α (*exo*) ve Red β (*bet*)'yı kodlar (89).

Tez çalışması kapsamında, biyofilm üretimindeki rolünü araştırdığımız toplam 12 genin (*wzzB*, *fimA*, *rmbA*, *fidL*, *slsA*, *misL*, *fliA*, *fliC*, *dps*, *yliH*, *cheA*, *cheM*) Red rekombinaz sistemi temelli mutasyonları, “Quick & Easy *E.coli* Gene Deletion” kiti (K006) (GeneBridges, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.1. Homoloji bölgelerini içeren fonksiyonel kanamisin kasetinin eldesi

Araştırılan her bir gen için homolog bölgeler içeren PZR ürünlerinin eldesi, Çizelge 4.15.'te belirtilen hedef bölgelere özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primer dizaynı için Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programı kullanılmış ve tüm primerler, Heliks Biotek (Ankara,Türkiye) firması tarafından üretilmiştir. Liyofilize primerler kullanılmadan önce 100 μ M olacak şekilde ddH₂O ile sulandırılmış ve PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere 10 μ M'a seyreltilmiştir. Kit protokolünde belirlenen amplifikasyon basamakları takip edilerek PZR gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.16. ve Çizelge 4.17.).

Çizelge 4.15. Kanamisin kaseti ve ilgili genlere homolog bölgeler içeren primer dizileri. Primer çiftleri; kanamisin gen kasetinin 5' uçlarında mutasyon yaratmak istenilen genlere homolog 50'şer baz eklenerek dizayn edilmiştir.

Primer	Dizisi (5'-3')	Primer	Dizisi (5'-3')
fimA-f	CCGCTTTAGCTCTGCGTTTTCCGCATTATCGGAAGTGCTGGATAATCAGAAAT TAA CCCTCACTAAAGGGCGG	fimA-r	CCGCTTTAGCTCTGCGTTTTCCGCATTATCGGAAGTGCTGGATAATCAGAAATT AA CCCTCACTAAAGGGCGG
rmbA-f	TTGCAATGGGCTGACAGTCTGGCAGACAGTGGCATGCATATTGTCCTGATAAT TAACCCTCACTAAAGGGCGG	rmbA-r	TGCTTTTCAAATCCAGTAATTGGCCAGCGGAGTTAAACTTCTGTCAGAA TACGACTCACTATAGGGCTCG
fidL-f	CGCACTGGGGTGGTTTCCATCAGCGGAACATATTACGTCGATAATAAAATGA A TTAACCCTCACTAAAGGGCGG	fidL-r	TCTTTATTTTCACTCCATACATAGGAAACATCACGGCGGATCACGCCGCTTAC GACTCACTATAGGGCTCG
slsA-f	GCTGATTCCGGAAATCCATGCGAATGCGCCCCACGCGCAATATGTCGCGC AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	slsA-r	TACCGTTGTACAAAATCGGCATTATCCCAGGCATTAATTTCCCTTTACTACG ACTCACTATAGGGCTCG
MisL-f	CGTTGATTCTGCTGGGTGACGATGCAACTATCGAAACATCCGGCGCATCCAAT TAACCCTCACTAAAGGGCGG	MisL-r	TTGTTGCCAAGCTCGGTTCTGGAGGAGGATGCTGCGTAAATCCCCGAAGA TACGACTCACTATAGGGCTCG
fliA-f	GCGGTCGACCGATATGACGCTTTGCAAGGAACGGCATTACCACTTACGC AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	fliA-r	AATCGCGGCTGCGTAATTCATCCAGCATCGCCCCACGAATACGCTGCACTTAC GACTCACTATAGGGCTCG
fliC-f	ATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAACGGCGTGAAAGTCTCTGGC AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	fliC-r	TAGTTTACCCTCGTTGGCACCAACCTGGATGGTCAGGGTGTGTCTCTGCTAC GACTCACT
dps-f	ATGCGCGGTGCTAACTTTATTGCCGTTTCATGAGATGCTGGATGGCTTCCG AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	dps-r	GCTGTACGGCGCGCTCGGCCATAGTATCCAGATGATCGGTCAGTGC GG TATAC GACTCACTATAGGGCTCG
YliH-f	TGTCAGTCAGCGAAAGTGACACTCTGCGTGACAATTTTTTTGAACTGAAT AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	YliH-r	TCCTGATCGAGATGCAAGTCCCTGCCGTAAAGCGTGATCGTGGAGCTCGCGTAC GACTCACTATAGGGCTCG
CheA-f	GCAATCTGGCTACTCTGACGGATGTCGTTAAGGGGGCGGATTCAGTGTGCG AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	CheA-r	CAGAGCACCGCGACAATGTCATCTTCCGCGACGCTGCCATCCAGAGTTGCTAC GACTCACTATAGGGCTCG
CheM-f	TGTACCGCCAGACATTTGATCAAAGTGCTCATGACTACCGTTTTGCGCAA AATTAACCCTCACTAAAGGGCGG	CheM-r	ACCACCATCAAATCAGCACCAGCACGACCGCAAGAACCCCCAGTTGCCATA CGACTCACTATAGGGCTCG
WzzB-f	CCGCTTTAGCTCTGCGTTTTCCGCATTATCGGAAGTGCTGGATAATCAGAAAT TAA CCCTCACTAAAGGGCGG	WzzB-r	CAGCGCTGCCCTTTTACCGACTGTTCAATGGTAAGCTTTTCCCGCTCTTAAT ACGACTCACTATAGGGCTCG
*Kan-f	GATCGGCCATTGAACAAGAT	*Kan-r	TCGTCCTGCAGTTCATTACG

* Mutasyon doğruluğunu kontrol amacı ile gen bölgelerinde kanamisin gen kasetinin varlığını araştırabilmek için tasarlanan kanamisin kasetine özgü primer çiftleri.

Çizelge 4.16. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (C°)	Zaman (sn.)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	98	30	1
Denatürasyon	98	10	30
Bağlanma	60	30	
Uzama	72	90	
Uzama	72	600	1

Çizelge 4.17. Polimeraz zincir reaksiyonu (50 µl) içeriği

İçerik	µl
dH ₂ O	31.5
5 x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA)	10
dNTP (10 mM) (Fermentas, England)	1
İleri (F) primer (10 µM)	1
Geri (R) primer (10 µM)	1
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	4
Go Taq DNA Polimeraz (5 U/µl) (Promega, USA)	0.5
FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kalıp DNA (50 ng/µl)*	1

* GeneBridges “Quick & Easy *E.coli* Gene Deletion” kitinden sağlandı.

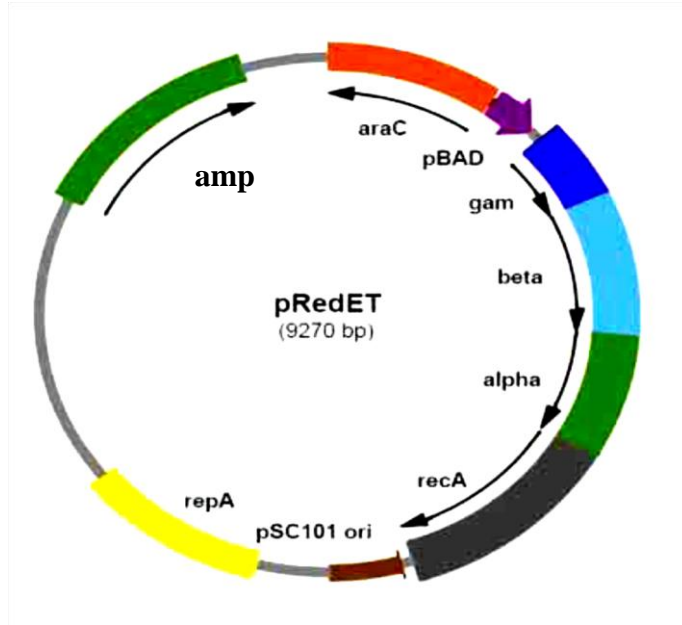
4.2.4.2. Doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşuna pRed/ET ifade plazmidinin transformasyonu

Bakteriyofaj lambda Red rekombinaz sistemi kullanılarak yaratılacak mutasyonun ikinci basamağı, “Quick & Easy *E.coli* Gene Deletion” kiti (K006) içerisinde gelen ve homolog rekombinasyonu üzerinde taşıdığı Red operonunun indüklenmesi ile sağlayacak olan pRED/ET_{amp} plazmidinin (Şekil 4.4.) elektroporasyon ile doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşuna aktarımıdır.

Bakteriyel elektroporasyonun yapılabilmesi için hücrelerin elektroporasyona uygun kompetan hücreler haline getirilmesi gerekmektedir. Kullanılacak kompetan suşun yeni hazırlanmış olması, elektroporasyonun başarısı açısından önemlidir. Bu amaçla *S. Typhimurium* 14028 suşu, LB sıvı (5mL) besiyerine % 1 oranında aktararak 37 °C’de ve 200 rpm çalkalama hızında 18 saat süresince üretilmiştir. Aktif kültürden alınan 30 µl, 1.4 mL LB ortamına inoküle edilerek OD₅₉₅ nm’deki bakteri bulanıklığı 0.4-0.6 oranına ulaşıncaya kadar (yaklaşık 3 saat) 37 °C’ de ve 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu zaman zarfında kompetan hücre oluşturmada kullanılacak olan ddH₂O buz üstünde soğutulmuştur. Hücreler 11000 rpm’de 30 sn. santrifüj sonucu (+2 °C) çöktürülmüş ve soğutulmuş 1 mL steril ddH₂O ile çözülmüştür. Hücre süspansiyonu tekrar santrifüj edilerek aynı işlemler uygulanmıştır. Son santrifüj uygulamasının ardından hücre süspansiyonu 20-30 µl soğuk steril ddH₂O içerisinde çözülerek bir sonraki işleme kadar buz üstünde bekletilmiştir (90).

Kompetan hücrelere transforme edilmek istenen pRED/ET_{amp} plazmidinden (20 µg/µl) 1 µl alınarak, bir önceki basamaktan elde edilen 30 µl kompetan hücre ile karıştırılmıştır. Bu işlemlerin tamamının buzun üzerinde yapılmasına özen gösterilmiştir. Bu karışım, daha önce buz banyosunda soğutulmuş elektroporasyon (Thermo Electron Corporation, Ohio) kuvvetlerine (0,1 cm) aktarılmış ve 1800 Volt sabit zamanlı akım ile elektroporasyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonunda hücreler 1 mL antibiyotiksiz LB sıvı ortamına alınarak 30 °C’de 70 dk. süresince 200 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak, ampisilin (50 µg/mL) içeren seçici LB agar besiyerine drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yapılmıştır. Bu

ortamlar en az 15 saat 30 °C’de inkübe edilmiş ve gelişen koloniler steril koşullarda alınmak suretiyle transformantlar seçilmiştir.



Şekil 4.4. pRED/ET plazmid vektörünün genetik haritası (90).

4.2.4.3. Kanamisin gen kaseti insersiyonu ile gen spesifik mutasyonların oluşturulması

Bu aşamada pRED/ET_{amp} plazmidini taşıyan doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu, ampisilin (50 µg/mL) içeren LB sıvı (5mL) ortamına % 1 oranında inoküle edilerek 30 °C’ de ve 200 rpm çalkalama hızında 18 saat üretilmiştir. Aktif kültürden 30 µl alınarak aynı antibiyotiği içeren 1,4 mL LB ortamına ekim yapılmış ve OD₅₉₅=0,3 oranına ulaşincaya kadar (yaklaşık 2 saat) 30 °C’ de ve 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona tabi tutulmuştur. İstenilen hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra % 10 L-arabinoz çözeltisinden 50 µl (son konsantrasyonu yaklaşık % 0.3-0.4 olacak şekilde) alınarak üreme ortamına ilave edilmiş ve 37 °C’de 45-60 dk. 200 rpm çalkalama hızında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu süre zarfında eklenen arabinoz, Red operonunu indükleyerek rekombinasyon proteinlerinin ifadesini sağlamıştır. İnkübasyonun ardından elektrokompentan hücrelerin hazırlanması işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bir sonraki aşamada, rekombinasyon proteinlerinin ifadesi teşvik edilen hücelere istenilen gen bölgelerini mutasyona uğratabilecek PZR ürünlerinin transformasyonuna geçilmiştir. Bu amaçla, kit protokolü izlenerek transformasyonu yapılacak olan PZR ürünlerinden, 400-800 ng alınarak 30 µL elektrokompentan hücre ile karıştırılmış ve elektroporasyon basamağı daha önceden anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon sonrasında hücreler 1 mL antibiyotiksiz LB ortamına alınarak homolog rekombinasyonun gerçekleşmesi için 37 °C’de 3 saat (200 rpm çalkalama hızında) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücre süspansiyonu 9000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üst sıvının 900 µl’si uzaklaştırılmış, kalan 100 µl’de hücre çökeltisi çözdürülerek kanamisin (15 µg/mL) içeren seçici LB agar besiyerine drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yapılmıştır. Bu ortamlar 37 °C’de 15 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ortam sıcaklığı 37 °C’ye yükseltilerek pRED/ET_{amp} plazmidinin hücrelerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kanamisin kasetini içine alarak kanamisin direnci geliştiren ve bize mutasyonun varlığını gösteren elektrotransformantlar seçilerek antibiyotikli besi ortamlarına alınmıştır.

4.2.4.4. Transformantlarda kanamisin kasetinin varlığının PZR ile doğrulanması

Kanamisinli katı besiyerinde üreyen kolonilerin, kanamisin kaset genini taşıyıp taşımadığının tespiti için, transformasyon sonrası besiyerinde oluşan her bir bakteri kolonisinin bir kısmı steril kürdan yardımıyla PZR tüplerine alındıktan sonra 5 µl ddH₂O içerisinde süspanse edilmiş ve 100 °C’de 5 dk. inkübasyonun ardından PZR çalışmasında kullanılacak kalıp DNA elde edilmiştir. Süspansiyon sonrası geriye kalan koloniden kürdanla kanamisinli katı besiyerine nokta ekim yapılmıştır. Böylece istenilen mutasyonu içeren kolonilerin devamlılığı sağlanmıştır. Kalıp DNA’ların üzerine, 45 µl PZR karışımı (Çizelge 4.18.) eklenmiştir.

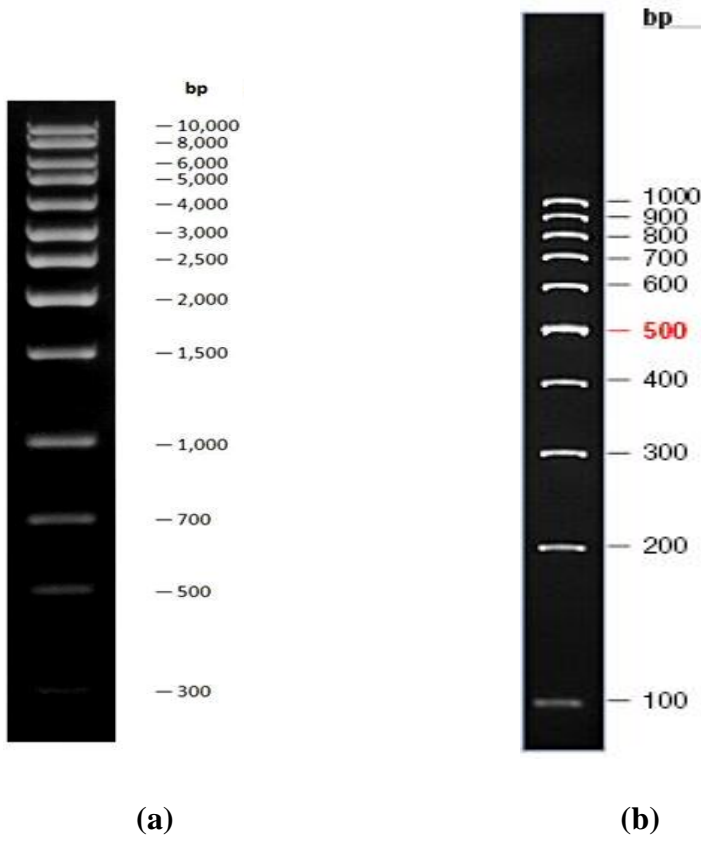
Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları sırası ile; 98 °C’de 30 sn. ön ısıtma, 98 °C’de 10 sn. ayrılma, 60 °C’de 30 sn. primer bağlanması, 72 °C’de 90 sn. uzama olacak şekilde 30 döngü olarak düzenlenmiştir. PZR ürünleri % 1,5’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. İstenilen 1800 bp’lik bölgede bant görülmesi sonucunda gen kasetini içine alan koloniler belirlenerek – 20 °C ve – 80 °C stokları hazırlanmıştır.

Çizelge 4.18. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı (50 µl) içeriği

İçerik	µl
dH ₂ O	31.5
5 x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA)	10
dNTP (10 mM) (Fermentas, England)	1
İleri (F) primer (10 µM)	1
Geri (R) primer (10 µM)	1
MgCl ₂ (25 mM) (Promega, USA)	4
Go Taq DNA Polimeraz (5 U/µl) (Promega,USA)	0.5

4.2.4.5. Agaroz jel elektroforezi

Saflaştırılan nükleik asitlerin kontrolü, TAE (Tris – Asetik Asit – EDTA) tamponu (Çizelge 4.8.) ile hazırlanan %1' lik agaroz jelde, 100 V sabit elektrik akımında 1 saat süreyle örneklerin elektroforez işlemine tabi tutulması sureti ile yapılmıştır. Elektroforez işlemi sonrasında DNA bantları, 0.2 µg/mL etityum bromit (Sigma Chem. Co., USA) içeren tampon içerisinde 30 dakika boyanmıştır. Boyama işlemi bitiminde jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışıkta incelenmiş ve Syngene GeneGenius Gel Imaging System kullanılarak fotoğrafları alınmıştır. Moleküler büyüklük tespiti, 1 kb moleküler DNA standartı (Solis BioDyne, Estonia) ve 100 bp moleküler DNA standartı (Fermentas, England) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. 1 kb'lık (a) ve 100 bç'lik (b) DNA standartlarının % 1 agaroz jel göç planı

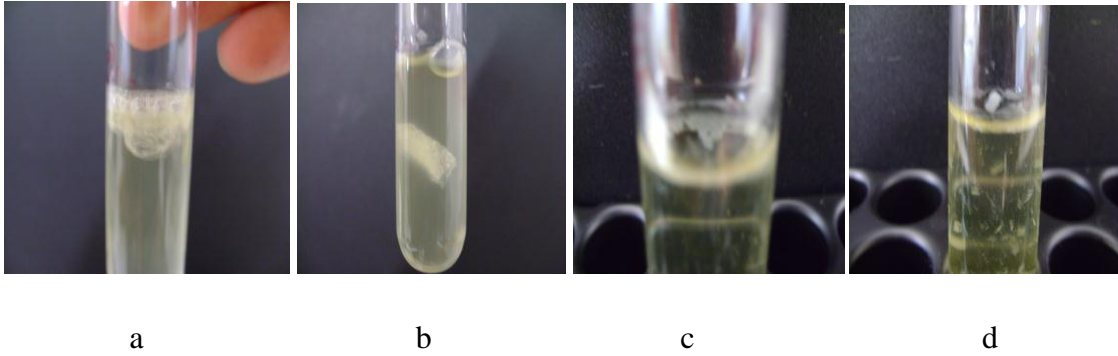
4.2.5. Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde *Salmonella* suşlarının biyofilm morfoloju belirlenmesi

Doğal tip 14028 suşu ve tüm mutant suşlar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş (% 1) ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokulumlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB sıvı ortamlarına aktarılmış ve suşlar $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (77). Bu ortamlardan kongo kırmızısı ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) ve Coomassie brilliant blue ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) boyalarını içeren NaCl'siz LB agar (LB agar woNaCl) besiyerlerine 10'ar μl damlatılmış ve $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 8 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur (78). Tüm plaklar stereo mikroskopta (Leica, Germany) ve çıplak gözle morfolojik açıdan incelenmiştir. Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.6. Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu

Bu denemede, kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar besiyerlerinde morfoloji analizi yapılan *Salmonella* suşlarının, sıvı-hava arafazında pelikül oluşturma özellikleri araştırılmıştır (Şekil 4.6.). Suşlar 5 mL'lik NaCl'siz LB sıvı besiyerlerinde 18 saat süresince 37 °C'de çalkalamalı koşullarda geliştirilmiştir. Sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumlarını gözlemek amacıyla 4,5 mL NaCl'siz LB sıvı besiyerlerine aktif kültürden 0,5 mL inoküle edilmiş ve test tüpleri 20 °C'de statik koşullarda 8 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 8 günün sonunda test tüpleri, pelikül oluşumlarının yanı sıra, pelikülün elastik, kırılabilir ve rijit özellik göstermesine, sıvı-hava arafazında oluşan halka yapılarına, besiyerinin bulanıklığı ve tüp tabanında çökelti birikimi gibi bazı değişimlere göre değerlendirilmiştir (63,64).

Yapısal incelemelerin daha kolay yapılabilmesi açısından aynı deney, bakterilerin kalkoflor içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl'siz LB besiyerlerinde üretilmesi suretiyle de tekrarlanmıştır.



Şekil 4.6. a. Rdar morfolojisine özgü sıvı-hava arafazında gözlenen pelikül yapısı, b. Aynı pelikülün karıştırıldıktan sonra dağılmadan kalan yapısı, c. Bdar morfolojisine özgü sıvı-hava arafazında gözlenen pelikül yapısı, d. Aynı pelikülün karıştırıldıktan sonra dağılan yapısı

4.2.7. Kalkoflor bağlanma uygulaması

Bu denemede bakteri kültürlerinden, selülöz indikatörü olan kalkofloru içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl'siz LB agar besiyerine damlatma ekim yapılmış ve bu ortamlar 20 °C'de 8 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Ortamlar selülöz üretimlerinin araştırılması amacı ile 366 nm UV ışık altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 366 nm UV ışık altında floresan özellik gösteren örnekler selülöz üretimi bakımından pozitif, göstermeyenlerse selülöz üretimi bakımından negatif olarak belirlenmiştir (82). Negatif kontrol olarak bdar morfotipi sergileyen DMC12 suşu kullanılmıştır.

