

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SALMONELLA TYPHIMURIUM'DA CsgD REGÜLASYONUNUN OTOİNDÜKTÖR-2
AKTİVİTESİNE VE QUORUM SENSİNG İLİŞKİLİ KÜÇÜK RNA'LARIN
EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Melih AŞAN

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Nefise Akçelik

Ocak

2022

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.

Melih Aşan

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Salmonella Typhimurium'da CsgD Regülasyonunun Otoindüktör-2 Aktivitesine ve Quorum Sensing İlişkili Küçük RNA'ların Ekspresyon Seviyelerine Etkilerinin Belirlenmesi

Melih AŞAN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

İnsanlarda gıda kaynaklı hastalıklarda en sık karşılaşılan patojen olan *Salmonella* Typhimurium, bulunduğu yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu sayede; çeşitli çevresel stres koşullarına, konak bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere karşı büyük ölçüde direnç gösterir. *S. Typhimurium* biyofilmleri, hücre dışı matriks bileşenleri olan kıvrımlı fimbriya ve selülozun ekspresyonu ile karakterize edilir. Transkripsiyonel regülatör olan CsgD, bu yapıların biosentezini aktive ederek bakteri hücrelerinin planktonik yaşamdan biyofilm formuna geçişini sağlar. Güncel bilgiler, küçük RNA'lar (sRNA'lar) ve Quorum Sensing (QS) sisteminin bu süreçte önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Bu tez, *S. Typhimurium* biyofilmlerinin ana regülatörü *csgD* ile QS sinyalizasyonu arasındaki ilişkinin ilk ipuçlarını ortaya çıkarmayı amaçlamıştır. Öncelikle, *S. Typhimurium*'da *csgD*'nin ifadesi kontrol altına alınarak QS ilişkili olduğu bilinen MicA, CsrB, CsrC ve RyeE adlı sRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkisi belirlenmiştir. qRT-PZR analizlerine göre, araştırılan sRNA'ların tümü, *csgD* ifadesine bağlı olarak yukarı doğru düzenlenmiştir. Dolayısıyla *csgD* geni, incelenen dört sRNA'nın pozitif regülasyonu açısından önemli bir role sahiptir. Çalışmanın diğer aşamasında, QS sinyalizasyonunu sağlayan AI-2 aktivitesinin *csgD* ifadesine bağlı olarak değişimi saptanmıştır. Sonuçlar, *csgD*'nin aşırı ifade edildiği suşun, 4 saatlik inkübasyonun ardından en yüksek (% 277) bağlı AI-2 aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bunu takiben, *csgD* ifadesinin AI-2'nin hücre içine alınımında görevli Lsr taşıma sisteminde yer alan *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ifadeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En yüksek AI-2 aktivitesine sahip olduğu belirlenen suşta, yalnızca *lsrK* ifadesinin artışı gözlenmiştir. Dolayısıyla *csgD*'nin AI-2 aktivitesi üzerindeki pozitif etkisini, Lsr taşıma sisteminde yer alan genler üzerinden gerçekleştirmediği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, *csgD*'nin LuxS tarafından gerçekleştirilen AI-2 sentezi sürecinde pozitif bir regülasyona sebep olabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Öte yandan *csgD* eksikliğinin *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* ifadelerinin tamamında artışa sebep olduğu ancak AI-2 aktivitesinde önemli bir değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir. Bu durumda, LsrR'nin, QS süreci üzerindeki bilinen negatif etkisi, *lsrA* ve *lsrK* ifadelerindeki güçlü artış sebebi ile kompanse edilmiş gibi görünmektedir. Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında, CsgD'nin *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumundaki rolüne benzer olarak QS sinyal ileti yolağında da pozitif bir etkisi olduğunu bildiriyoruz. Biyofilm oluşumu ile QS sinyalizasyonu arasındaki ilişkinin tam bir resminin elde edilmesi yalnızca transkripsiyon faktörlerinin değil aynı zamanda düzenleyici sRNA'ların bu süreçteki rollerinin açıklanması ile mümkündür. Ayrıca bu tip düzenleyici mekanizmaların aydınlatılması, bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi amacıyla yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2021, 115 sayfa

Anahtar kelimeler: *Salmonella*, biyofilm, CsgD, Quorum sensing, AI-2, küçük RNA.