4.2.8. Doğal ve *marT* ifadesi teşvik edilen mutant suşların farklı yüzeylerde biyofilm üretme potansiyellerinin karşılaştırması

Çalışmalarda, 2.5/0.8/0.1 cm AISI 304 paslanmaz çelik kuponlar (Ostim, Ankara), 18 mm'lik cam slaytlar (Deckglaser Cover glasses) ve düz tabanlı 24 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plakları kullanılmıştır. Çelik kuponlar denemelerde kullanılmadan önce, yarım saat aseton içerisinde bekletilerek yağdan arındırılmış ve sonrasında 1 saat süresince 1 N NaOH solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. En son deterjanlı su ile kupon yüzeyleri ajite edilerek yıkanmıştır. Kuponlar, bu aşamadan sonra bir kez musluk suyu ve üç kez de distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Son basamakta kuponlar 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmişlerdir (91). Çelik kuponlar 3.5 mL NaCl'siz LB sıvı besiyeri içeren cam tüplere konulmuş ve 121 °C'de 15 dakika sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan cam slaytlar ise 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve çalışma gününde 4 mL NaCl'siz LB sıvı içeren 5 cm'lik cam petriyer içersine aktarılmıştır.

Denemelerde kullanılan doğal ve mutant suşlar NaCl içermeyen 5 mL'lik LB sıvı (LBwo/NaCl) ortamlarında 37 °C'de çalkalamalı koşullarda 18 saat üretilmiştir. Bu kültürlerden LBwo/NaCl besiyerine ekim yapılarak, doğal suşlar için (14028, LT2 ve SL1344) OD₅₉₅=0,4, mutant suş (MZ1627) için ise OD₅₉₅=0,2 düzeyine gelene kadar inkübasyona devam edilmiştir. MZ1627 suşu, L-arabinoz ile yarım saat indüklenerek MarT üretimi teşvik edilmiş ve OD'si 0,4'e ayarlanmıştır. OD₅₉₅=0,4 olan bu süspansiyonlardan 1 mL alınarak paslanmaz çelik kupon bulduran besiyerlerine, 1,2 mL alınarak cam

slâytları içeren besiyerlerine ve 240 µl alınarak içerisinde 800 µl NaCl'siz LB sıvı besiyeri içeren mikrodilüsyon plaklarının kuyularına inoküle edilmiştir. İnokulumları içeren tüm besiyerleri 2 gün boyunca 20 °C'de statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak yalnızca çelik kupon veya cam slayt bulunduran test tüpleri aynı koşullarda inkübe edilmiştir.

İkinci günün sonunda paslanmaz çelik kuponlar ve cam slaytlar, aseptik koşullarda test tüplerinden alınmış ve boş steril tüplere aktarılıp iki kez 5 mL'lik steril su ile yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından çelik kuponlar ve cam slaytlar 3 mL steril PBS içeren tüplere aktarılmıştır. Tüpler cam ve çelik yüzeylerde oluşan biyofilm yapısı, 130 watt 20 kHz 50 amp'da 3 dakika boyunca sonikasyona (Vibra Cell Sonikatör VCX130, USA) tabi tutulmuştur (92). Polistiren kuyuları da aynı şekilde steril su ile yıkanmış ve içerisine 1 mL steril PBS konarak aynı koşullarda sonike edilmiştir.

Bakteri sayımları için sonikasyon aşamasından sonra seri dilüsyonlar yapılmış ve her bir dilüsyondan 10'ar µl alınarak LB içeren agar ortamlarına damlatma ekim yapılmıştır (93). Bir gece 37 °C'de inkübasyonun ardından agar ortamlarında gelişen kolonilerin sayımı aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır. Denemeler, 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre sayımı sonuçları, yüzey alanı (cm²) başına düşen koloni oluşturan birim (kob) olarak değerlendirilmiştir.

$$\text{LOG (kob cm}^{-2}\text{)} = \text{LOG [C / V (n}_1\text{+0.1 x n}_2\text{) x d]}$$

C: sayımı yapılan tüm petrilerdeki koloni sayısı toplamı

V: sayımı yapılan petriye aktarılan hacim (mL)

n₁: ilk seyreltiden yapılan sayımlarda sayımı yapılan petri adedi

n₂: ikinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayımı yapılan petri adedi

d: sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanının seyreltme oranı

4.2.9. İstatistiksel analizler

Deney sonuçlarından elde edilen veriler, SPSS 13,0 istatistik programında değerlendirilmiştir. Her veri seti için uygun istatistiksel analiz yöntemleri (One-Way ANOVA, bağımsız T testi, Mann Whitney U Testi, Tukey, Dunnett) seçilerek uygulanmıştır.

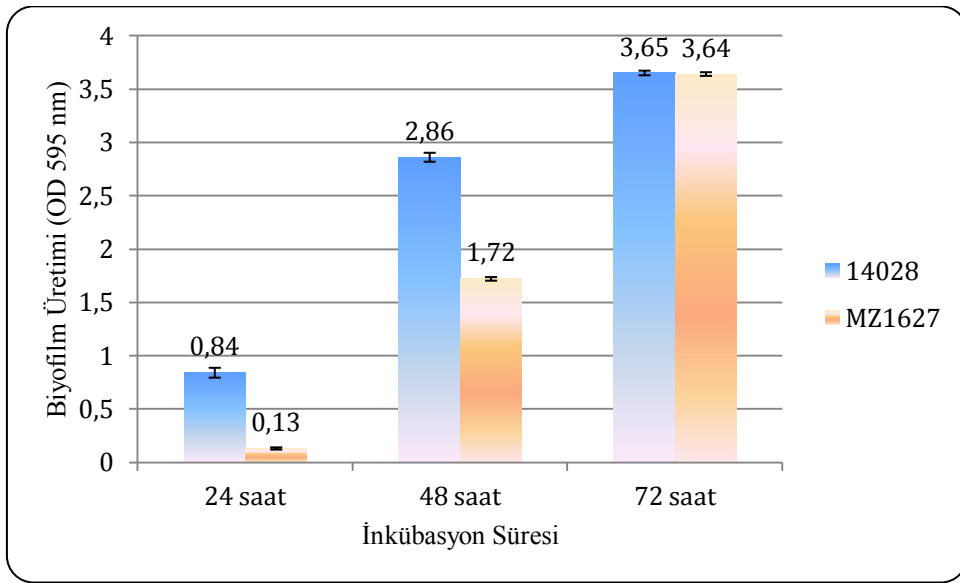
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. *S. Typhimurium*'da *marT* Geninin Biyofilm Üretimi Üzerine Etkisi

S. Typhimurium'da *marT* geninin biyofilm üretimi üzerine etkisinin saptanması amacı ile yürütülen çalışmaların ilk aşamasında, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve mutantlarında [(*S. Typhimurium* MZ1627: kromozomal *marT* geni kanamisin kaseti insersiyonu yolu ile bozulmuş, ancak arabinoz tarafından indüklenen bir promotörün (BAD) alt akış yönüne rekombine edilen *marT* genine sahip pBAD plazmidi aktarılmış 14028 mutanı ve MZ1629 : *marT* geni içermeyen pBAD plazmidine sahip 14028 mutanı)] biyofilm üretimi denemelerinde kullanılacak optimum pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi saptanmıştır. Tüm bu çalışmalarda besiyeri olarak NaCl içermeyen Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri kullanılmış ve biyofilm tutunması polistiren yüzeylerde gerçekleştirilmiştir. *Salmonella*'da biyofilm üretimi amacıyla yürütülen çalışmalarda NaCl içermeyen LB ortamı, genel kullanımı olan bir besiyeridir. Ortamda NaCl bulunmamasının ana nedeni, bu bileşenin varlığında artan ozmolaritenin, *Salmonella* biyofilmlerinin ana bileşenlerinden biri olan kıvrımlı fimbriya (ince agregatif fimbriya ya da curli fimbriya) sentez genlerinin transkripsiyonunu baskılamasıdır (77,79,94,95). Bu denemeler sonucu, doğal suş ve mutantlar için tanımlanan etkin parametrelerde *marT* geninin ifade düzeyine bağlı biyofilm üretimindeki farklanmalar incelenerek, bu genin biyofilm üretimi üzerinde bir etkinlik gösterip göstermediği saptanmıştır.

Biyofilm üretimi için kullanılacak inkübasyon süresinin tespitinde temel amacımız, *marT* geninin arabinoz ile indüklenmesi sonucunda üretilen MarT proteininin biyolojik etkinliğini sürdürebildiği zamanın belirlenmesidir. Zira arabinoz vasıtası ile indüklenen *marT* promotörü, arabinozun ortamda tükenmesi sonucunda transkripsiyon aktivitesini yitirmektedir. Ortamdaki MarT proteinleri ise indüksiyonun ortadan kalkmasından sonra yarılanma ömürlerine bağlı olarak parçalanmaktadır. Bu durumun gerçekleştiği zaman, MarT proteininin biyolojik etkinliğinin ortadan kalktığı anı tanımlamaktadır. İndüksiyon ortamında MarT proteininin biyolojik etkinliğini sürdürebildiği ideal zamanın belirlenmesi amacı ile, Luria- Bertani (LB) sıvı besiyeri ilave edilen mikrodilüsyon plakları kullanılmıştır. Denenen üç farklı inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) için ortam pH'sı (pH 7.0) ve inkübasyon sıcaklığı (20 °C) sabit tutulmuştur. Zira pH 7.0 ve 20 °C, *Salmonella* suşlarında biyofilm üretimi için büyük oranda benzerlik gösteren optimal

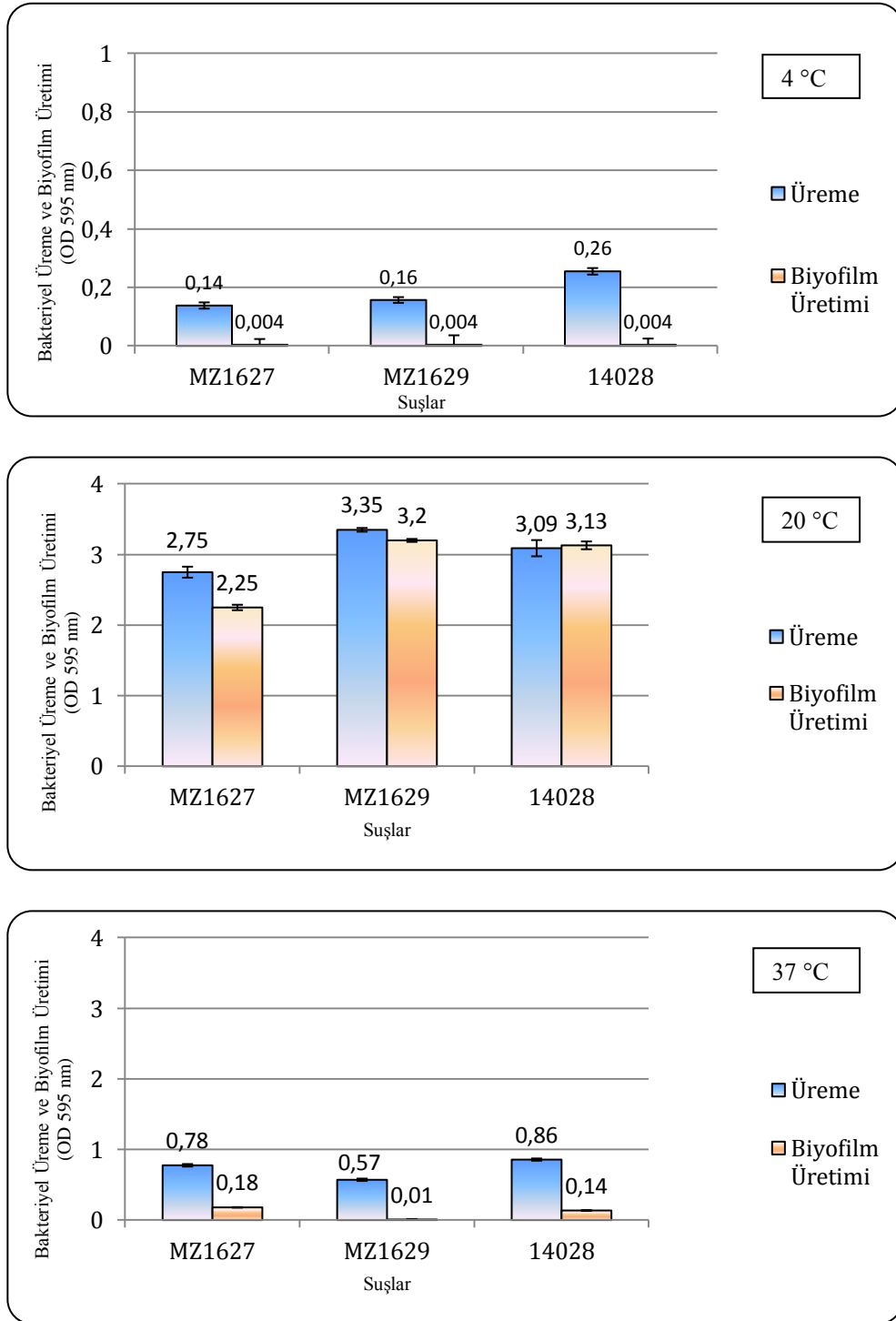
değerlerdir (77,94). Bu sabit ortam pH'sı ve inkübasyon sıcaklığında, çalışmamızda kullanılacak en kritik parametre olan inkübasyon süresini belirledikten sonra, söz konusu pH ve sıcaklık değerinin doğal suş ve mutantlarımız için de optimal olup olmadığı kontrol edilmiştir. Yukarıda tanımlanan ideal inkübasyon süresinin tespitini esas alan denemeler sonucunda, bu zaman dilimi 48 saat olarak belirlenmiştir. Zira doğal suş (*S. Typhimurium* 14028) ile *marT* geni ifadesi indüklenen mutant (MZ1627) suş arasında biyofilm üretimi açısından en yüksek düzeyde farklanma 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin 72. saate uzatılması sonucunda ise biyofilm üretimi açısından, doğal suş ve mutantta söz konusu farklılık ortadan kalkmıştır (Şekil 5.1.).



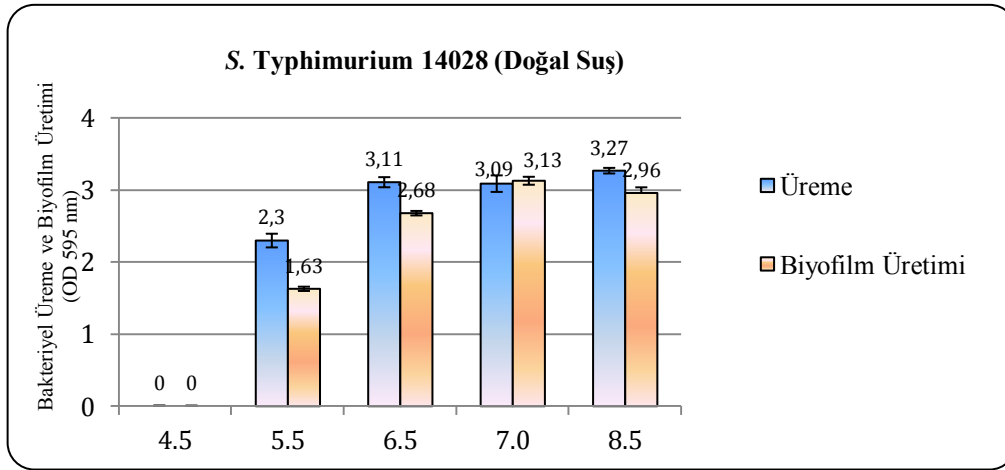
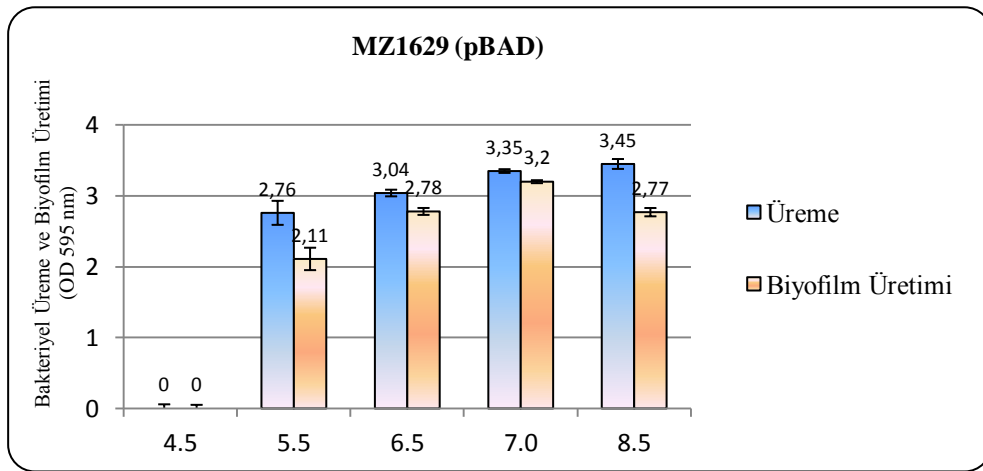
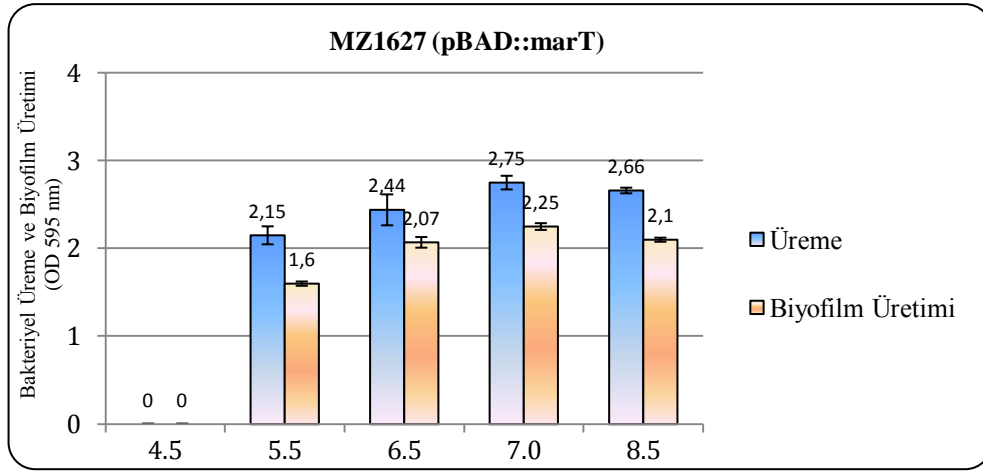
Şekil 5.1. *S. Typhimurium* doğal suşu (14028) ve *marT* geni indüklenmiş mutantında (MZ1627) biyofilm üretiminin inkübasyon süresine bağlı değişimi. (Ortam pH 7.0, inkübasyon sıcaklığı 20 °C). Barlar, ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Biyofilm üretimi çalışmalarında esas alınacak inkübasyon süresi tespit edilirken kullanılan 20 °C inkübasyon sıcaklığı ve pH 7.0 değerlerinin bizim çalışmamızda kullanılan doğal suşta (14028) ve mutantta (MZ1627) biyofilm üretimi için optimum olup olmadığı, yine NaCl ilave edilmeyen LB sıvı besiyeri içeren polistiren mikrodilüsyon plaklarında ideal inkübasyon süresi (48 saat) sonunda belirlenmiştir. Bu çalışmalarda ayrıca bakteriyel üremenin biyofilm oluşumu ile ilişkisi de tespit edilmiştir. Bu denemelerde bakteriyel üreme kristal viyole ile boyama yapılmaksızın Elisa okuyucuda OD 595 değerinde ölçülmüştür. Üç farklı inkübasyon sıcaklığının (4 °C, 20 °C ve 37 °C) ve 5 farklı pH değerinin (pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.0, ve 8.5) kullanıldığı denemelerde, doğal suş ve mutantlarda

ideal biyofilm üretiminin 20 °C’de ve pH 7.0’de gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 5.2. ve Şekil 5.3.).



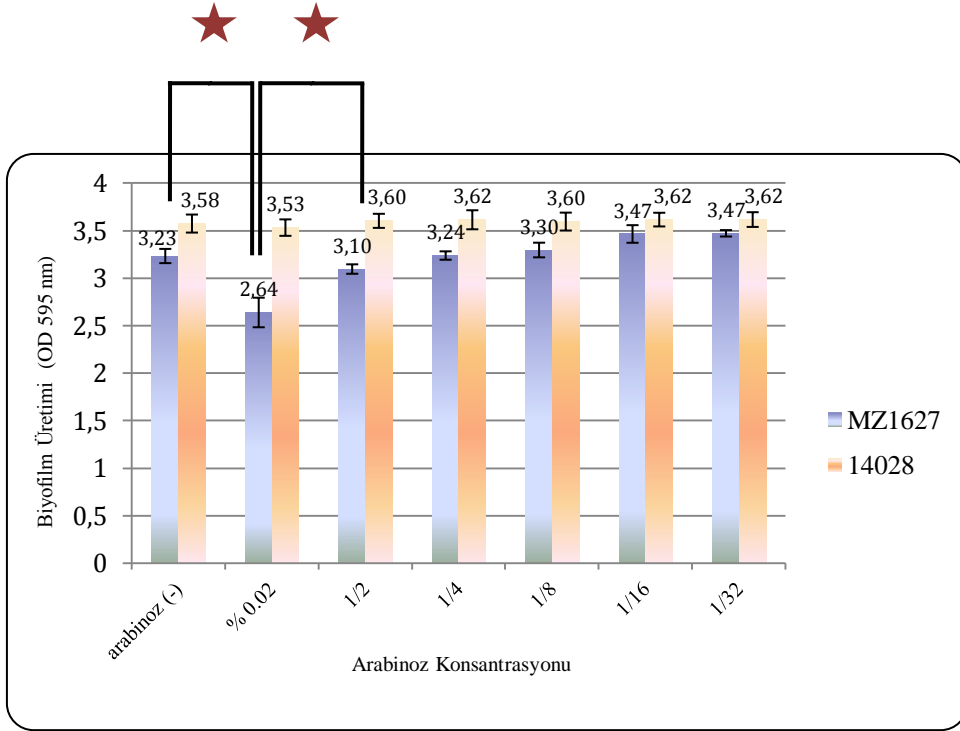
Şekil 5.2. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının bakteriyel üreme ve biyofilm üretimi üzerine etkisi. Barlar, ortalamanın standart sapmasını göstermektedir.



Şekil 5.3. Ortam pH'sının bakteriyel üreme ve biyofilm üretimi üzerine etkisi. Barlar, ortalamasının standart sapmasını göstermektedir.

Bu sonuçlar, biyofilm üretimi çalışmalarında esas alacağımız inkübasyon süresinin tespitinde literatür verilerinden yararlanarak seçtiğimiz optimum pH ve sıcaklık değerlerinin, araştırmamızda kullanılan suş ve mutantlar için de geçerli olduğunu kanıtlamıştır. Diğer yandan hem pH ve hem de sıcaklık denemeleri, biyofilm üretimi ile bakteriyel üreme arasında doğrusal bir ilişkiden söz etmenin mümkün olmadığını göstermektedir.

marT geninin ifadesinin % 0.02 düzeyinde arabinoz kullanımı ile indüklendiği mutant suşta 24. ve 48. saatler sonunda (pH 7.0 ve 20 °C) biyofilm üretiminin, doğal suşa oranla istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde düştüğünün belirlenmesi, *marT* geninin *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerinde negatif bir regülasyon etkisi gösterdiğini kanıtlamıştır. Bu aşamadan sonra *marT* ifade düzeyinin biyofilm üretimi üzerinde etkili olup olmadığının belirlenmesi denemelerine geçilmiştir. Bu denemelerde, mutant suşta *marT* geni ifadesi, %0.02 arabinoz konsantrasyonundan başlayarak ve her aşamada bu konsantrasyon ½ oranında düşürülerek azaltılmıştır (16 32). Bu denemelerde *marT* ifadesinin artışına bağlı olarak, mutant suşta (MZ1627) biyofilm üretiminin düştüğü ve bu düşüşün % 0.01 ve %0.02 arabinoz konsantrasyonunda, doğal suşa oranla sırasıyla %25 ve % 18.3 oranlarında gerçekleştiği saptanmıştır. İstatistiki analizler, en yüksek *marT* geni ifadesinin sağlandığı iki arabinoz konsantrasyonunda (% 0.02 ve % 0.01) mutant suşta biyofilm üretiminde meydana gelen düşüşlerin, *marT* geni ifadesinden kaynaklandığını doğrulamıştır. Zira, doğal suşta (14028) arabinoz konsantrasyonuna bağlı olarak biyofilm üretiminde istatistiki açıdan anlamlı bir farklanma meydana gelmemiştir (Şekil 5.4.). Tüm bu veriler *S. Typhimurium*'da *marT* geninin biyofilm üretimi üzerindeki negatif regülasyon etkisinin, söz konusu genin ifade düzeyi ile doğrudan ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır.

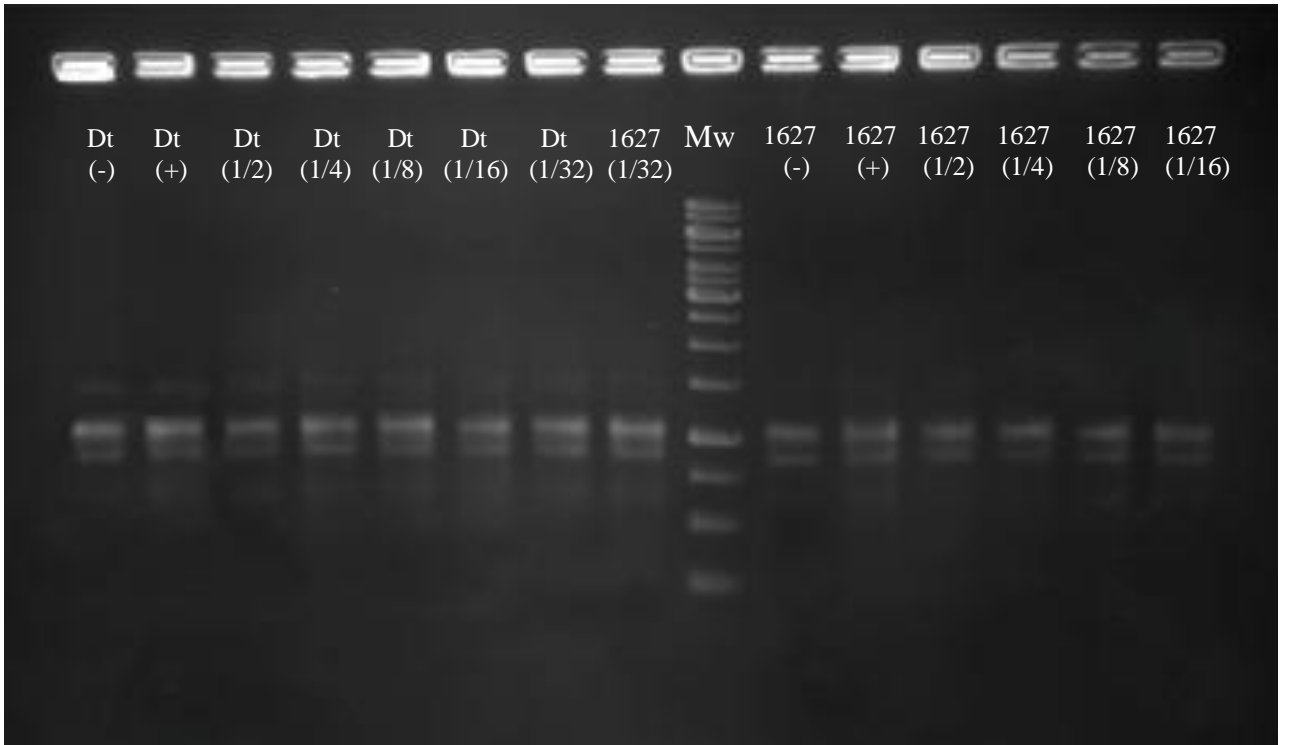


Şekil 5.4. Farklı arabinoz konsantrasyonlarına bağlı olarak gerçekleştirilen *marT* geni ifadesinin biyofilm üretimi üzerine etkisi. Yıldızlar, istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren arabinoz konsantrasyonlarını belirtmektedir. Barlar, ortalamanın standart sapmasını göstermektedir.

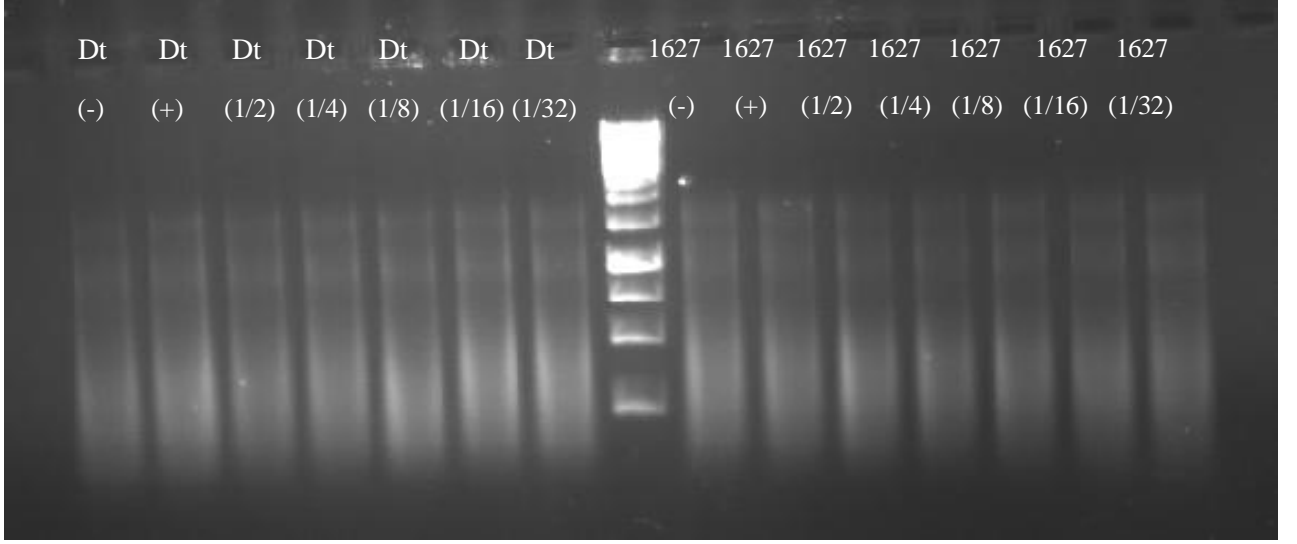
5.2. S. Typhimurium'da *marT* Geninin Regülasyon Karakteristiklerinin Belirlenmesi

S. Typhimurium'da *marT* geni ifadesinin biyofilm üretimi üzerine negatif bir etkiye sahip olduğunun belirlenmesi, bu genin regüle ettiği diğer özelliklerin tespitini zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla yürütülen kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) çalışmalarında, Akkoç (2011) tarafından gerçekleştirilen mikrodizin bulguları esas alınmıştır (13). Zira söz konusu mikrodizin denemelerinde; *marT* geni ifadesine bağlı olarak biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilebilecek *fliC*, *cheM*, *dps*, *slsA*, *wzzB*, *rmbA*, *fliA*, *cheA*, *yliH*, *fidL* ve *marT* genlerinin ifadelerinde farklanmaların meydana geldiği saptanmıştır. Bu sonuçların gerçekliği, yukarıda ifade edilen genlerin ifadelerinin *marT* ifadesine bağlı değişimlerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelenmesi sonucu test edilmiştir. Denemelere *marT* gen ifadesinin fimbriya regülasyonu üzerine olan etkisi ile ilgili fikir sahibi olabilmek adına fimbriyanın major yapısal alt ünitesini kodlayan

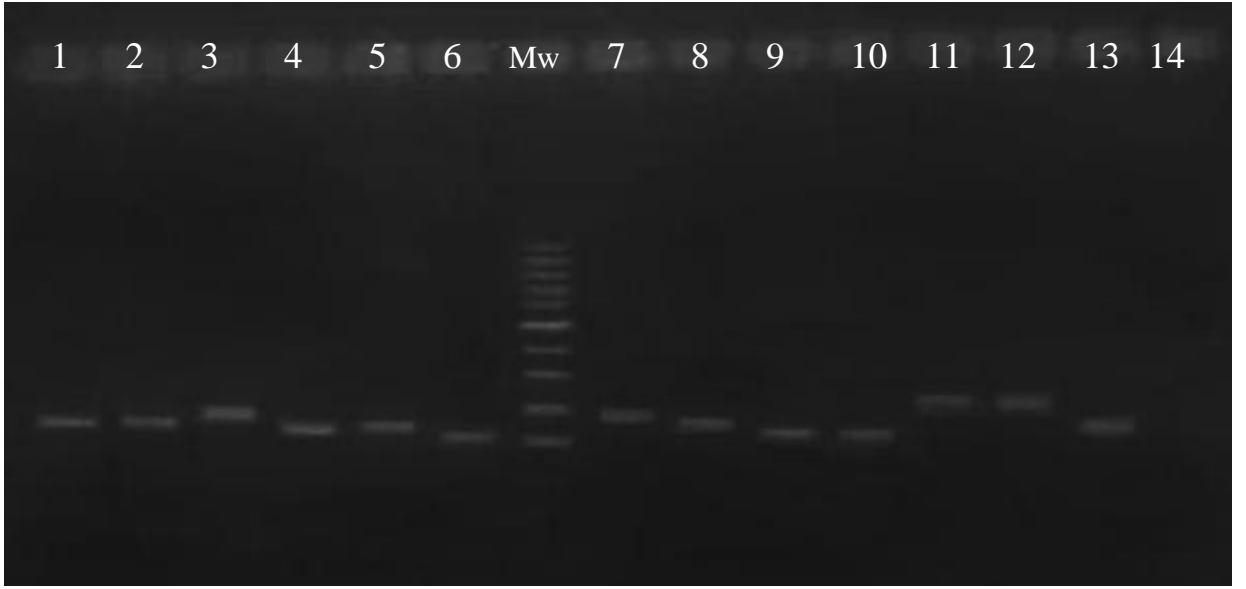
fimA geni de ilave edilmiştir. qRT-PZR denemelerini gerçekleştirebilmek için ilk aşamada denemeye alınan tüm bakteri örneklerinden RNA izolasyonları yapılarak saflıkları agaroz jelde kontrol edilmiş (Şekil 5.5.) ve ND 1000 spektrofotometre (Nanodrop, USA) aracılığı ile miktar tayinleri yapılmıştır (EK-1). Daha sonra, bu RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmıştır (Şekil 5.6.). Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılacak her bir gen spesifik primer çiftinin optimizasyonu ayrı ayrı gerçekleştirilmiş ve sonuçta optimum PZR koşulları için gerekli Tm sıcaklıkları, primer konsantrasyonları, döngü sayısı ve DNA miktarları saptanmıştır (Şekil 5.7.).



Şekil 5.5. Saflaştırılan RNA'ların % 0,8'lik agaroz jel görüntüsü. Dt: Doğal tip (14028)



Şekil 5.6. cDNAların %1'lik agaroz jel görüntüsü. Dt: Doğal tip (14028)

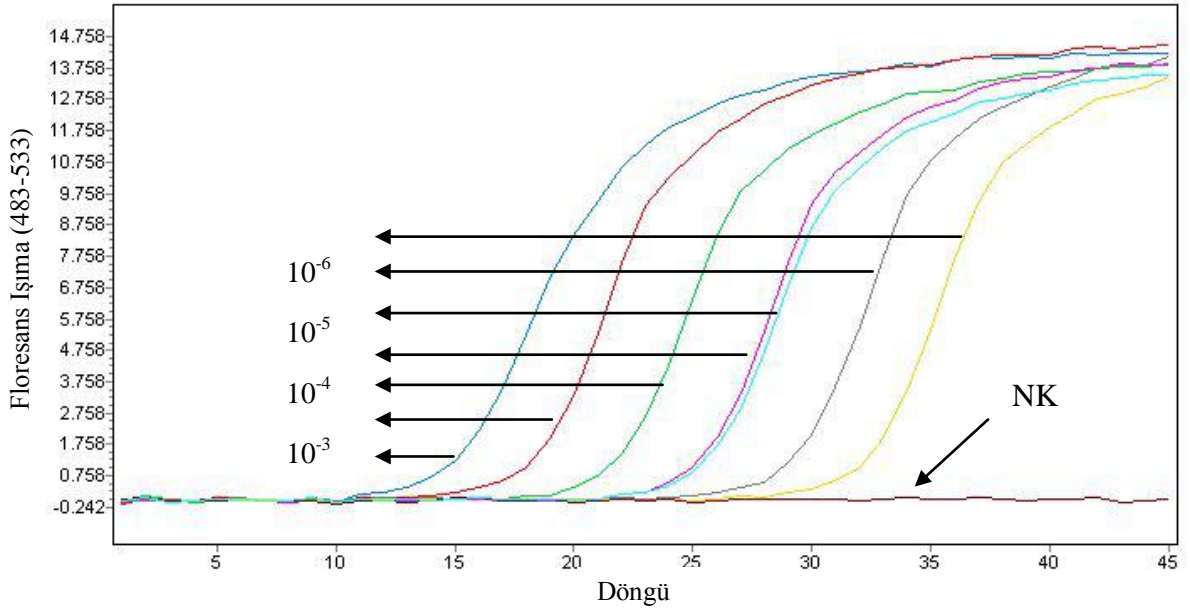


Şekil 5.7. Optimize koşullarda her bir primer çifti için gerçekleştirilen PZR denemelerine ait jel görüntüsü. Kuyu 1- *misL* (161 bç); kuyu 2- *fliC* (165 bç); kuyu 3- *cheM* (176 bç); kuyu 4- *dps* (137 bç); kuyu 5- *sIsA* (154 bç); kuyu 6- *wzzB* (113 bç); kuyu 7- *rmbA* (183 bç); kuyu 8- *fliA* (125 bç); kuyu 9- *cheA* (116 bç); kuyu 10- *yliH* (122 bç); kuyu 11- *fidL*(194 bç); kuyu 12- *marT* (193 bç); kuyu 13- *fimA* (181 bç); kuyu 14- Negatif Kontrol

Optimize edilen koşullarda gerçekleştirilen qRT-PZR denemelerinin sonuçlarının analizinde kullanılacak kantifikasyon stratejisine karar verebilmek için, PZR reaksiyonlarının amplifikasyon verimlilikleri belirlenmiştir. Bunun için arabinoz ile indüklenmemiş doğal tip 14028 normal suşunun cDNA'sı kalibratör örnek olarak

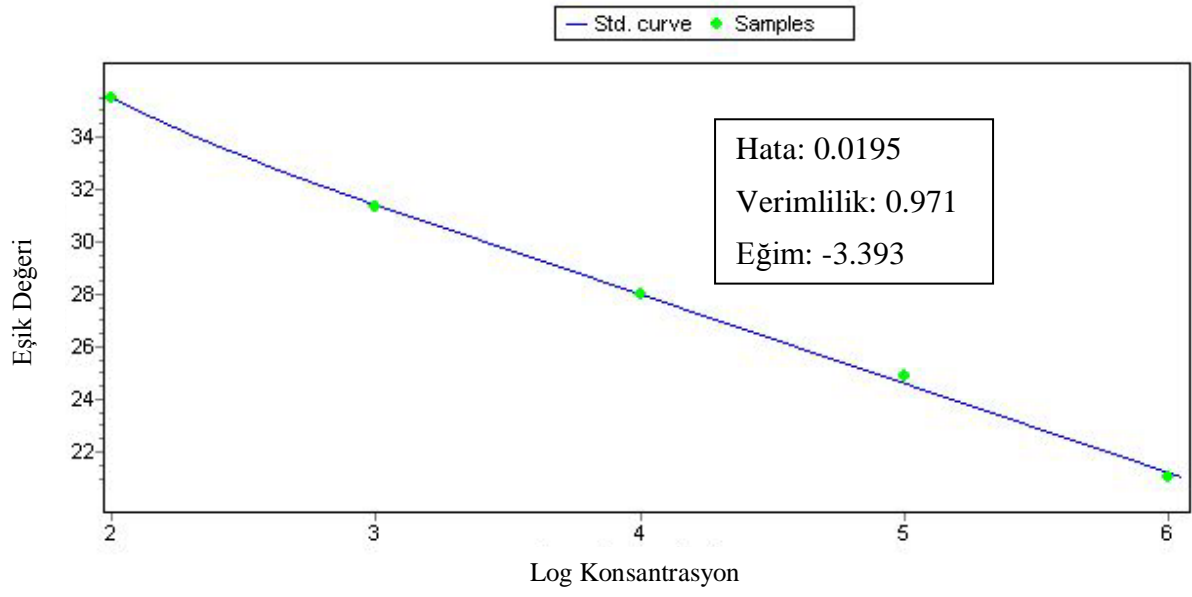
kullanılmış ve bu örneğin dilüsyon serileri alınarak her primer seti için ayrı ayrı elde edilen Ct (threshold cycle) veya Cp (Crossing point) değerlerinin rölatif log10'daki kopya sayısına karşı grafiği çizilmiştir. Bu grafiğin eğimi kullanılarak her primer çifti için üstel amplifikasyon verimliliği tespit edilmiştir ($E=10^{(-1/\text{eğim})}$). Teorik olarak, % 100 verimliliği olan amplifikasyon reaksiyonu için eğim -3.3 olmalıdır. Şekil 5.8. bu çalışmada kullanılan referans gen (*gapA*) için dizayn edilmiş primer çifti kullanılarak yürütülen reaksiyonun amplifikasyon verimliliğinin hesaplanması için oluşturulan amplifikasyon, standart ve erime eğrilerinin sonucunu göstermektedir.