ABSTRACT

Master Thesis

Determination of the Effects CsgD Regulation on Autoinducer-2 Activity and Expression Levels of Quorum Sensing Related Small RNAs in *Salmonella* Typhimurium

Melih Aşan

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Nefise AKÇELİK

Salmonella Typhimurium is the most common pathogen in foodborne diseases in humans. With its ability to form biofilms on different surfaces, this pathogen shows great resistance to various environmental stress conditions, host immune system and antibiotics. Biofilms formed by *S. Typhimurium* are characterized by the expression of extracellular matrix components, curli fimbriae and cellulose. CsgD, a transcriptional regulator, activates the biosynthesis of these components, allowing bacterial cells to shift from planktonic life to sessile life. Current literature shows that small RNAs (sRNAs) and Quorum Sensing (QS) system play important roles in this process. This thesis aimed to reveal the first clues of the relationship between CsgD, the master regulator of *S. Typhimurium* biofilms, and QS signaling. First of all, by controlling the expression of *csgD* in *S. Typhimurium*, its effect on the expression levels of MicA, CsrB, CsrC and RyeE sRNAs, which are known to be related to QS, were determined. Based on qRT-PCR analyses, the expressions of all investigated sRNAs were upregulated depending on *csgD* expression. Thus, the *csgD* gene has an important role in the positive regulation of the four sRNAs studied. In the other phase of the study, the effect of *csgD* expression on the activity of the QS signalling molecule was determined. Our results showed that the strain in which *csgD* was overexpressed had the highest (277 %) relative AI-2 activity after 4 hours of incubation. Following this, the effects of *csgD* expression on the expressions of *lsrA*, *lsrK* and *lsrR* genes, which are involved in the Lsr transport system involved in the uptake of AI-2 into the cell, were investigated. In the strain known to have the highest AI-2 activity, only increased expression of *lsrK* was observed. Therefore, we concluded that *csgD* did not exert its positive effect on AI-2 activity through the genes involved in the Lsr transport system. This result strengthens the hypothesis that *csgD* may cause a positive regulation of the AI-2 synthesis process by LuxS. On the other hand, *csgD* deficiency caused an increase in all *lsrA*, *lsrK* and *lsrR* expressions, but did not cause a significant change in AI-2 activity. Thus, the known negative effect of LsrR on the QS process appears to be compensated for by the significant increase in *lsrA* and *lsrK* expressions. Taken together, we report that CsgD has a positive effect on the QS signal transduction pathway, similar to its role in biofilm formation in *S. Typhimurium*. Obtaining a complete picture of the relationship between biofilm formation and QS signaling is possible by revealing not only the roles of transcription factors but also regulatory sRNAs in this process. In addition, elucidating such regulatory mechanisms will help develop new strategies for the prevention of biofilm related bacterial infections.

2021, 115 pages

Keywords: *Salmonella*, biofilm, CsgD, Quorum sensing, AI-2, small RNA.

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanım Doç. Dr. Nefise Akçelik'e bana böyle ilginç bir projede çalışma şansı verdiği için teşekkür ederim. Sizden danışmanlık aldığım için çok ayrıcalıklı oldum. Bana laboratuvarınızda mükemmel çalışma koşulları sağladığınız için, yeteneklerime inandığınız ve yaptığımız her sohbetten sonra kendime daha çok güvenmemi sağladığınız için çok teşekkür ederim. Tüm bunların yanı sıra göstermiş olduğunuz sevgi ve hoşgörünüz için sonsuza dek minnettar olacağım.

Sonuçlarımı eleştirmede oldukça etkili olan Prof. Dr. Mustafa Akçelik'e çok değerli yorumları için teşekkür ederim ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı üyelerine tüm yardımları için minnettarım.