Amplifikasyon Eğrileri



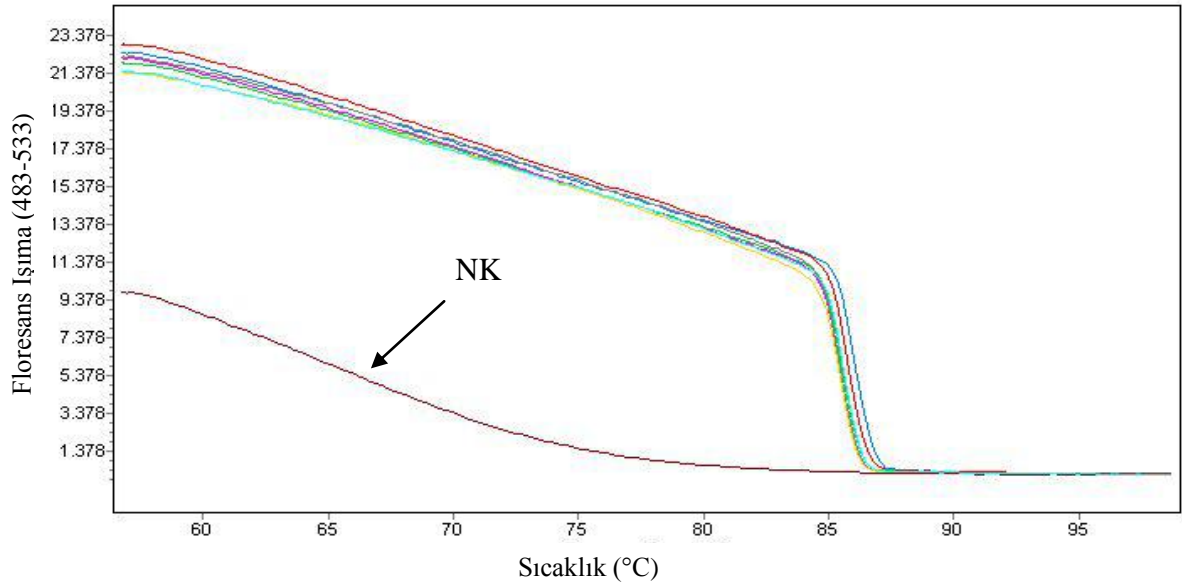
(a)

Standart Eğri



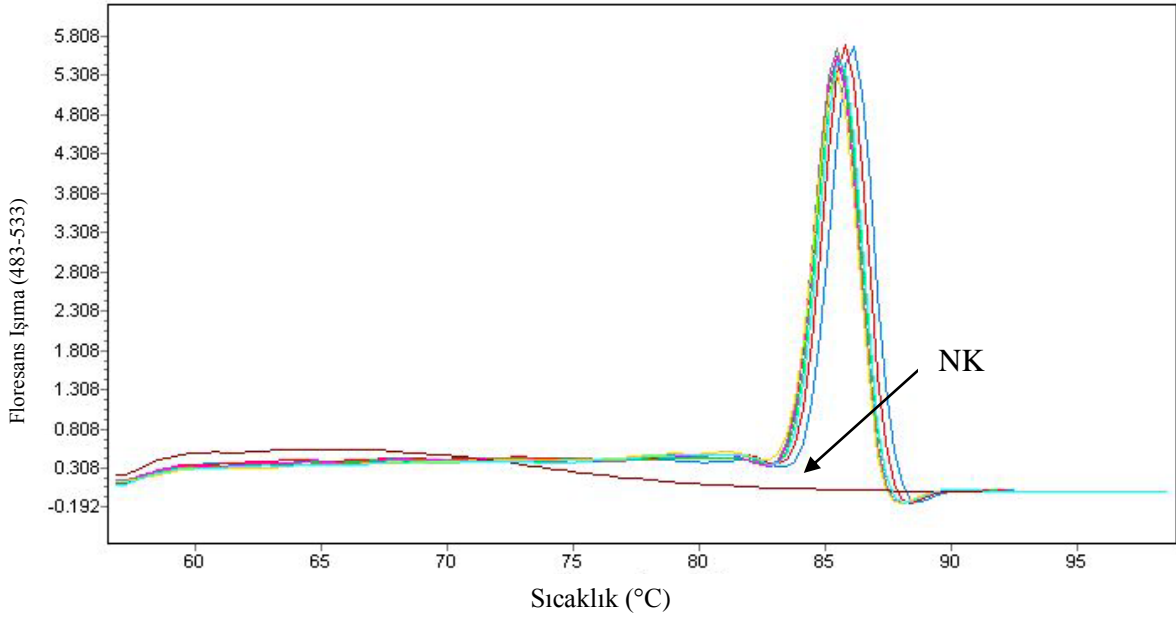
(b)

Erime Eğrisi



(c)

Erime Pikleri



(d)

Şekil 5.8. *gapA* geni için 10^{-6} dilüsyonlarla oluşturulan (a) Amplifikasyon eğrileri, (b) standart eğrisi, (c) erime eğrileri, (d) erime eğrisi analizine göre oluşan erime pikleri görülmektedir. NK: Negatif Kontrol

Çalışmada kullanılan her primer çiftinin standart eğrileri oluşturularak amplifikasyon verimlilikleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Gen spesifik primer çiftlerinin amplifikasyon verimlilikleri

Gen	Verimlilik	%Verimlilik	Gen	Verimlilik	%Verimlilik
<i>fimA</i>	1,97	97	<i>dps</i>	1,99	99
<i>rmbA</i>	1,98	98	<i>yliH</i>	2	100
<i>fidL</i>	1,94	94	<i>cheA</i>	2	100
<i>slsA</i>	1,93	93	<i>cheM</i>	1,98	98
<i>misL</i>	2	100	<i>wzzB</i>	1,99	99
<i>fliA</i>	1,99	99	<i>marT</i>	1,99	99
<i>fliC</i>	1,98	98	<i>gapA</i>	1,97	97

Farklılaşan gen ifadeleri hem doğal tip 14028 suşu hem de *marT* geni ifadesi aktive edilen MZ1627 suşu için Ct değerleri olarak belirlenmiştir (EK-2 ve EK-3). Hesaplanan amplifikasyon verimliliğinin her primer çifti için 2'ye yakın olmasından dolayı, E (verimlilik) değerini tüm hesaplamalar için 2 kabul eden ve açık hali aşağıda verilen yaklaşım metodu ($2^{-\Delta\Delta CT}$) kullanılarak, ifade değerleri normalize edilmiştir (Çizelge 5.2.) (87).

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

Çizelge 5.2. Normalize gen ifade verileri

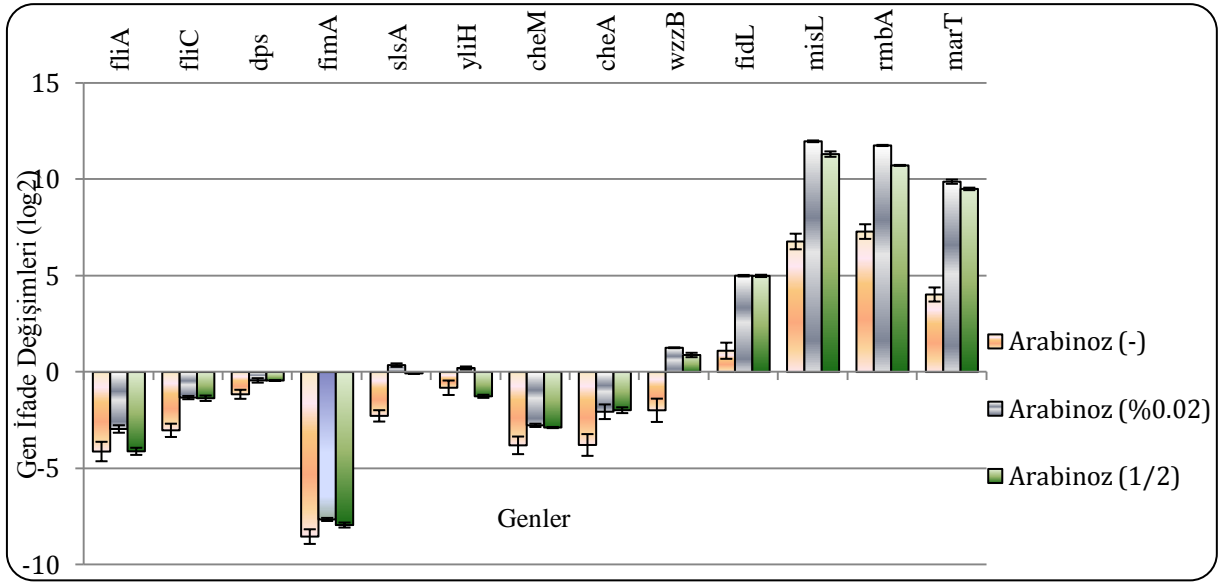
Normalize İfade							
Hedef Gen	Arabinoz (-)	Arabinoz (%0.02)	Arabinoz (1/2)	Arabinoz (1/4)	Arabinoz (1/8)	Arabinoz (1/16)	Arabinoz (1/32)
<i>fimA</i>	0,003	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003	0,001
<i>rmbA</i>	156,50	3468,27	1692,57	1924,14	225,19	489,44	53,08
<i>fidL</i>	2,15	32,00	31,78	24,85	8,94	7,75	1,93
<i>slsA</i>	0,21	1,28	0,95	0,69	0,27	0,38	0,24
<i>misL</i>	109,52	4025,63	2539,80	2272,40	432,03	588,13	92,09
<i>fliA</i>	0,06	0,13	0,06	0,08	0,06	0,05	0,04
<i>fliC</i>	0,12	0,400	0,39	0,31	0,17	0,11	0,06
<i>dps</i>	0,45	0,74	0,74	0,44	0,39	0,33	0,21
<i>yliH</i>	0,57	1,16	0,42	0,79	0,38	0,49	0,30
<i>cheA</i>	0,073	0,24	0,25	0,14	0,11	0,08	0,08
<i>cheM</i>	0,07	0,15	0,14	0,09	0,07	0,06	0,05
<i>wzzB</i>	0,25	2,39	1,85	1,68	1,02	0,62	0,37
<i>marT</i>	16,28	942,27	726,59	487,75	100,08	105,06	23,18

Normalizasyon değerini bulmak için kullandığımız $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünün uygulaması ile elde edilen sonuçlar üssel lineer değerler olduğu için, bazı genlerin ifadelerinde gözlenen değişimin yansıması da çok fazla olmuştur. Büyük sayılarla işlem yapmanın zorluğundan kurtulmak ve sonuçlar arasındaki dağınık görüntüyü azaltmak için rakamların kendisi değil, 2 tabanına göre logaritması kullanılmıştır (Çizelge 5.3.).

Çizelge 5.3. Normalize gen ifade verilerinin log2 tabanındaki değerleri

Normalize İfade (log 2 tabanında)							
Hedef Gen	Arabinoz (-)	Arabinoz (%0.02)	Arabinoz (1/2)	Arabinoz (1/4)	Arabinoz (1/8)	Arabinoz (1/16)	Arabinoz (1/32)
<i>fimA</i>	-8,54	-7,65	-7,94	-7,81	-8,165	-8,51	-9,43
<i>rmbA</i>	7,29	11,76	10,725	10,91	7,815	8,935	5,73
<i>fidL</i>	1,105	5	4,99	4,635	3,16	2,955	0,945
<i>slsA</i>	-2,275	0,36	-0,07	-0,53	-1,915	-1,4	-2,065
<i>misL</i>	6,775	11,975	11,3105	11,15	8,755	9,2	6,525
<i>fliA</i>	-4,125	-2,955	-4,115	-3,605	-4,02	-4,375	-4,755
<i>fliC</i>	-3,025	-1,325	-1,36	-1,71	-2,555	-3,255	-3,955
<i>dps</i>	-1,155	-0,435	-0,44	-1,175	-1,375	-1,61	-2,225
<i>yliH</i>	-0,815	0,21	-1,26	-0,34	-1,39	-1,025	-1,74
<i>cheA</i>	-3,785	-2,06	-1,98	-2,89	-3,155	-3,67	-3,72
<i>cheM</i>	-3,804	-2,765	-2,88	-3,53	-3,83	-4,175	-4,305
<i>wzzB</i>	-1,985	1,26	0,885	0,745	0,025	-0,685	-1,425
<i>marT</i>	4,025	9,88	9,505	8,93	6,645	6,715	4,535

Log2 tabanında negatif çıkan normalize değerler o genlerin ifadelerindeki azalışa, pozitif değerler ise artışa işaret etmektedir. Normalizasyonun en son basamağı doğal tip (Dt) suş ile yapıldığı için, gen ifadelerindeki artış veya azalış doğal tipe kıyasla ortaya çıkan artış veya azalışlardır (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. *marT* geni ifadesine bağlı olarak gerçekleşen gen ifade değişimleri

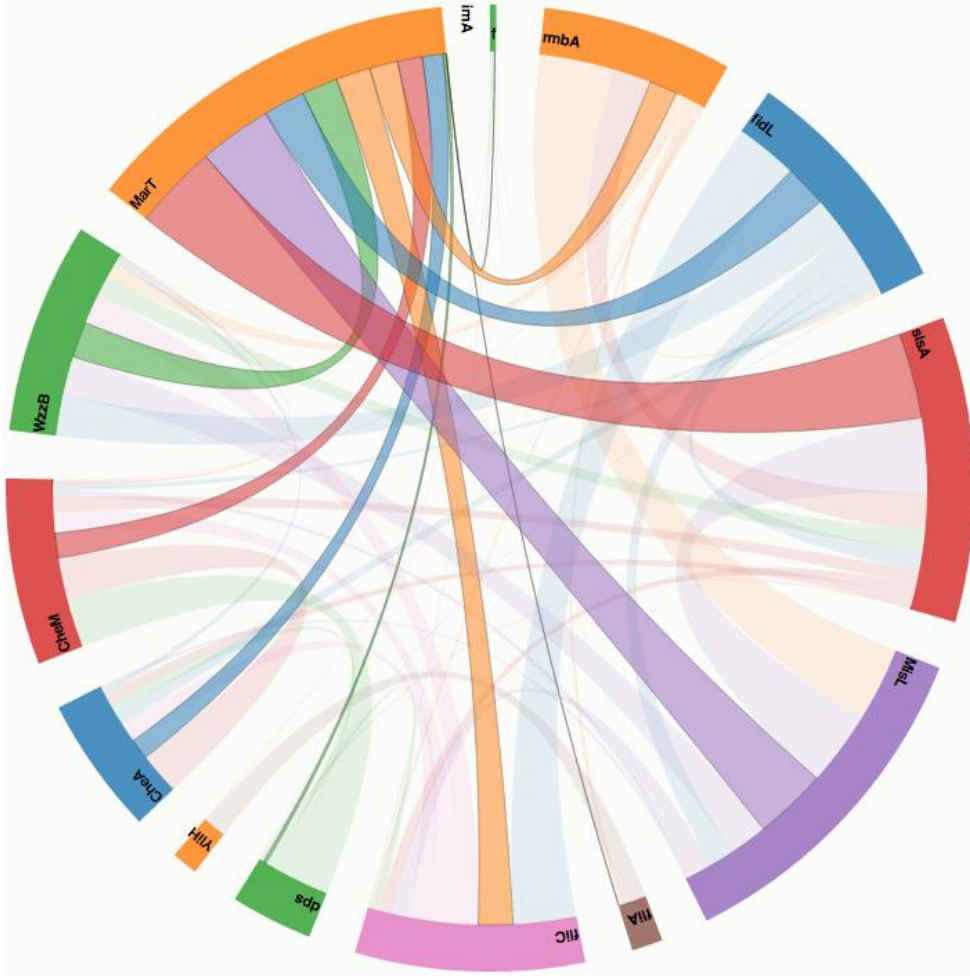
Tüm bu çalışmalar sonucu elde edilen ve yukarıda özetlenen bulgular; *S. Typhimurium*'da *marT*, *misL*, *slsA*, *rmbA*, *fidL*, *wzzB* ve *yliH* genlerinin *marT* geni tarafından pozitif; *fliA*, *fliC*, *dps*, *fimA*, *cheA* ve *cheM* genlerinin ise negatif yönde regüle edildiğini göstermektedir. Ancak bu bulguların nihai yorumları, gen ifade profilleri Pearson korelasyon analizine tabi tutulduktan sonra yapılmıştır. Pearson korelasyon analizine tabi tutulan gen ifade profilleri; *marT* geni ifadesinin *yliH* dışındaki tüm genlerle korelasyon gösterdiğini kanıtlamıştır (Çizelge 5.4., Şekil 5.10. ve Şekil 5.11.)

Çizelge 5.4. *marT* geni ifadesine bağlı olarak değişen gen ifade profillerinin birbiri ile korelasyonu.

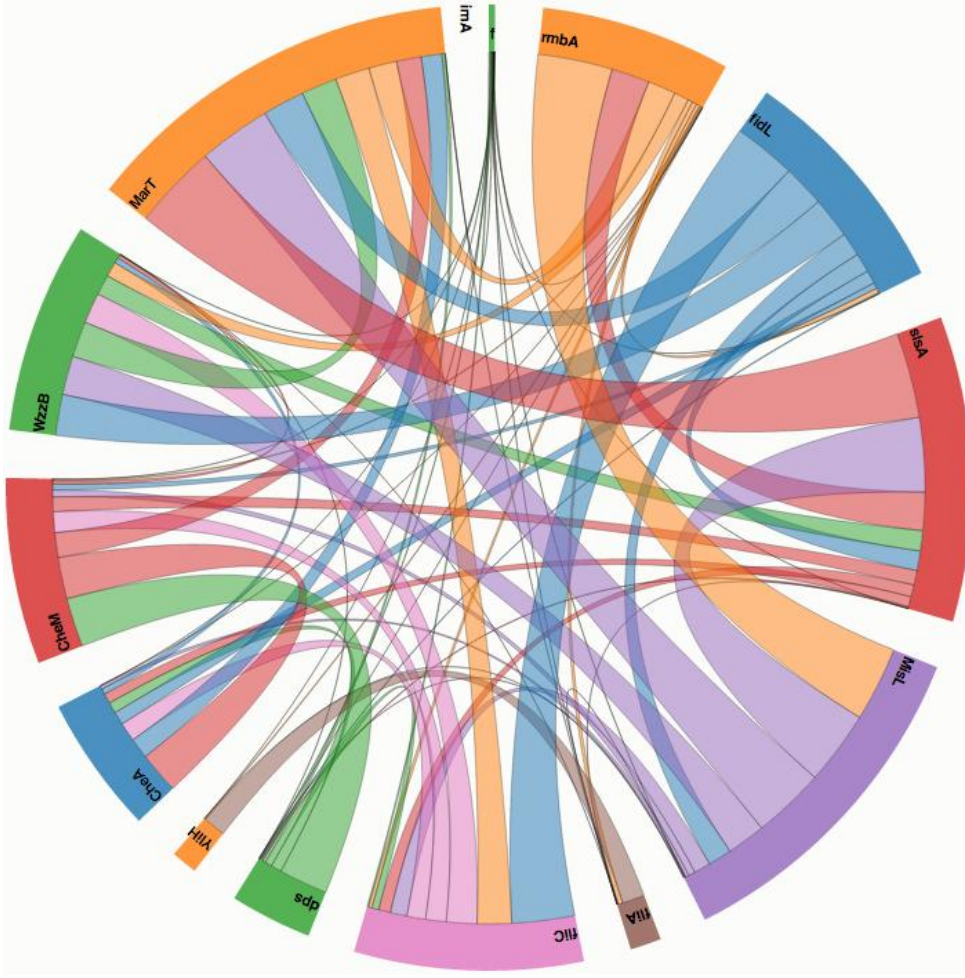
	<i>fliA</i>	<i>fliC</i>	<i>dps</i>	<i>fimA</i>	<i>slsA</i>	<i>yliH</i>	<i>cheM</i>	<i>cheA</i>	<i>wzzB</i>	<i>fidL</i>	<i>misL</i>	<i>rmbA</i>
<i>fliC</i>	0,740 0,057											
<i>dps</i>	0,684 0,090	0,919 0,003										
<i>fimA</i>	0,838 0,019	0,915 0,004	0,813 0,026									
<i>slsA</i>	0,806 0,029	0,935 0,002	0,877 0,010	0,831 0,021								
<i>yliH</i>	0,955 0,001	0,636 0,125	0,586 0,167	0,750 0,052	0,740 0,057							
<i>cheM</i>	0,742 0,056	0,951 0,001	0,977 0,000	0,819 0,024	0,941 0,002	0,631 0,129						
<i>cheA</i>	0,633 0,127	0,948 0,001	0,931 0,002	0,780 0,038	0,929 0,002	0,491 0,263	0,972 0,000					
<i>wzzB</i>	0,814 0,026	0,963 0,001	0,830 0,021	0,921 0,003	0,950 0,001	0,697 0,082	0,900 0,006	0,913 0,004				
<i>fidL</i>	0,705 0,077	0,984 0,000	0,866 0,012	0,892 0,007	0,949 0,001	0,616 0,141	0,914 0,004	0,938 0,002	0,972 0,000			
<i>misL</i>	0,856 0,014	0,945 0,001	0,850 0,015	0,881 0,009	0,990 0,000	0,795 0,033	0,919 0,003	0,897 0,006	0,970 0,000	0,955 0,001		
<i>rmbA</i>	0,906 0,005	0,900 0,006	0,802 0,030	0,868 0,011	0,969 0,000	0,869 0,011	0,876 0,010	0,831 0,021	0,941 0,002	0,909 0,005	0,990 0,000	
<i>marT</i>	0,791 0,034	0,966 0,000	0,895 0,006	0,858 0,014	0,994 0,000	0,710 0,074	0,956 0,001	0,950 0,001	0,967 0,000	0,972 0,000	0,989 0,000	0,960 0,001

* İlk sütun korelasyon katsayılarını (r), ikinci sütun ise p değerlerini göstermektedir.

* Kırmızı ile yazılan rakamlar çok güçlü korelasyona (Minitab; $p \leq 0,005$) işaret etmektedir.



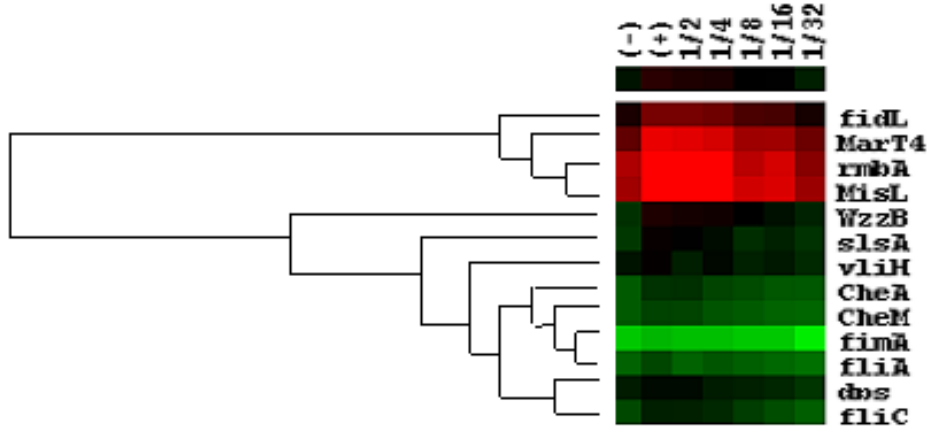
Şekil 5.10. *marT*'nin diğer genlerle olan korelasyonunu gösteren ifade ağı grafiği. Kalın çizgiler daha kuvvetli olan korelasyonu tanımlamaktadır.



Şekil 5.11. Tüm hedef genlerin birbirleriyle olan korelasyonunu gösteren ifade ağı grafiği. Kalın çizgiler daha kuvvetli olan korelasyonu tanımlamaktadır.

Normalizasyon basamağı sonunda elde edilen değerler ile bir çift entegre program (Cluster and TreeView) kullanılarak gerçekleştirilen hiyerarşik kümeleme analizi ve ısı haritası da (Şekil 5.12.) korelasyon analizi sonucu elde edilen verileri doğrulamıştır (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

Tüm bu veriler birlikte yorumlandığında; *marT* geninin *S. Typhimurium*'da *fidL*, *marT*, *rmbA*, *misL*, *wzzB* ve *sfsA* genlerinin pozitif; *cheA*, *cheM*, *fimA*, *fliA*, *dps* ve *fliC* genlerinin ise negatif regülasyonuna katıldığına kesinlik kazandırmaktadır.



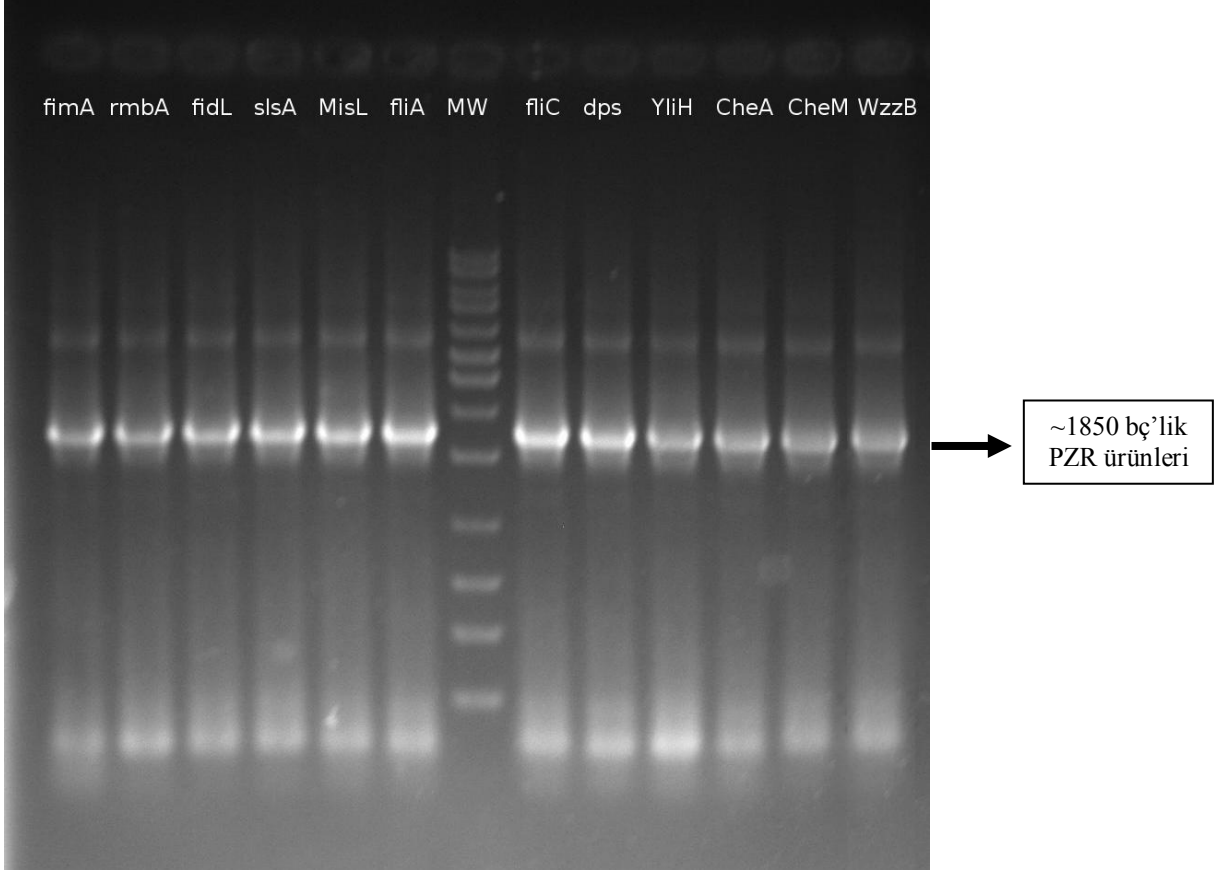
11.98 katlık değişim oranı (log 2)

-9.43 katlık değişim oranı (log 2)

Şekil 5.12. *marT* ifadesi teşvik edilmiş MZ1627 örneklerindeki hedef gen ifadelerinin hiyerarşik kümeleme analizi ve ısı haritası ile simgelemesi. *gapA* gen ifade değerlerine ve kontrol örneklere göre normalize edilerek elde edilen ifade değerleri kullanılmıştır.

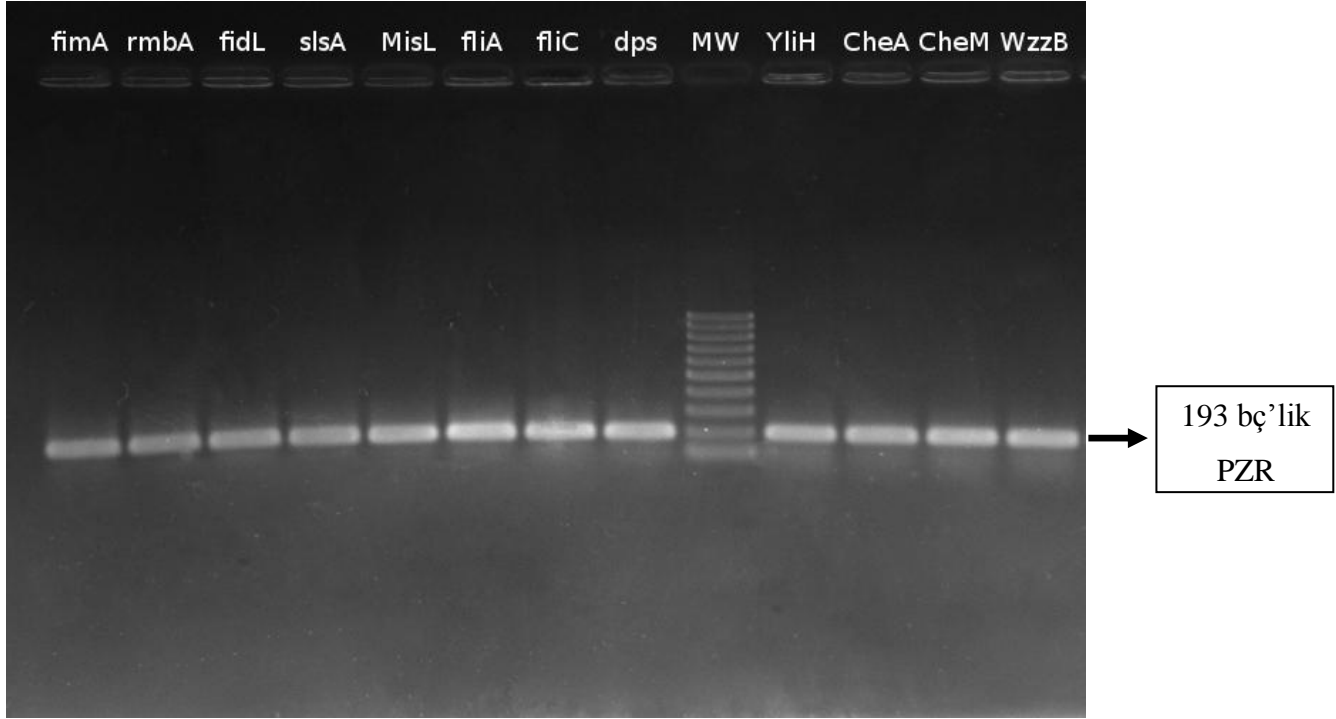
5.3. *marT* geni Regülasyonu Bakımından Araştırılan Genlerin Biyofilm Üretimindeki Rollerini

Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışmalarından elde edilen bulguların açıklanmasına yardımcı olacağı düşüncesinden hareketle, çalışmamızda kullanılan genlerin biyofilm üretimindeki rollerini araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle toplam 12 genin (*wzzB*, *fimA*, *rmbA*, *fidL*, *slsA*, *misL*, *fliA*, *fliC*, *dps*, *yliH*, *cheA* ve *cheM*) Red rekombinaz sistemi temelli mutantları oluşturulmuştur. Mutasyon çalışmalarının ilk aşamasında kanamisin kaseti kalıp DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucunda; 1737 bç uzunluğunda kanamisin gen kaseti ve 100 bç uzunluğunda gen spesifik homoloji bölgeleri birlikte çoğaltılmış ve ~1850 bç'lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 5.13.).



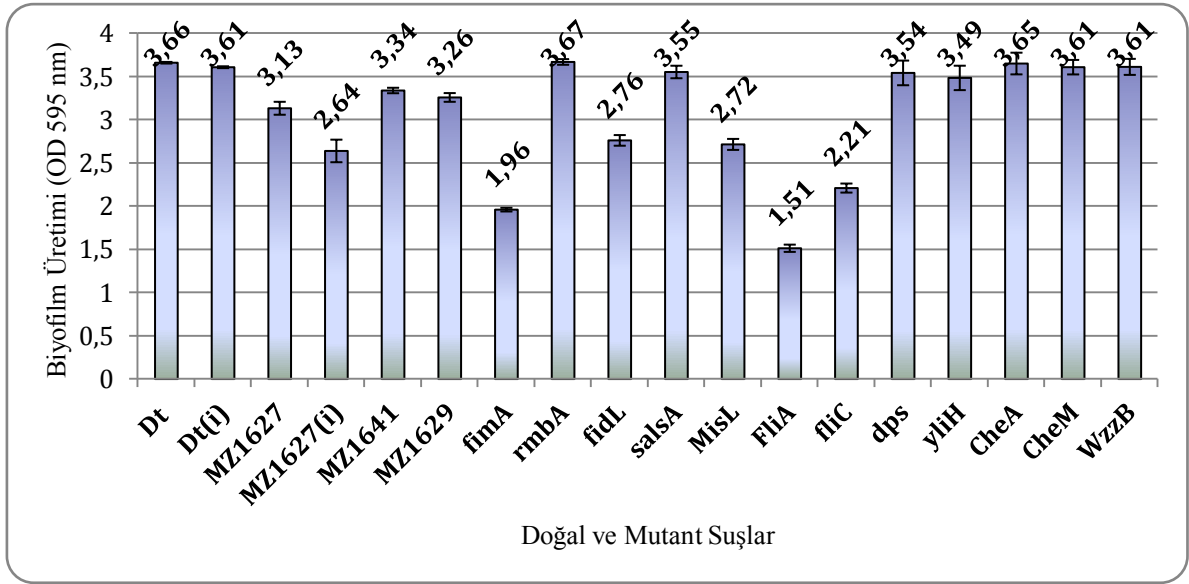
Şekil 5.13. Gen spesifik homoloji bölgeleri içeren kanamisin kasetleri.

Son aşamada; pRED/ET plazmidinin *S. Typhimurium* 14028 suşuna aktarımı ile elde edilen transformantlara ayrı ayrı gen spesifik homoloji bölgelerini içeren kanamisin kasetleri aktarılmıştır. Bu rekombinantlarda Red operonunun indüklenmesi sonucu hedef gen bölgelerini içeren kanamisin kasetlerinin homolog bölge rekombinasyonu yolu ile hedef gen insersiyonu sağlanmıştır. Sonuçlar tanımlayıcı PZR denemeleri ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.14.).



Şekil 5.14. Hedef genlerde kanamisin kaseti (193 bç) varlığının tespiti.

Çalışmada kullanılan genlerin biyofilm üretimindeki etkinliklerinin tanımlanması için, *Salmonella* Typhimurium doğal tip 14028 suşu ve kanamisin kaseti sokularak bozulan hedef gen mutantları, polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özellikleri bakımından kıyaslanmıştır (Şekil 5.15.). Bu çalışmalardan elde edilen bulguların Tukey çoklu karşılaştırma testine tabi tutulması sonucu; *fimA*, *fidL*, *misL*, *fliA* ve *fliC* geni mutantlarında biyofilm üretimindeki düşmelerin istatistiki açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

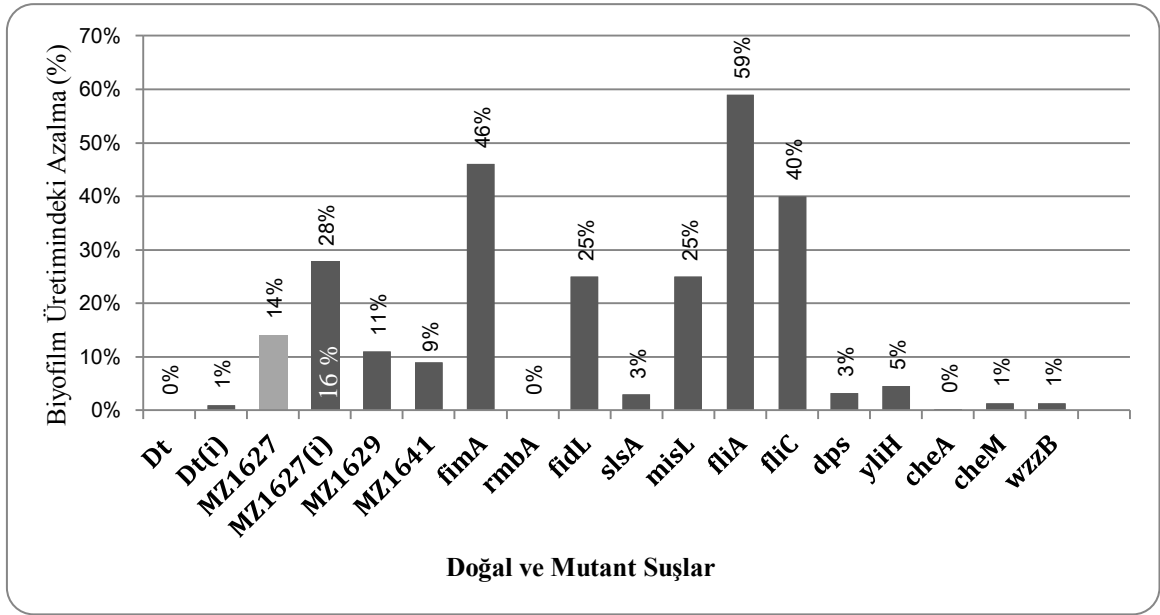


Şekil 5.15. Gen mutasyonlarının biyofilm üretimi üzerine etkisi. “i” arabinoz ile *marT* ifadesinin teşvikini, “Dt” doğal tip (14028) suşunu, barlar ise ortalamanın standart sapmasını göstermektedir.

Arabinoz ile MarT üretimi teşvik edilmeyen MZ1627 suşunun biyofilm üretim miktarının da doğal tip suşa kıyasla düşük olması, BAD promotor sisteminin induksiyon olmaksızın “sızdırmasından” kaynaklı düşük düzeyde *marT* geninin ifadesi ile açıklanabilir.

Doğal tip 14028 suşuna oranla, mutasyonlar sonucunda biyofilm üretiminde meydana gelen düşmeler aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.16’da verilmiştir.

$$\frac{(\text{Doğal tip suş OD'si} - \text{Mutant suş OD'si})}{(\text{Doğal tip suş OD} \times 100\%)}$$



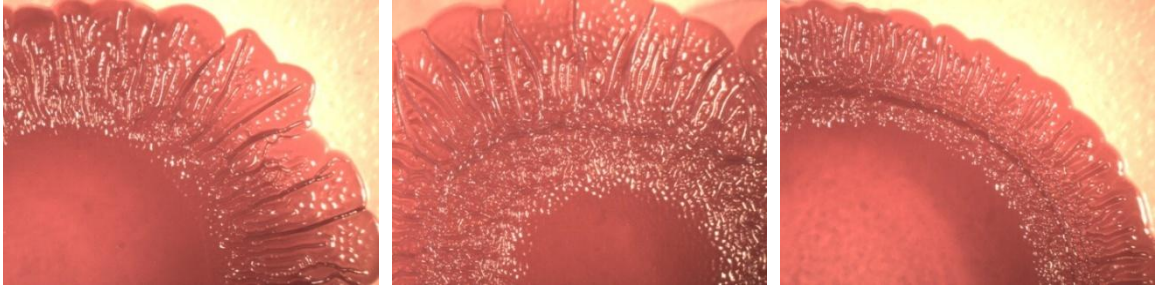
Şekil 5.16. Doğal tip 14028 suşuna kıyasla mutant suşların biyofilm üretimindeki % azalmalar. Değişkenlerin üzerinde yazan oranlar; doğal tip (koyu) ya da MZ1627 (açık gri) mutantı ile kıyaslanarak elde edilmiştir.

Mutasyonların, biyofilm oluşturma potansiyeli üzerine yarattığı en güçlü etki, *fliA* (%59) ve *fimA* (%46) mutant suşlarında görülürken, onları *fliC* (%40), *fidL* (%25) ve *misL* (%25) mutant suşları takip etmiştir.

Bu bulgular; *fliC*, *fimA*, *fliA*, *fidL* ve *misL* genlerinin; *marT* geni ifadesinin indüksiyonundan bağımsız bir şekilde, *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir.

5.4. Araştırmada Kullanılan Genlerin Biyofilm Morfotipi ve Yapısal Özellikleri Üzerine Etkisi

Araştırmada kullanılan genlerin biyofilm morfotipi üzerine etkisi; Kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar ortamlarında 20 °C'de 8 gün inkübasyon sonucunda (75,82) üretilen bakterilerin stereo mikroskop (Leika, Germany) altında incelenmesi sonucu belirlenmiştir. Bu mikroskopik incelemeler, çalışılan doğal suş ve mutantların tümünün biyofilmlerinin; matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selülöz bulunduran, "rdar" morfotipinde (kırmızı ve pürüzlü görünümde) olduğunu, fakat mutantlarda bu morfotipin fenotipik farklılıklar içerdiğini kanıtlamıştır (Şekil 5.17.).



Dt

Δdps

$\Delta wzzB$

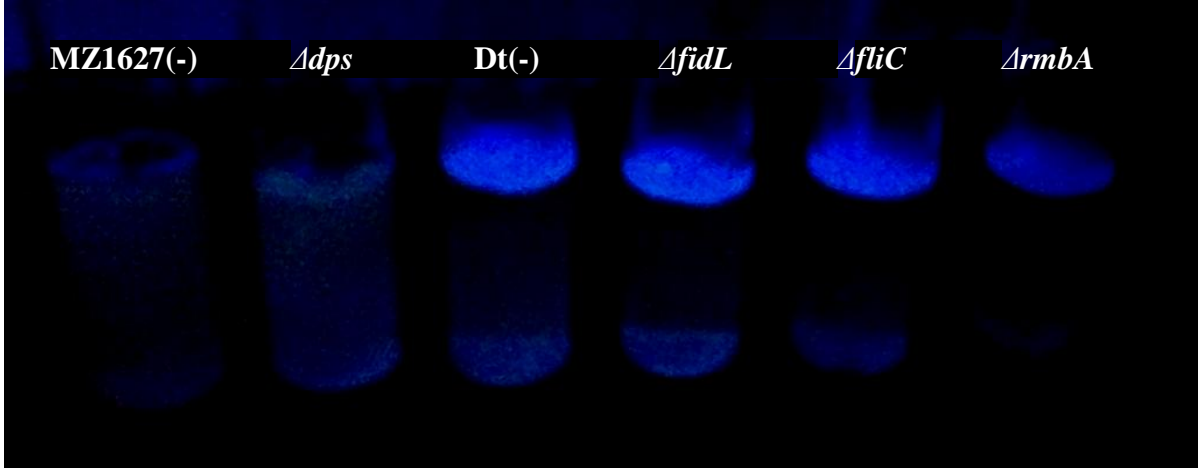
Şekil 5.17. Mutant suşlarda “rdar” morfolojisindeki fenotipik değişimler

Agar ortamındaki morfolojik tanımlama çalışmalarından sonra; doğal suş ve mutantların sıvı-hava arafazında pelikül oluşturma özellikleri incelenmiştir. Doğal suş ve mutantların pelikül karakteristikleri ve pelikül oluşumu esnasında besiyerinde tanımlanan değişimleri Çizelge 5.5’te verilmiştir.

Doğal suş ve mutantların tümünde rdar morfolojisi tanımlandığı için, bu bakterilerin sıvı-hava arafazında son derece sıkı bir pelikül yapısı oluşturması beklenmektedir. Ancak bu beklentinin aksine bazı mutantlarda sıvı-hava ara fazında pelikül yapısının oluşmadığı [(Dt(i), $\Delta 1627$, $\Delta 1627(i)$, $\Delta 1629$, $\Delta 1641$, $\Delta fimA$, $\Delta slsA$, $\Delta fliA$, Δdps , $\Delta cheA$, $\Delta wzzB$)], bazılarında ise oluşan pelikül yapısının rdar morfolojisinin özelliği olan sıkı pelikül yapısını içerdiği (Dt, $\Delta rmbA$, $\Delta fidL$, $\Delta misL$, $\Delta fliC$, $\Delta yliH$, $\Delta cheM$) belirlenmiştir (Çizelge 5.5., Şekil 5.18.)

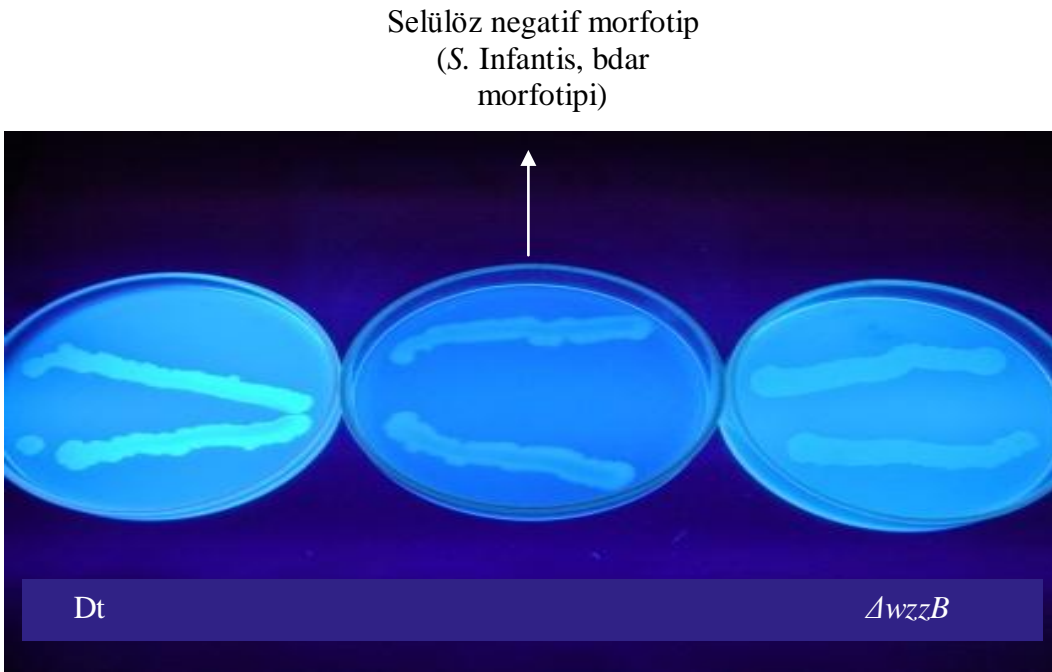
Çizelge 5.5. Doğal suş ve mutantların sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma karakteristikleri

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
Dt	Var (++)	Rijid	Berrak	Yok	rdar
Dt (i)	Var (+)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>Δ1627</i>	Var (++)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>Δ1627 (i)</i>	Var (+)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>Δ1629</i>	Yok	Yok	Bulanık	Var (+)	rdar
<i>Δ1641</i>	Var (++)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>ΔfimA</i>	Var (++)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>ΔrmbA</i>	Var (++)	Rijid	Berrak	Yok	rdar
<i>ΔfidL</i>	Var (++)	Rijid	Berrak	Yok	rdar
<i>ΔslsA</i>	Var (+)	Yok	Bulanık	Var (+)	rdar
<i>ΔmisL</i>	Var (++)	Rijid	Berrak	Yok	rdar
<i>ΔfliA</i>	Var (++)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>ΔfliC</i>	Var (++)	Rijid	Berrak	Var (+)	rdar
<i>Δdps</i>	Var (+)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>ΔyliH</i>	Var (+)	Rijid	Berrak	Yok	rdar
<i>ΔcheA</i>	Var (+)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar
<i>ΔcheM</i>	Var (++)	Rijid	Berrak	Yok	rdar
<i>ΔwzzB</i>	Var (+)	Yok	Bulanık	Var (++)	rdar



Şekil 5.18. Kalkoflor içeren LB besiyerinde pelikül oluşumunun tanımlanması

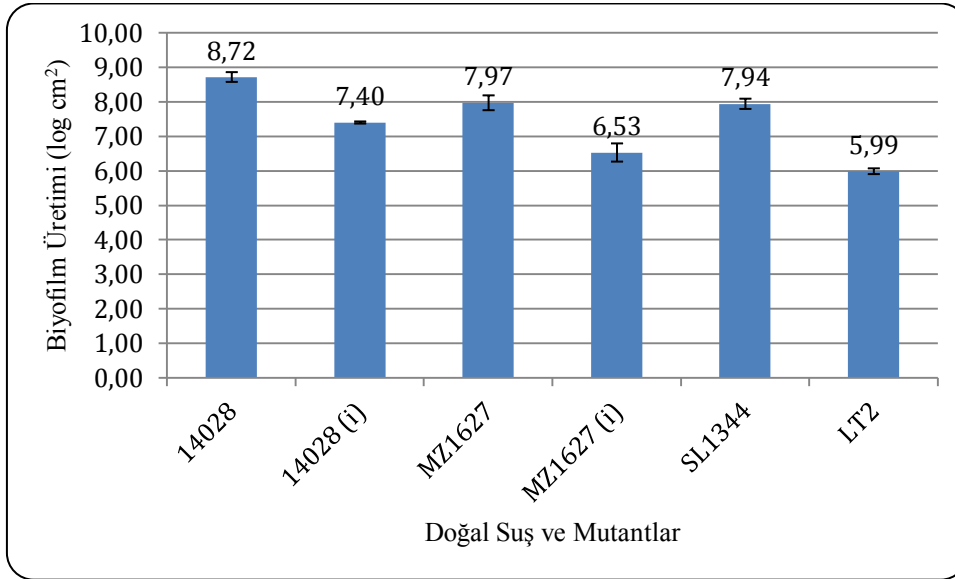
Morfotiplerine ve pelikül yapılarına göre tanımlanan doğal suş ve mutantların ürettiği biyofilmlerin matrislerinde önemli bir bileşen olan selülöz içeriğine göre değerlendirilmeleri, agar ortamlarında kalkoflor bağlanma denemeleri sonucu gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sonucunda da doğal suş ve mutantların biyofilm yapılarında selülozun bulunduğu ancak selülöz oranının mutant biyofilmleri arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.19.).



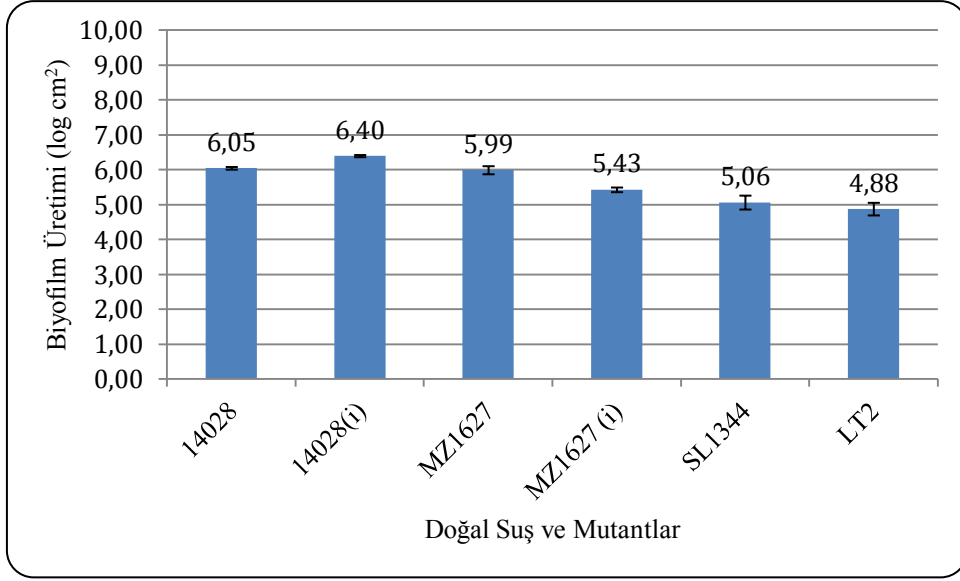
Şekil 5.19. Biyofilm yapılarında selülöz içeriği bakımından farklılığın tespiti

5.5. *marT* Geni İndüksiyonunun Farklı Abiyotik Yüzeylerde Biyofilm Üretme Yeteneği Üzerine Etkileri

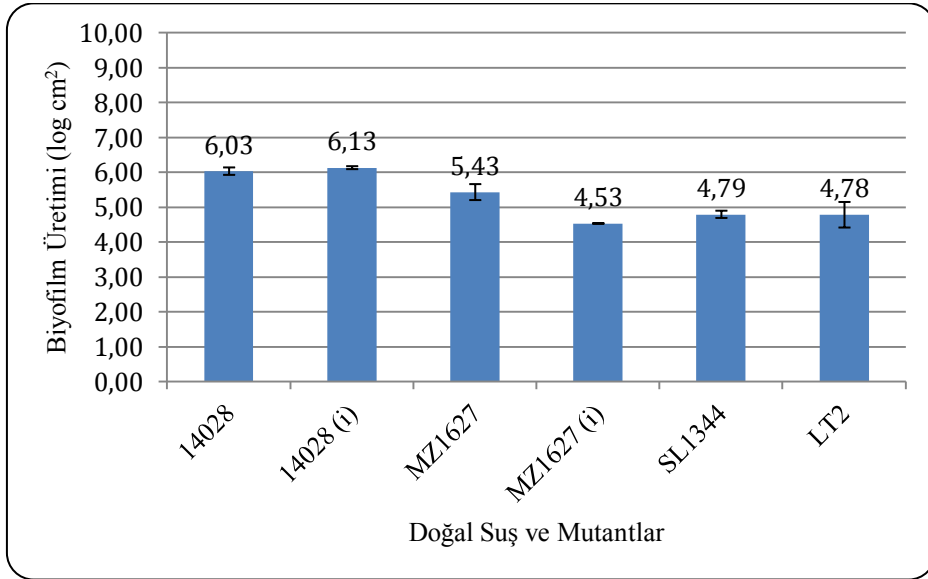
Bu çalışmada doğal tip *S. Typhimurium* 14028, LT2 ve SL1344 doğal suşları ile arabinoz indüksiyonu ile *marT* geni ifadesi sağlanabilen *marT* mutantının (MZ1627) çelik kupon, cam ve polistiren yüzeylerde biyofilm üretme yetenekleri incelenmiştir. Biyofilm üretimi, kullanılan abiyotik yüzeylerde cm² başına koloni oluşturma birimi (kob) cinsinden hesaplanmış (EK-4, EK-5 ve EK-6) ve logaritmik değerleri kullanılarak biyofilm üretim grafikleri çıkarılmıştır (Şekil 5.20., Şekil 5.21. ve Şekil 5.22.). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, tüm doğal suş ve mutantların en yüksek biyofilm üretimini polistiren yüzeylerde gerçekleştirdiğini kanıtlamıştır. Polistireni, cam ve paslanmaz çelik yüzeyler takip etmiştir. *marT* geni ifadesi indüklenen mutant suş (MZ1627) tüm yüzeylerde, doğal suştan daha düşük biyofilm üretimi göstermiştir.



Şekil 5.20. Doğal suş ve mutantların polistiren yüzeyde biyofilm üretim özellikleri. Barlar, ortalamanın standart hatasını göstermektedir.



Şekil 5.21. Doğal suş ve mutantların cam yüzeyinde biyofilm üretim özellikleri. Barlar, ortalamannın standart hatasını göstermektedir.



Şekil 5.22. Doğal suş ve mutantların paslanmaz çelik kupon yüzeyinde biyofilm üretim özellikleri. Barlar, ortalamannın standart hatasını göstermektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmanın ilk aşamasında, MarT regülatör proteininin (dolayısı ile *marT* geninin) *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerine etkisi çalışılmıştır. MarT, *S. Typhimurium*'da *in-vitro* kültür koşullarında üretilmeyen (ya da düşük düzeyde üretildiği için Western blot sistemlerinde tanımlanamayan), ancak söz konusu bakterinin konakçı sisteme girişinden sonra (*in-vivo* koşullarda) üretimi teşvik edilen ve MisL ototransporter proteininin pozitif transkripsiyonel regülasyonuna katıldığı bilinen bir regülatör proteindir (16). Çalışmamızda biyofilm denemeleri *in-vitro* kültür koşullarında yürütüldüğü için, bu özellik üzerine MarT regülatör proteininin etkisi; *marT* geninin arabinoz varlığında indüklenen bir promotörün alt akış yönüne rekombine edildiği pBAD plazmidini içeren bir mutant suşta (*S. Typhimurium* MZ1627) araştırılmıştır. *In-vitro* kültür koşullarında MarT regülatör proteininin üretiminin en yüksek düzeyde teşvik edildiği ardışık iki arabinoz konsantrasyonunda biyofilm üretiminin, doğal suşa oranla istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca, mutant suşta, üreme (kültür) ortamındaki arabinoz konsantrasyonunun düşürülmesi ile (bu aynı zamanda MarT proteininin üretimindeki düşüşü ifade etmektedir) doğru orantılı olarak biyofilm üretme kapasitesinin arttığı ve denemede kullanılan en düşük arabinoz konsantrasyonunda, doğal suşa çok yakın bir düzeyde biyofilm ürettiği saptanmıştır. Bu veriler *marT* geninin *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimini negatif yönde regüle ettiğini kanıtlamaktadır.

Aynı ya da farklı türlere ait bakterilerin kendi ürettikleri polimerik bir matriks içerisinde oluşturdukları çok hücreli formlara benzer komüniteler olarak tanımlanan biyofilm yapıları, içerdikleri bakterileri çevresel stres, antibiyotikler, dezenfektanlar ve konakçı immün sisteminin olumsuz etkilerinden yüksek düzeyde korumaktadır. Bu özelliği nedeniyle tüm bakteriyel enfeksiyonların % 80 gibi büyük bir oranı biyofilm yapılarından kaynaklanmaktadır. Günümüzde bakteriyel üremenin predominant formu olarak kabul edilen biyofilm yapılarının regülasyonu, hüce içi ve hücreler arası regülasyonun en karmaşık örneğini teşkil etmektedir. Yukarıda özetlenen karakteristikler biyofilmleri, gerek bakteriyel enfeksiyonların eradikasyonu ve gerekse regülasyonun karmaşık sistem ağının çözümüne yönelik çalışmalarının odağı haline getirmiştir. *Salmonella*'da biyofilm üretiminin regülasyonu üzerine yürütülen çalışmalarda, merkezi metabolizma yanında hüce içi ya da dışı koşullara bağlı olarak işlevsel olan birçok genin, bu özellik üzerinde etkinlik gösterdiği saptanmıştır (96–99). Çalışmamızda *marT* geninin *S. Typhimurium*'da

biyofilm üretiminin negatif regülasyonuna katıldığını kanıtlanması, bu alanda ilk veri olması bakımından evrensel bilime katkı niteliği taşımaktadır. Bu bulgu aynı zamanda, *marT* geninin detaylı regülasyon karakteristiklerinin belirlenmesinin, *Salmonella*'da biyofilm yapılarının ve patojenitenin regülasyonunun anlaşılmasına önemli katkılarda bulunacağına işaret etmesi açısından da, çalışmamızda yönlendirici nitelik taşımıştır. Bu nedenle tez çalışmasının ikinci aşamasını teşkil eden denemeler, *marT* geninin regüle ettiği genlerin tanımlanmasını esas almıştır. Bu denemelerin hareket noktasını Akkoç (2011) tarafından gerçekleştirilen mikrodizin çalışmaları oluşturmuştur (13). Araştırmacı söz konusu çalışmada, *marT* geninin aktive edildiği *S. Typhimurium* mutant suşunda *dps*, *yliH*, *cheA*, *cheM*, *fliA* ve *fliC* genlerinin ifadelerinde düşme; *wzzB*, *fidL*, *misL*, *marT*, *rmbA* ve *slsA* genlerinin ifadelerinde ise artış olduğunu belirlemiştir. Bu nedenle çalışmamızın bu aşamasında, *marT* geninin *Salmonella*'da global bir regülatör olabileceğine işaret eden ve yukarıda özetlenen verilerin hücresel süreçlerde test edilmesi çalışmalarına, bir başka ifade ile mikrodizin çalışmalarının kontrolünde altın standart olan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) denemelerine geçilmiştir.

Kantitatif gerçek zamanlı PZR verilerinin normalizasyonu sonucu elde edilen gen ifade değerlerine göre; *marT* geninin ifadesinin arabinoz varlığında teşvik edilmesi ile *marT*, *slsA*, *misL*, *rmbA*, *fidL*, *wzzB* ve çok düşük düzeyde de olsa *yliH* genlerinin ifadelerinin doğal suşa (14028) kıyasla arttığı; *fliA*, *fliC*, *dps*, *fimA*, *cheA* ve *cheM* genlerinin ifadelerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Bu verilerin Pearson korelasyon analizine tabi tutulması sonucu, *marT* geni ile sadece *yliH* geni arasında istatistiki açıdan önemli bir korelasyonun bulunmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle gerçek zamanlı PZR denemelerinde *yliH* geni ifadesinde saptanan düşük düzeydeki artışın ölçümsel hata payından kaynaklandığı kararına varılmıştır. Korelasyon analizi, *marT* geni ifadesinin arabinoz varlığında teşviki sonucu ifadesi artan genlerin (pozitif regüle edilen genler; *marT*, *slsA*, *misL*, *rmbA*, *fidL* ve *wzzB*) ifade oranları ile *marT* ifadesi arasında pozitif bir korelasyonun bulunduğunu göstermiştir. Bu durum pozitif regüle edilen genlerin karakteristiğidir. Ancak *marT* tarafından transkripsiyonları negatif yönde regüle edilen genlerin ifadeleri de (*fliA*, *fliC*, *dps*, *fimA*, *cheA* ve *cheM*), *marT* geni ifadesi ile pozitif korelasyona sahip bulunmuştur. Bu bulgu, *marT* geninin ifadesi sonucu üretilen MarT proteini ile negatif regülasyonuna katıldığı genler arasındaki protein-DNA interaksyonunda, regülatör protein konsantrasyonunun kritik bir önem taşıdığına işaret etmektedir. Zira en yüksek düzeydeki negatif regülasyonun gerçekleştiği regülatör protein konsantrasyonunun üzerindeki

değerler, protein-DNA interaksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Gen ifade verilerinin hiyerarşik kümeleme analizine tabi tutulması sonucunda elde edilen dendogramda; *fidL*, *marT*, *rmbA* ve *misL* genlerinin, MarT'nin pozitif regülasyonundan, *fimA*, *fliA*, *cheA* ve *cheM*, genlerinin ise MarT'nin negatif regülasyonundan, en yüksek düzeyde etkilenen genler olduğu saptanmıştır.

MarT regülatör proteini varlığında pozitif transkripsiyonel regülasyona tabi tutulan *misL*, *fidL*, *marT*, *slsA* ve *rmbA* genleri, *Salmonella* patojenite adası III (SPI-III) içerisinde yer almakta olup, *marT/fidL* genleri aynı zamanda operon organizasyonu içermektedir. Bağımsız promotörlere sahip olan *misL*, *slsA* ve *rmbA* genleri ise bu operonun hemen arkasında ya da önünde yer alan komşu genlerdir (35,45). Söz konusu genlerden *misL*'nin, kendi transportunu gerçekleştirebilen (ototransporter) özellikte bir proteini kodladığı ve bu ototransporter proteinin *Salmonella*'nın konakçı epitel hücrelerine tutunmasını ve kolonizasyonunu yönettiği saptanmıştır (14,16). Tükel vd. (2007) çalışmalarında; bu proteinin *in-vitro* kültür koşullarında western-blot yöntemi ile belirlenemediğini, ancak *Salmonella*'nın konakçı sisteme dahil olması durumunda aktive edilen *marT* geninden ifadelenen MarT proteininin, *misL* geni promotoruna bağlanarak bu genin transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirmesi suretiyle yüksek oranda üretildiğini saptamıştır (16). Ayrıca, moleküler düzeyde yürütülen tutunma testleri sonucunda; MisL ototransporter proteininin epitel hücrelere tutunmasının, fibronektinin heparin-II domainini özgül olarak tanınması suretiyle gerçekleştiği de belirlenmiştir (13). Çalışmamızda ise, daha önce bilinenlerin aksine, *marT* geninin SPI-III'de yalnız *misL*'in değil, *marT/fidL* operonunun yanında *rmbA* ve *slsA* genlerinin de pozitif regülatörü olduğu kanıtlanmıştır. Bu yeni bulgular, SPI-III içerisinde yer alan, ancak fonksiyonları ve gerçek bir gen olup olmadıkları bilinmeyen *fidL*, *slsA* ve *rmbA* genlerinin, *marT* geni aktivasyonuna bağlı olarak *in-vivo* koşullarda ifade edildiklerini göstermektedir. Bu durum, söz konusu genlerin *Salmonella* enfeksiyonunda fonksiyonel olduklarının güçlü bir kanıtıdır. Bu nedenle *fidL*, *slsA* ve *rmbA* genlerinin fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi, *Salmonella* patojenitesinin moleküler mekanizmasının detayları ile anlaşılması açısından elzem hale gelmiştir.

S. Typhimurium'da *marT* geninin pozitif regülatör fonksiyonuna sahip olduğu belirlenen son gen *wzzB* genidir. *wzzB* geni *S. Typhimurium*'da SPI-II içerisinde yer almakta ve lipopolisakkaritlerin "O" antijeninin kısa değişken zincirlerinin (S-OAg) üretimini regüle etmektedir (100). Lipopolisakkarit yapı (LPS) *Salmonella*'nın epitel hücrelere tutunmasında ve konakçı hücreleri işgalinde fonksiyonel olan çok önemli bir patojenite elemanıdır. Lipopolisakkaritlerin "O" antijeninin değişken zincirlerinin çok uzun olacak şekilde üretimi yönünde gerçekleştirilen regülasyon, patojenin hücre dışı (*in vitro*) koşullarda yaşamda kalmasına (*in-vitro* stres koşullarına dirençli hale gelmesine); değişken zincirlerin normal ya da kısa olacak şekilde üretimi yönünde gerçekleşen regülasyon ise patojenin hücre içi koşullarda (*in-vivo*) yaşamda kalmasına yardımcı olmaktadır (101,102). Bu literatür verileri, çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla beraber yorumlandığında; *marT*'nin, *wzzB* geninin pozitif regülatörü görevini üstlenmesinin kritik bir bulgu olduğu ortaya çıkmaktadır. Zira *marT* geninin birincil transkripsiyonel regülatör olarak görev yaptığı MisL ototransporter proteini, patojenin konakçı hücrelere tutunmasında ve kolonizasyonunda işlev görmektedir. Konakçı enfeksiyonunun erken aşamalarında *marT* aktivasyonuna bağlı olarak bu süreç tamamlandığında, hücre içine giren patojenin bu koşullara uyum sağlayarak hayatta kalabilmesi için gerekli olan lipopolisakkaritlerin "O" antijeninin kısa değişken zincirlerinin üretiminin de *marT* tarafından tetiklenmesi (*wzzB* geninin aktivasyonu yolu ile), enfeksiyon aşamalarının sigma çağlayıcı benzeri sıralı bir regülasyona tabi tutulduğunu kanıtlamaktadır. "Pozitif transkripsiyonel regülasyon çağlayıcı" adını verdiğimiz bu süreç, *Salmonella* hücrelerinin (muhtemelen tüm bakteriyel patojenlerin) *in-vivo* ve *in-vitro* koşullar arasında geçişlerinin ve bu geçiş süreçlerinde adaptasyonlarının anlaşılmasında anahtar rol üstlenecek niteliktedir.

Çalışmamızda *marT* geni aktivasyonuna bağlı olarak negatif yönde regüle edilen (ifadelerinde düşme saptanan) *dps*, *fimA*, *cheA*, *cheM*, *fliC* ve *fliA* genlerinin tamamı, *Salmonella*'nın *in-vivo* ve *in-vitro* fazlarında farklı regülasyon stratejileri ile üretimi aktive edilen ya da baskılanan proteinleri kodlamaktadır. *dps* geni oksidatif strese karşı dirençlilikte (103), *fliC* ve *fliA* genleri flagella biyosentezinde (31,104–106), *cheA* ve *cheM* genleri kemotaksinde (107,108) ve *fimA* geni de *Salmonella* tip I fimbriyasının biyosentezinde (109) rol oynamaktadır. *S. Typhimurium*'un da dahil olduğu değişik *Salmonella* serovaryetelerinde, flagellar ve kemotaktik hareketin; hücresel işgal, yangı bölgesinde besince zengin alanlara yönelim ve kolit'in indüksiyonunda rol oynadığı tanımlanmıştır (110–112). Tüm bu verilere rağmen, *Salmonella*'da flagellar ve kemotaktik

hareketin, bu bakterinin virulanslığına etkisi oldukça tartışmalı bir konudur. Zira bazı araştırmacılar özellikle *S. Typhimurium*'da, flagellar ve kemotaktik hareket bakımından mutant suşlarda virulanslığın arttığını belirlemiştir (113–115). Bu çalışmalarda flagellar ve kemotaktik hareketin; *S. Typhimurium* gibi geniş konakçı dizgesine sahip serovaryetelerde hücre içi gibi sistemik bölgelerde, *fliA* geninin (söz konusu özellikleri kodlayan *cheA*, *cheM* ve *fliC* gibi genlerin ifadesinde alternatif bir sigma faktörü olarak davranmaktadır) inhibisyonu yolu ile bloke edildiği saptanmıştır. Çalışmamızda elde edilen ve *marT* geninin *fliA*'nın ifadesini bloke ettiğini gösteren bulgular, bu çalışmalarda elde edilen verilere açıklık kazandırmaktadır. Zira çalışmamızın bulguları; hücre içine giriş sürecine kadar *S. Typhimurium* için önem taşıyan, ancak hücre içi gibi sistemik koşullara patojenin adaptasyonunu olumsuz etkileyen flagellar ve kemotaktik hareketin, MisL ototransporter proteini üretimini indükleyerek patojeni hücre içine girişe hazırlayan MarT regülatör proteininin etkisiyle engellendiğini kanıtlamaktadır.

fimA geni *Salmonella*'da, tip 1 fimbriya olarak tanımlanan fimbriyanın temel yapısal proteinini kodlamaktadır. *Salmonella* serovaryeteleri tarafından üretilen ve 13 farklı operon tarafından kodlanan fimbriyal yapıların tamamı, *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda biyotik ya da abiyotik yüzeylere patojenin tutunmasını yönlendiren temel elemanlardır. Yukarıda flagella ve kemotaktik harekette ifade edildiği gibi, bu yapılar *Salmonella* serovaryetelerinin konakçı hücre içine girişine kadar olan enfeksiyon süreçlerine önemli katkıda bulunmaktadır. Ancak yakın zamana kadar bu yapıların, *Salmonella*'nın konakçı hücre içine girişinden sonra üretilip üretilmediklerine dair bir bilgi mevcut değildi. Ke-Chuan vd. (2013) tarafından yürütülen bir araştırmada, *S. Typhimurium*'un makrofajlara girişinden sonra *fimA*, *fimZ* ve *lrp* genlerinin transkripsiyon oranı düşürülmek suretiyle tip 1 fimbriya sentezinin engellendiği ve bu durumun asidik hücre içi koşullara adaptasyonun sağlanmasına yardımcı olduğu saptanmıştır (116). Çalışmamızda *marT*'nin, *fimA* geninin negatif transkripsiyonel regülatörü olduğunun belirlenmesi, tip 1 fimbriya sentezinin regülasyonuna moleküler düzeyde açıklık kazandırmaktadır.

MarT proteini varlığında transkripsiyonu negatif yönde regüle edilen son gen olan *dps* geni, *Salmonella*'da üremenin durma fazında üretilen (Dps, DNA binding protein in stationary cells) ve DNA'ya bağlanan ferritin (demir depolama proteini) benzeri bir proteini kodlamaktadır. *İn-vivo* ve *in-vitro* koşullarda, özellikle bakteriyel üremenin durma fazına

geçmesine yol açan besinsel yetersizlik ve oksidatif stres gibi olumsuz çevresel etkiler altında üretilen Dps proteini; hem DNA'ya bağlanarak fiziksel koruma sağlamak ve hem de *Salmonella* hücrelerinin söz konusu stres koşullarına dayanıklı hale gelmesini sağlayan gen ifadesini düzenleyerek virülanslığın sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. *dps* geninin regülasyon karakteristikleri üzerine yürütülen çalışmalarda, Dps proteininin *Salmonella*'da 150'nin üzerinde genin negatif ya da pozitif regülasyonuna katıldığı belirlenmiştir (103,117). MarT proteininin *dps* geninin regülasyonuna katıldığına dair çalışmamızda elde edilen veri yeni bir bulgudur. Bu bulgu özellikle *in-vivo* koşullarda *Salmonella* hücrelerinin metabolik regülasyonu açısından önem taşımaktadır. *dps* gen ifadesinin özellikle fagositik koşullarda meydana gelmesi; bu koşullarda MarT üretiminin engellenmesi sonucu *dps* geninin üzerindeki baskılamanın kalkması ile açıklanabilir.

Yukarıda özetlenen veriler; çalışmanın teorisinde de öngörüldüğü gibi, *marT* geninin, *S. Typhimurium*'da global bir regülatör olduğunu ve genellikle *S. Typhimurium*'un patojenitesinde ya da konakçı sistemde kalıcılığında rol oynayan genlerin regülasyonuna katıldığını kanıtlamaktadır.

marT regülasyonu yönünden araştırdığımız genlerin *in-vitro* koşullarda biyofilm üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacı ile; her bir genin içine kanamisin kaseti sokularak bozulan mutantları elde edilmiş ve bu mutantların biyofilm üretme kapasiteleri doğal suşla karşılaştırılmıştır. Bu denemeler sonucunda; doğal suşa oranla biyofilm üretim kapasitesindeki istatistiki açıdan anlamlı düşmeler *fliA* (% 59), *fliC* (% 40), *fimA* (% 46), *fidL* (% 25) ve *misL* (% 25) geni bakımından mutantlar ile arabinoz varlığında *marT* ifadesi sağlanan mutant MZ1627 (% 16) suşunda belirlenmiştir. *misL* ve *fidL* geni mutantlarının *in-vitro* koşullarda biyofilm üretim kapasitesini % 25 oranında düşürdüğü belirlenmesi çok ilginç bulgulardır. Zira bugüne kadar yalnız bir çalışmada *in vitro* koşullarda *marT* ve *fidL* geni transkriptlerinin varlığı belirlenmiş ancak bu transkriptlerin de translasyonlarının gerçekleştirildiğine dair bir çalışma yapılmamıştır (118). Diğer yandan Kroupitski vd. (2013) rekombinaz esaslı *in-vivo* ifade teknolojisini kullandıkları çalışmalarında, MisL ototransporter proteini ifadesininin, *S. Typhimurium*'da *in-vivo* koşullarda biyofilm üretimini negatif yönde etkilediğini belirlemiştir (119). Bu son bulgu, *marT* geninin yüksek düzeyde ifadesi sonucu *in-vitro* koşullarda biyofilm üretiminin engellendiğine dair çalışmamızın verileri ile tam bir uyum göstermektedir. Zira *marT*, MisL ototransporter proteininin birincil transkripsiyonel aktivatörüdür. Ancak mutasyon çalışmalarından elde

ettiğimiz sonuçlar *in-vitro* koşullarda MisL ve FidL proteinlerinin, Vandenbroucke vd. (2011) bulguları ile paralel bir şekilde, düşük oranda da olsa üretildiklerine ve bu seviyede iken, *in-vivo* koşulların aksine, biyofilm oluşumuna katkıda bulduklarına işaret etmektedir (118). MisL ve FidL proteinlerinin, *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi üzerine *in-vivo/in-vitro* faz farklılığından kaynaklanan değişken etkilerinin gerçekte bulunup bulunmadığı, ancak söz konusu genlerin detaylı fonksiyonel analizlerinin yapılması ile mümkün olacaktır.

fliA, *fliC* ve *fimA* mutantlarında saptanan plastik yüzeylerde biyofilm üretimindeki doğal suşa oranla yüksek düşüşler (sırasıyla % 59, % 40 ve % 46), bu genlerin *in-vitro* koşullarda biyofilm oluşumunu önemli ölçüde teşvik ettiğini kanıtlamaktadır. Bu güne değin flagellanın biyofilm üretimine etkisi üzerine *S. Typhimurium*'da yürütülen en detaylı çalışmada; *fliC* geninin kodladığı, *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda üretilen ana flagella filament proteininin (flagellin) *S. Typhimurium* hücrelerinin kolesterole tutunması ve biyofilm üretiminin erken aşamasında indükleyici bir rol oynadığı, ancak biyofilm gelişimi aşamasında inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu durumu biyofilm oluşumunun ilk aşamasında (biyofilmin tutunması) *fliC* geni ifadesinin teşvik edilmesi, biyofilmin gelişimi aşamasında ise baskılanması ile açıklamıştır (31). Çalışmamızda *fliC* geni bozulmuş mutantlarda biyofilm üretim yeteneğinin yüksek düzeyde düşmesi bu hipotezi doğrulamaktadır. Zira bu mutantlarda biyofilm tutunması; *fliC* geninin bozulması sonucu doğrudan ya da *fliC* promotorunu tanıyan sigma faktörünü (sigma S) kodlayan *fliA* geninin bozulması sonucu dolaylı olarak (*fliC* transkripsiyonunun engellenmesi suretiyle), düşük düzeyde gerçekleşmektedir.

marT genini arabinoz teşviki ile yüksek düzeyde ifade eden MZ1627 suşunun biyofilm üretim kabiliyetinin % 16 oranında düştüğünün saptanması; MarT proteini ile negatif yönde regüle edilen *fliA*, *fliC* ve *fimA* genlerinin kümülatif etkisinden kaynaklı olabileceğini akla getirmiştir. Zira bu üç genin mutantlarının biyofilm üretim kapasitelerinin düştüğü yine yaptığımız denemelerde gözlenmiştir.

Flagellar hareket yanında kemotaktik hareketin *E. coli*'nin *in-vitro* biyofilm üretimi üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hareketli fakat kemotaksis yapamayan *CheA-Z* mutantının biyofilm üretme yeteneğinin doğal tip suştan farklı olmadığı

saptanmıştır (72). Çalışmamızda da *cheA* ve *cheM* mutantlarının biyofilm üretimi üzerinde bir etkisi olmadığının belirlenmesi, bu literatür verisini desteklemektedir.

fimA geni *Salmonella* tip-1 fimbriyasının ana alt ünitesini kodlamaktadır. Tip 1 fimbriya, *Salmonella* hücrelerinin özellikle biyotik yüzeylere tutunmasında, diğer adezinlerle birlikte, etkin bir rol oynamaktadır (60,120). *Salmonella*'da Tip-1 fimbriyanın biyofilm üretimine etkisi üzerinde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tip I fimbriya yapısal genleri bozulmuş mutantlarla yürütülen iki çalışmada; *in-vivo* koşullarda biyofilm üretiminin önemli ölçüde engellendiği, ancak aynı durumun *in-vitro* koşullar için geçerli olmadığı saptanmıştır (96,120). Çalışmamızda ise, bu literatür verilerinin aksine *fimA* geninin ve dolayısı ile *Salmonella* tip-1 fimbriyasının plastik (polisitiren) yüzeylerde de biyofilm oluşumunu indüklediği belirlenmiştir. Tip-1 fimbriyanın mannozillenmiş glikoproteinlere bağlanma özgülüğü (120) nedeniyle oldukça şaşırtıcı olan bu bulguyu destekleyen yegane literatür verisi, Teplitky vd (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada yer almaktadır. Araştırmacılar bizim çalışmamızda olduğu gibi, tip-1 fimbriyanın plastik yüzeylerde biyofilm oluşumunu teşvik ettiğini ve tip-1 fimbriya genleri bakımından mutant suşlarda plastik yüzeylerde biyofilm oluşturma kapasitesinin önemli ölçüde düştüğünü saptamıştır (71)(71).

Birbirine, yüzeylere ya da ara yüzeylere bağlı ve bir matriks ile çevrili bakteri popülasyonları olan biyofilmlerin morfortipleri, indikatör boyalar (Kongo kırmızısı ve Commasie Brilliant Blue) içeren agar plaklarında matriks elemanlarının bileşimi ve görünüşüne göre üç ana grup altında toplanmaktadır. Bu morfortipler **rdar** (kırmızı, kuru ve pürüzlü), **pdar** (pembe, kuru ve pürüzlü) ve **bdar** (kahverengi, kuru ve pürüzlü) olarak adlandırılmaktadır. **Saw** (düz beyaz) olarak tanımlanan morfololoji, biyofilm oluşturmeyen bakterilerin agarlı ortamlarda oluşturduğu koloni tipidir. **rdar** morfortipteki biyofilm içerisinde yer alan suşlar matriks bileşeni olarak hem ince agregatif fimbriya ve hem de selülöz, **pdar** morfortipteki biyofilm içerisinde yer alan suşlar sadece selülöz, **bdar** morfortipteki biyofilm içerisinde yer alan suşlar ise sadece ince agregatif fimbriya üretme yeteneğindedir (63,64). Biyofilm oluşturan *Salmonella* suşlarında dominant morfortip **rdar** olarak belirlenmiştir (66,120). Bu çalışmada kullanılan doğal *S. Typhimurium* suşları ve tüm mutantlarda biyofilm yapıları **rdar** morfortipte saptanmıştır. Ancak steromikroskop altında yapılan incelemelerde mutant suşların oluşturdukları **rdar** morfortipteki biyofilmlerin, hem birbirinden ve hem de doğal suştan farklı fenotipik özellikler gösterdiği saptanmıştır. Ancak söz konusu değişimlerin biyokimyasal esasları tanımlanmadıkça,

bunların preparat hazırlama ve mikroskopik inceleme hatalarından mı yoksa bileşimsel değişimlerden mi kaynaklandığını söylemek olası değildir. Bu durumu açıklığa kavuşturabilmek için, Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) gibi hücrenin özellikle biyofilm yapılarının içerdiği biyokimyasal bileşenleri (protein ve selülöz) hakkında bilgi edinmemizi sağlayan ileri analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Salmonella'da biyofilm yapılarının makroskopik olarak değerlendirildiği testlerden bir diğeri ise pelikül yapılarının incelenmesidir. **rdar** morfotipte biyofilm oluşturan suşlar, biyotik ve abiyotik ortamlarda sıvı-hava ara fazında fiziksel çözme işlemlerine (karıştırma gibi) karşı dirençli, sert pelikül yapıları oluşturmaktadır. Bu yetenek sayesinde biyofilm içerisindeki anaerobik ve mikroaerofilik bakterilere üreme ve dolayısı ile biyofilmin gelişimi için avantajlı koşullar sağlanmaktadır. Pelikül yapısının sert oluşu ve sıvı-hava arafazındaki bakteriyel üreme sonucu sıvı ortamda bulanıklık meydana gelmemesi ya da bakteriyel çökelti oluşmaması, söz konusu yapının çevresel stres koşullarına karşı çok dirençli olduğunun işaretleri olarak kabul edilmektedir. Bu özellikte pelikül yapısının oluşumunun, biyofilm üretimi üzerinde etkili genlerin fonksiyonelliğinin ince bir regülasyonuna gereksinim duyduğu belirlenmiştir (8,82,121,122). Bu tez kapsamında incelenen genlerin pelikül yapısı üzerine etkisinin araştırıldığı denemelerde; *rmbA*, *fidL*, *misL*, *yliH*, *fliC*, *yliH* ve *cheM* geni bakımından mutant suşlarda, doğal suş ile karşılaştırıldığında pelikül yapısının özelliklerinde bir değişim meydana gelmediği saptanmıştır. Ancak *fimA*, *slsA*, *fliA*, *dps*, *cheA* ve *wzzB* geni mutantlarında pelikül yapısının oluşmadığı belirlenmiştir. Bu mutantlarda ayrıca selülöz bileşiminde de değişimler meydana geldiği saptanmıştır. Tüm bu veriler; *fimA*, *slsA*, *fliA*, *dps*, *cheA* ve *wzzB* genlerinin *S. Typhimurium*'da pelikül oluşumu üzerinde doğrudan etkili olduğunu gösteren ilk veriler olması ve sıvı-hava ara fazında oluşturulan biyofilmlerin eradikasyonunda yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyacak bir potansiyele sahip olması açısından büyük önem taşımaktadır.

Tez çalışmasının son aşamasında, doğal suşlar ve *marT* ifadesi indüklenen mutantta cam, çelik ve polistiren üzerinde biyofilm oluşturma özellikleri incelenmiş ve *marT* ifadesi indüklenen mutantta tüm yüzeylerde biyofilm üretme yeteneğinin düştüğü belirlenmiştir. Bu bulgu, *marT* geninin biyofilm üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisinin, sadece polistirene özgül olmadığını kanıtlamaktadır.

Çalışmamızın evrensel bilime ve uygulamaya katkı niteliği taşıyan özgün bulgularını aşağıdaki başlıklar altında özetlemek olasıdır:

- 1- *marT* geninin optimal ifadesinin sağlandığı koşullarda *S. Typhimurium*'da biyofilm üretimi düşmektedir. Diğer bir deyişle MarT proteini, biyofilm üretimini negatif yönde etkileyen regülatörlerden biridir.
- 2- *marT* geni *S. Typhimurium*'da, özellikle patojenite ile ilgili yapıların biyosentezini düzenleyen global bir regülatördür.
- 3- *marT* geninin kodladığı MarT proteini sadece pozitif bir transkripsiyonel regülatör değildir. Bazı genler için aynı zamanda negatif transkripsiyonel regülatör olarak da işlev görmektedir.
- 4- *fliA*, *fliC*, *fimA*, *fidL* ve *misL* genleri *in-vitro* koşullarda biyofilm üretimine katkıda bulunmaktadır.
- 5- *fimA*, *slsA*, *fliA*, *dps*, *cheA* ve *wzzB* genleri *S. Typhimurium*'da sıvı-hava ara fazında biyofilm üretimi (pelikül oluşumu) için zorunludur.
- 6- *marT* geni, patojenin hücre içi koşullarda (*in-vivo*) yaşamda kalmasına katkıda bulunan *wzzB* geninin pozitif regülatörüdür.

KAYNAKLAR

1. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *J Clin Invest*. 2001 Apr 1;107(7):775–80.
2. Miller, S. P D. Salmonella species, including Salmonella typhi. Mand Douglas Bennetts Princ Pract Infect Dis. 5th edn. Philadelphia: Churchill Livingstone.; 2000. p. pp. 2344–2363.
3. Şireli UT. Salmonella Enfeksiyonlarına Genel Bakış ve Yasal Uygulamalar. *Türkiye Klin Vet Bilim Derg*. 2010;1(2):114.
4. Hood SK, Zottola EA. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol*. 1997 Jul 22;37(2–3):145–53.
5. Momba MN., Kaleni P. Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Res*. 2002 Jul;36(12):3023–8.
6. Brandl MT. Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety1. *Annu Rev Phytopathol*. 2006;44(1):367–92.
7. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711–45.
8. Møretrø T, Vestby L k., Nesse L l., Storheim S e., Kotlarz K, Langsrud S. Evaluation of efficacy of disinfectants against Salmonella from the feed industry. *J Appl Microbiol*. 2009;106(3):1005–12.
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318–22.
10. Møretrø T, Midtgaard ES, Nesse LL, Langsrud S. Susceptibility of Salmonella isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Vet Microbiol*. 2003 Jul 17;94(3):207–17.
11. Ronner AB. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber.
12. Scher K, Romling U, Yaron S. Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Mar;71(3):1163–8.
13. Akkoç N. Salmonella Typhimurium'un MisL ototransporter proteininin in-vitro üretimi ve protein-protein etkileşimlerinin tanımlanması [Internet] [Doktora Tez]. [Ankara]: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı; 2011. Available from: <http://acikarsiv.ankara.edu.tr/brow>

14. Dorsey CW, Laarakker MC, Humphries AD, Weening EH, Bäumlér AJ. Salmonella enterica serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol.* 2005;57(1):196–211.
15. Tükel Ç, Raffatellu M, Humphries AD, Wilson RP, Andrews-Polymenis HL, Gull T, et al. CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of Salmonella enterica serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol Microbiol.* 2005;58(1):289–304.
16. Tükel Ç, Akçelik M, Jong MF de, Şimşek Ö, Tsolis RM, Bäumlér AJ. MarT Activates Expression of the MisL Autotransporter Protein of Salmonella enterica Serotype Typhimurium. *J Bacteriol.* 2007 May 15;189(10):3922–6.
17. Giannella RA. Salmonella. In: Baron S, editor. *Med Microbiol* [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2013 Jul 29]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>
18. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella Nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2465–7.
19. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 2001 Oct 25;413(6858):852–6.
20. Srivatsan A, Han Y, Peng J, Tehranchi AK, Gibbs R, Wang JD, et al. High-Precision, Whole-Genome Sequencing of Laboratory Strains Facilitates Genetic Studies. *PLoS Genet* [Internet]. 2008 Aug [cited 2013 Jul 16];4(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2474695/>
21. CDC - Surveillance - Salmonella [Internet]. [cited 2013 Jul 17]. Available from: <http://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/surveillance.html>
22. Centers for Disease Control and Prevention C for DC and P (CDC). National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2011 [Internet]. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services; 2011. Available from: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf>
23. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlér AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, et al. Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature.* 1999 Oct 21;401(6755):804–8.
24. Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, et al. Molecular Pathogenesis of Salmonella enterica Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):1–12.
25. Morgan E, Bowen AJ, Carnell SC, Wallis TS, Stevens MP. SiiE Is Secreted by the Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 4-Encoded Secretion System and Contributes to Intestinal Colonization in Cattle. *Infect Immun.* 2007 Mar 1;75(3):1524–33.
26. Ohl ME, Miller SI. SALMONELLA: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annu Rev Med.* 2001;52(1):259–74.

27. Tükel Ç, Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Akçelik M, Bäumlér AJ. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;46(3):320–9.
28. Gülay Z. İnfeksiyon Patogenezi [Internet]. Türk toraks derneği dergisi; Available from: <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/242201114518-03.pdf>
29. Forest C, Faucher SP, Poirier K, Houle S, Dozois CM, Daigle F. Contribution of the stg Fimbrial Operon of *Salmonella enterica* Serovar Typhi during Interaction with Human Cells. *Infect Immun.* 2007 Nov;75(11):5264–71.
30. Wagner C, Hensel M. Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*. In: Linke D, Goldman A, editors. *Bact Adhes* [Internet]. Springer Netherlands; 2011 [cited 2013 Jul 16]. p. 17–34. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0940-9_2
31. Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS. Flagellated but Not Hyperfimbriated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Attaches to and Forms Biofilms on Cholesterol-Coated Surfaces. *J Bacteriol.* 2010 Jun;192(12):2981–90.
32. Belgin Siriken OM. *Salmonella* Patojenite Adaları *Salmonella* Pathogenicity Islands. *Mikrobiyoloji Bül.* 2013;47(1):181–8.
33. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol.* 2004 Sep 24;294(2–3):95–102.
34. Nevola JJ, Stocker BA, Laux DC, Cohen PS. Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect Immun.* 1985 Oct;50(1):152–9.
35. Blanc-Potard A-B, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(3):998–1004.
36. Boekema BKHL, Van Putten JPM, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. Host Cell Contact-Induced Transcription of the Type IV Fimbria Gene Cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):691–700.
37. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998 Sep 1;6(9):370–8.
38. Oomen CJ, van Ulsen P, Van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J.* 2004 Mar 24;23(6):1257–66.
39. Henderson IR, Nataro JP. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1231–43.
40. Kingsley RA, Santos RL, Kestra AM, Adams LG, Bäumlér AJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol.* 2002;43(4):895–905.

41. Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, de Zoete MR, Winter S, Papaconstantinou A, et al. Molecular and Phenotypic Analysis of the CS54 Island of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: Identification of Intestinal Colonization and Persistence Determinants. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):629–40.
42. Jose J, Jähnig F, Meyer TF. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol*. 1995;18(02):378–80.
43. Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, et al. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2004;54(4):994–1010.
44. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JCD. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2003;47(1):103–18.
45. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Villagra NA, Morgado J, Mora GC. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing *S. Typhimurium* SPI-3 Sequences. *PLoS ONE*. 2010 Feb 24;5(2):e9394.
46. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167–93.
47. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JKG. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*. 1995 Ocak;9(1):102–9.
48. Kim J, Park H-D, Chung S. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Mol Basel Switz*. 2012;17(8):9818–34.
49. Gün İ, Ekinci FY. BİYOFİMLER: YÜZEYLERDEKİ MİKROBİYAL YAŞAM. *GIDA*. 2009;34(3):165–73.
50. Stoodley P, deBeer D, Lewandowski Z. Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Aug;60(8):2711–6.
51. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Jun;12(3):185–90.
52. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005 Jan;13(1):20–6.
53. Allison DG. The Biofilm Matrix. *Biofouling*. 2003;19(2):139–50.
54. Jr WMD. Evaluating Adherent Bacteria and Biofilm Using Biochemical and Immunochemical Methods. In: MD YHA, FRSC(C) RJFM, editors. *Handb Bact Adhes* [Internet]. Humana Press; 2000 [cited 2013 Jul 17]. p. 273–83. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-224-1_17
55. Ophir T, Gutnick DL. A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Feb;60(2):740–5.

56. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001 Jan 1;147(1):3–9.
57. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*. 2001;39(6):1452–63.
58. Ledebøer NA, Jones BD. Exopolysaccharide Sugars Contribute to Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on HEp-2 Cells and Chicken Intestinal Epithelium. *J Bacteriol*. 2005 May;187(9):3214–26.
59. Collinson SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, Kay WW. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol*. 1991 Aug;173(15):4773–81.
60. Muller KH, Collinson SK, Trust TJ, Kay WW. Type 1 fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol*. 1991 Aug;173(15):4765–72.
61. Ogasawara H, Yamamoto K, Ishihama A. Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis. *J Bacteriol*. 2011 May 15;193(10):2587–97.
62. Zakikhany K, Harrington CR, Nimtz M, Hinton JCD, Römling U. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*. 2010;77(3):771–86.
63. Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo J-M, Gamazo C, et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol*. 2002;43(3):793–808.
64. Römling U, Rohde M, Olsén A, Normark S, Reinköster J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol*. 2000;36(1):10–23.
65. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U. Bistable Expression of CsgD in Biofilm Development of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. 2010 Jan 15;192(2):456–66.
66. Römling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschäpe H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int J Med Microbiol*. 2003;293(4):273–85.
67. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BMM. Pathways Leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *J Bacteriol*. 2003 Dec 15;185(24):7257–65.
68. Goodier RI, Ahmer BMM. SirA Orthologs Affect both Motility and Virulence. *J Bacteriol*. 2001 Apr 1;183(7):2249–58.

69. Gudapaty S, Suzuki K, Wang X, Babitzke P, Romeo T. Regulatory Interactions of Csr Components: the RNA Binding Protein CsrA Activates *csrB* Transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001 Oct;183(20):6017–27.
70. Boddicker JD, Ledebauer NA, Jagnow J, Jones BD, Clegg S. Differential binding to and biofilm formation on HEp-2 cells by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. *Mol Microbiol.* 2002;45(5):1255–65.
71. Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BMM. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology.* 2006 Nov 1;152(11):3411–24.
72. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 1998;30(2):285–93.
73. Chilcott GS, Hughes KT. Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Dec;64(4):694–708.
74. Wei BL, Brun-Zinkernagel A-M, Simecka JW, Prüß BM, Babitzke P, Romeo T. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2001;40(1):245–56.
75. Römling U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2005 Jun 1;62(11):1234–46.
76. White AP, Gibson DL, Kim W, Kay WW, Surette MG. Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol.* 2006 May 1;188(9):3219–27.
77. Romling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation. *J Bacteriol.* 1998 Feb;180(3):722–31.
78. Römling U, Rohde M. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Nov 1;180(1):91–102.
79. Olsén A, Arnqvist A, Hammar M, Sukupolvi S, Normark S. The RpoS Sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1993;7(4):523–36.
80. Woodward MJ, Sojka M, Sprigings KA, Humphrey TJ. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J Med Microbiol.* 2000 May 1;49(5):481–7.
81. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000 Apr;40(2):175–9.

82. Vestby LK, M?retr? T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm forming abilities of Salmonella are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet Res*. 2009 May 27;5:20.
83. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005 Jun 1;34(3):597–601.
84. Ståhlberg A, Kubista M, Pfaffl M. Comparison of Reverse Transcriptases in Gene Expression Analysis. *Clin Chem*. 2004 Sep 1;50(9):1678–80.
85. Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem*. 2004 Mar 1;50(3):509–15.
86. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer PD med S, Wittwer PDC, Nakagawara DK-I, editors. *Rapid Cycle Real-Time PCR* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2001 [cited 2013 Jul 22]. p. 21–34. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-59524-0_3
87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001 Dec;25(4):402–8.
88. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002 Aug 1;29(1):23–39.
89. Lesic B, Rahme LG. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol*. 2008 Feb 4;9(1):20.
90. Quick & Easy E.coli Gene Deletion Kit,K006 [Internet]. GeneBridges; 2007. Available from: http://cdn.b-bridge.com/products/K006_Protocol.pdf
91. Chia TWR, Goulter RM, McMeekin T, Dykes GA, Fegan N. Attachment of different Salmonella serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol*. 2009 Dec;26(8):853–9.
92. Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M. Effects of Nutritional and Environmental Conditions on Salmonella sp. Biofilm Formation. *J Food Sci*. 2011;76(1):M12–M16.
93. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. 2001 Mar 1;44(2):121–9.
94. Kroupitski Y, Pinto R, Brandl M t., Belausov E, Sela S. Interactions of Salmonella enterica with lettuce leaves. *J Appl Microbiol*. 2009;106(6):1876–85.
95. Romanova IM, Alekseeva NV, Smirnova TA, Andreev AL, Didenko LV, Gintsburg AL. [Biofilm formation by different strains of Salmonella typhimurium in artificial systems]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2006 Aug;(4):38–42.
96. Gonzalez-Escobedo G, Gunn JS. Identification of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Genes Regulated during Biofilm Formation on Cholesterol Gallstone Surfaces. *Infect Immun*. 2013 Oct 1;81(10):3770–80.

97. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA J Am Med Assoc.* 2006 Jul 12;296(2):202–11.
98. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Apr;35(4):322–32.
99. Wang Q, Frye JG, McClelland M, Harshey RM. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol Microbiol.* 2004;52(1):169–87.
100. Carter JA, Blondel CJ, Zaldívar M, Álvarez SA, Marolda CL, Valvano MA, et al. O-antigen modal chain length in *Shigella flexneri* 2a is growth-regulated through RfaH-mediated transcriptional control of the *wzy* gene. *Microbiology.* 2007 Oct 1;153(10):3499–507.
101. Crawford RW, Kestra AM, Winter SE, Xavier MN, Tsohis RM, Tolstikov V, et al. Very Long O-antigen Chains Enhance Fitness during *Salmonella*-induced Colitis by Increasing Bile Resistance. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Sep [cited 2013 Oct 24];8(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3447750/>
102. Hoare A, Bravo D, Martinić M, Valvano MA, Contreras I, Álvarez SA. The normal chain length distribution of the O antigen is required for the interaction of *Shigella flexneri* 2a with polarized Caco-2 cells. *Biol Res.* 2012;45(1):21–6.
103. Halsey TA, Vazquez-Torres A, Gravidahl DJ, Fang FC, Libby SJ. The Ferritin-Like Dps Protein Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Oxidative Stress Resistance and Virulence. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):1155–8.
104. Baker S, Holt K, Whitehead S, Goodhead I, Perkins T, Stocker B, et al. A linear plasmid truncation induces unidirectional flagellar phase change in H:z66 positive *Salmonella* Typhi. *Mol Microbiol.* 2007 Dec;66(5):1207–18.
105. Frye J, Karlinsey JE, Felise HR, Marzolf B, Dowidar N, McClelland M, et al. Identification of New Flagellar Genes of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2006 Mar;188(6):2233–43.
106. Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H, Iino T. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet MGG.* 1990 Apr;221(2):139–47.
107. Parkinson JS. *cheA*, *cheB*, and *cheC* genes of *Escherichia coli* and their role in chemotaxis. *J Bacteriol.* 1976 May;126(2):758–70.
108. Silverman M, Simon M. Chemotaxis in *Escherichia coli*: Methylation of *che* gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Aug;74(8):3317–21.
109. Chessa D, Winter MG, Nuccio S-P, Tukel C, Baumler AJ. *RosE* represses Std fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Mol Microbiol.* 2008 May 1;68(3):573–87.

110. Khoramian-Falsafi T, Harayama S, Kutsukake K, Pechère JC. Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella typhimurium* into HeLa cells. *Microb Pathog.* 1990 Jul;9(1):47–53.
111. Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt W-D. Flagella and Chemotaxis Are Required for Efficient Induction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):4138–50.
112. Stecher B, Barthel M, Schlumberger MC, Haberli L, Rabsch W, Kremer M, et al. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol.* 2008;10(5):1166–80.
113. Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesús J, Rosenkranzt J, Chadfield MS, Thomsen LE. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium*. *BMC Microbiol.* 2013;13:67.
114. Stewart MK, Cummings LA, Johnson ML, Berezow AB, Cookson BT. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 20;108(51):20742–7.
115. Wallar LE, Bysice AM, Coombes BK. The non-motile phenotype of *Salmonella hha ydgT* mutants is mediated through PefI-SrgD. *BMC Microbiol.* 2011;11:141.
116. Wang K-C, Hsu Y-H, Huang Y-N, Chen T-H, Lin J-H, Hsuan S-L, et al. A low-pH medium in vitro or the environment within a macrophage decreases the transcriptional levels of *fimA*, *fimZ* and *lrp* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Biosci.* 2013 Sep;38(3):499–507.
117. Calhoun LN, Kwon YM. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Mar;37(3):261–5.
118. Vandenbroucke V, Croubels S, Martel A, Verbrugghe E, Goossens J, Van Deun K, et al. The Mycotoxin Deoxynivalenol Potentiates Intestinal Inflammation by *Salmonella Typhimurium* in Porcine Ileal Loops. *PLoS ONE [Internet].* 2011 Aug 31 [cited 2013 Oct 30];6(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3166085/>
119. Kroupitski Y, Brandl MT, Pinto R, Belausov E, Tamir-Ariel D, Burdman S, et al. Identification of *Salmonella enterica* Genes with a Role in Persistence on Lettuce Leaves During Cold Storage by Recombinase-Based In Vivo Expression Technology. *Phytopathology.* 2013 Apr;103(4):362–72.
120. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int.* 2012 Mar;45(2):502–31.
121. Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J-M, Gamazo C, Penadés JR, et al. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol.* 2005;58(5):1322–39.

122. Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, Švabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38(5):428–32.

EKLER

EK 1: İzole edilen RNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri

	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
Dt (-)	559	13,9	6,2	2,24	2,14
Dt (+)	580	14,5	6,4	2,27	2,42
Dt (1/2)	495	12,37	5,58	2,22	1,98
Dt (1/4)	563	14	6,39	2,20	1,97
Dt (1/8)	529	13,23	6	2,20	2,0
Dt (1/16)	520	13	5,8	2,24	2,07
Dt (1/32)	540	13,50	6,12	2,21	2,05
MZ1627 (-)	639	15,98	7,08	2,26	2,17
MZ1627 (+)	612	15,3	6,87	2,23	2,12
MZ1627 (1/2)	497	12,42	5,75	2,23	2,01
MZ1627 (1/4)	552	13,8	6,27	2,20	1,97
MZ1627 (1/8)	200	12,50	5,6	2,25	2,22
MZ1627 (1/16)	534	13,36	6,11	2,19	1,97
MZ1627 (1/32)	518	12,95	5,79	2,23	2,11

EK 2: Doğal tip14028 suşunun farklı konsantrasyonlarda arabinoz teşviki sonucunda *marT* ifadesine bağlı gen değişimlerinin Ct değerleri

Gen	Dt (-)	Dt (+)	Dt (1/2)	Dt (1/4)	Dt (1/8)	Dt (1/16)	Dt (1/32)
fliA-1	19,72	19,66	20,16	20,49	18,96	19,05	20,44
fliA-2	19,79	19,71	20,19	20,36	19,07	19,11	19,98
fliC-1	14,68	14,76	16,03	16,01	14,23	14,20	15,26
fliC-2	14,78	14,71	16,12	16,23	14,30	14,24	15,10
dps-1	19,63	19,52	21,02	20,74	19,13	19,22	20,42
dps-2	19,48	19,81	21,06	20,82	19,43	19,68	20,29
fimA-2	15,92	15,14	16,64	16,51	15,35	15,26	16,63
fimA-1	15,82	15,35	16,44	17,42	15,32	15,75	16,71
slsA-1	24,29	23,86	24,93	25,09	23,20	23,73	24,75
slsA-2	24,18	23,92	24,90	25,06	23,10	23,79	24,81
yliH-1	25,77	25,98	25,81	26,55	24,44	24,93	25,55
yliH-2	25,80	25,86	25,97	26,58	24,41	25,04	25,84
cheM-1	20,83	20,52	21,82	21,55	20,57	20,47	21,66
cheM-2	20,90	20,52	21,89	21,71	20,33	20,09	21,75
cheA-1	20,60	20,28	21,72	21,31	20,21	20,07	21,67
cheA-2	20,60	20,72	21,97	21,60	19,90	20,07	21,78
wzzB-1	21,33	20,56	22,10	22,45	21,06	20,94	22,17
wzzB-2	21,57	20,55	22,10	22,57	21,06	21,08	22,21
fidL-1	26,62	25,82	26,93	27,26	24,64	25,92	26,54
fidL-2	26,57	25,74	26,86	27,32	24,92	25,87	26,78
gapA-1	19,45	17,54	19,00	19,65	18,58	19,05	20,44
gapA-2	19,04	17,32	18,96	19,76	18,68	18,81	20,20
misL-1	27,07	26,78	27,54	27,94	24,64	26,97	26,93
misL-2	27,33	26,75	27,50	28,25	24,88	26,70	27,12
rmbA-1	29,63	27,72	27,67	28,59	24,71	27,73	27,51
rmbA-2	27,92	27,57	27,80	28,71	24,55	26,60	27,29
marT-1	26,40	25,59	26,76	27,00	23,87	25,72	26,00
marT-2	26,12	25,74	27,10	27,28	24,12	25,70	26,19

EK 3: MZ1627 suşunun farklı konsantrasyonlarda arabinoz teşviki sonucunda *marT* ifadesine bağlı gen değişimlerinin Ct değerleri

Gen	MZ1627 (-)	MZ1627 (+)	MZ1627 (1/2)	MZ1627 (1/4)	MZ1627 (1/8)	MZ1627 (1/16)	MZ1627 (1/32)
fliA-1	22,29	23,56	23,39	23,25	22,75	22,66	22,15
fliA-2	22,05	23,34	23,02	23,04	22,47	22,21	21,81
fliC-1	15,99	16,92	16,18	16,79	16,27	16,25	15,83
fliC-2	16,10	16,82	16,52	17,10	16,52	16,66	16,47
dps-1	18,96	20,82	20,39	21,11	20,21	20,11	19,59
dps-2	19,04	21,00	20,40	21,03	20,25	19,97	19,60
fimA-2	22,72	23,74	23,35	23,88	23,14	23,05	22,63
fimA-1	22,68	23,67	23,44	23,90	23,01	22,94	23,60
slsA-1	24,80	24,34	23,90	24,72	24,64	24,14	23,86
slsA-2	24,80	24,34	23,90	24,72	24,64	24,14	23,86
yliH-1	24,90	26,60	26,08	26,20	25,34	25,00	24,56
yliH-2	24,88	26,44	26,05	25,84	25,44	24,98	24,34
cheM-1	23,03	23,95	23,60	24,26	24,06	23,30	22,92
cheM-2	22,89	24,24	23,70	24,29	23,65	23,57	23,13
cheA-1	22,89	23,47	22,78	23,48	22,80	22,92	22,84
cheA-2	22,46	23,27	22,70	23,44	22,77	22,52	22,08
wzzB-1	21,86	20,07	20,03	21,02	20,64	20,64	20,58
wzzB-2	21,59	20,14	20,23	20,74	20,58	20,71	20,68
fidL-1	23,88	21,61	20,81	21,72	21,19	21,86	22,6
fidL-2	23,69	21,57	20,83	21,82	21,20	21,98	22,86
gapA-1	17,39	18,29	17,93	18,67	18,22	17,68	17,17
gapA-2	17,68	18,19	17,86	18,97	18,19	18,14	17,50
misL-1	18,64	15,60	15,30	16,12	15,64	16,69	17,51
misL-2	18,79	15,60	14,95	16,00	15,52	16,54	17,52
rmbA-1	19,90	16,74	15,90	16,78	16,32	17,21	18,68
rmbA-2	19,65	16,65	15,95	16,93	16,46	17,21	18,69
marT-1	19,95	16,57	16,25	17,19	16,85	17,99	18,59
marT-2	21,10	16,62	16,43	17,46	17,00	17,96	18,56

EK 4: Doğal suş ve mutantların paslanmaz çelik kupon yüzeyinde biyofilm üretimi değerleri

Suş Adı	kob/4 cm2	kob/cm2	log/cm2
14028	$6,12 \times 10^6$	$1,53 \times 10^6$	6,03
14028 (i)	$5,85 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	6,13
1627	$6,95 \times 10^5$	$1,74 \times 10^5$	5,43
1627 (i)	$4,85 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$	4,53
SL1344	$2,55 \times 10^5$	$6,37 \times 10^4$	4,79
LT2	$3,02 \times 10^5$	$7,55 \times 10^4$	4,78

EK 5: Doğal suş ve mutantların cam yüzeyinde biyofilm üretimi değerleri

Suş Adı	kob/ 2,5 cm2	kob/cm2	log/cm2
14028	$4,80 \times 10^6$	$1,92 \times 10^6$	6,05
14028 (i)	$1,00 \times 10^7$	$4,00 \times 10^6$	6,40
1627	$4,00 \times 10^6$	$1,62 \times 10^5$	5,99
1627 (i)	$1,11 \times 10^6$	$4,47 \times 10^5$	5,43
SL1344	$9,05 \times 10^5$	$3,62 \times 10^5$	5,07
LT2	$1,81 \times 10^6$	$7,23 \times 10^5$	4,88

EK 6: Doğal suş ve mutantların polistiren yüzeyinde biyofilm üretimi değerleri

Suş Adı	kob/ 1,5 cm2	kob/cm2	log/cm2
14028	$7,50 \times 10^8$	$5,00 \times 10^8$	8,72
14028 (i)	$11,75 \times 10^7$	$7,83 \times 10^7$	7,40
1627	$2,33 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$	7,97
1627 (i)	$6,50 \times 10^6$	$4,33 \times 10^6$	6,53
SL1344	$8,50 \times 10^7$	$5,66 \times 10^7$	7,94
LT2	$13,50 \times 10^5$	$9,00 \times 10^5$	5,99

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu YENER İLÇE
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 11/02/1981
Medeni Hali : Evli
Uyruğu : T.C.
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Çankaya Atatürk Anadolu Lisesi, 1999
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2003
Yüksek Lisans : O.D.T.Ü., Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2006
Doktora : Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 2013

İş Tecrübesi

Kurumu : Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü
Görevi : Uzman
Yılları : 2009-

Yayımlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Yazihan N, Ataoglu H, Akcil E, Yener B, Salman B, Aydın C. Midkine secretion protects Hep3B cells from cadmium induced cellular damage. World J Gastroenterol. 2008 Jan 7;14(1):76-80. PMID: 18176965 ISSN: 1007-9327 Atıf Sayısı: 3

Yazihan N, Ataoglu H, Kavas GO, Akyurek N, Yener B, Aydm C. The effect of K-ATP channel blockage during erythropoietin treatment in renal ischemia-reperfusion injury. J Invest Surg. 2008; 21(6):340-7. PMID: 19821201 ISSN: 0894-1939 Atif Sayısı: 1

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Yazihan N, Ataoglu H, **Yener B**, Aydin C. Erythropoietin attenuates hydrogen peroxide-induced damage of hepatocytes. Turk J Gastroenterol. 2007 Dec;18(4):239-44. PMID: 18080920 ISSN: 1300-4948

Mizrak D, Engin B, Onder FO, **Yener B**, Bektaş M, Biyikli Z, Idilman R, Cinar K, Karayalçin K, Ersöz S, Karayalçin S, Ozden A, Yurdaydin C, Yazihan N, Ataoglu H, Bozkaya H, Uzunalimoğlu O. Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey. Turk J Gastroenterol. 2009 Sep; 20(3):192-7. PMID: 19821201 ISSN: 1300-4948 Atif Sayısı: 2

Uluslararası Kongrelerde Basılan Bildiriler:

Yazihan, N., Ataoglu, H., Ozelci Kavas, G., Akyurek, N., **Yener, B.** Ve Aydın, C. “Involvement of ATP Dependent K Chanannels In Prototective Role Of Erythropoietin and Midkine During Renal Ischemia Reperfusion Injury.”, Apoptosis World 2008:From Mechanisms to Applications Congress, Luxembourg, 2008

Yazihan, N., Bozkaya, H., Ataoglu, H., **Yener, B.**, Uzunalimoglu, O. “PPAR Agonists Protects Hepatocytes From H2O2 Toxicity By Decreasing Galectin-1 Production.”, Apoptosis World 2008:From Mechanisms to Applications Congress, Luxembourg, 2008.

B. Yener İlçe, M. Akçelik, N. Akçelik. “The effect of induced MarT expression on biofilm production of Salmonella typhimurium”, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

E. Günes Altuntas, M. Diani, M.N. Badali, **B. Yener İlçe**, N. Akçelik, M. Akçelik. “Comparison of two different evaluation methods for biofilm formation of bacteria isolated from teeth” 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.