Tez çalışmamın 21L0415001 numaralı proje olarak desteklenmesini sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Çok değerli laboratuvar arkadaşım Nasrine Bekhedda, iyi bir arkadaş ve inanılmaz bir laboratuvar ortağı olduğun için teşekkür ederim. Çalışmamın çeşitli aşamalarında bana yardımcı olan ve her zaman farklı fikirler sunan Sümeyye Altunok'a teşekkür ederim. Laboratuvara uyum sağlamamda emeği olan ve öğrendiği teknikleri benimle paylaşan çalışma arkadaşım Betül Cansu Yazıcı'ya teşekkür ederim.

'Zaman geçtikçe büyümüyoruz da sanki bölünüyoruz. Belirli anılara belirli kişilere veriyoruz kendimizde olan parçaları ve onlar orada kalıyor. Ölene dek binlerce parça halindeyiz; farklı yıllarda, farklı yüzlerde'. Benim için bu parçalardan en büyüğüne sahip olan başta annem olmak üzere aileme ve İrem Özdemir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1. SALMONELLA CİNSİNE GENEL BAKIŞ	5
2.1.1. <i>SALMONELLA</i> CİNSİNİN SINIFLANDIRILMASI	6
2.1.2. <i>SALMONELLA</i> ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ	7
2.2. BAKTERİYEL BİYOFİMLER	9
2.2.1. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI	10
2.2.2. <i>SALMONELLA</i> BİYOFİMLERİ.....	12
2.2.2.1. <i>Salmonella</i> Biyofilmlerinin Regülasyonu.....	13
2.2.2.1.1. CsgD	14
2.2.2.1.2. c-di-GMP Sinyalizasyonu.....	16

2.2.2.1.3. QS	16
2.3. BAKTERİYEL KÜÇÜK RNA'LAR	18
2.3.1. SRNA'LARIN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİLERİ	20
2.3.2. QUORUM SENSİNG İLİŞKİLİ SRNA'LAR.....	23
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>27</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>29</u>
4.1. MATERYAL	29
4.1.1. BAKTERİLER VE PLAZMİD	29
4.1.1.1. Gelişme Koşulları	29
4.1.2. BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER	30
4.1.3. PRİMERLER	31
4.2. YÖNTEM.....	32
4.2.1. <i>CSGD</i> GENİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI.....	32
4.2.1.1. Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu.....	32
4.2.1.2. <i>csgD</i> Geninin PZR İle Amplifikasyonu.....	33
4.2.1.3. PZR Ürününün RE Enzim Kesim Reaksiyonu İle Doğrulanması	34
4.2.1.4. pBAD24 Plazmid DNA'sının İzolasyonu.....	35
4.2.1.5. RE Enzim Kesim Reaksiyonları	36
4.2.1.6. Ligasyon.....	37
4.2.2. REKOMBİNANT PLAZMİDİN TRANSFORMASYONU	37
4.2.2.1. Elektrokompentan <i>S. Typhimurium</i> 14028Δ <i>csgD</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	38
4.2.2.2. Rekombinant Plazmidin Elektroporasyonu	38

4.2.2.3. Rekombinant Kolonilerin PZR İle Doğrulanması	39
4.2.2.4. Rekombinant Plazmidlerin Doğrulanması.....	40
4.3. CSGD REGÜLASYONUNA BAĞLI OLARAK QS İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ.....	41
4.3.1. TOPLAM RNA İZOLASYONU.....	41
4.3.2. cDNA SENTEZİ.....	42
4.3.3. GEN İFADE DÜZEYLERİNİN QRT-PZR İLE BELİRLENMESİ.....	43
4.3.4. QRT-PZR VERİ ANALİZİ.....	45
4.3.4.1. Göreceli Kantifikasyon	45
4.3.4.2. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) Metodu.....	45
4.4. SALMONELLA'DA CSGD REGÜLASYONUNUN AI-2 AKTİVİTESİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....	46
4.4.1. SUŞLARDAN SÜPERNATANT ELDESİ.....	46
4.4.2. SUŞLARIN AI-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	46
<u>5. İSTATİSTİKİ ANALİZLER</u>	<u>47</u>
<u>6. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>48</u>
6.1. CSGD GENİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI.....	48
6.1.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU VE CSGD GENİNİN AMPLİFİKASYONU.....	48
6.1.2. PLAZMİD DNA İZOLASYONU	50
6.1.3. RE ENZİM KESİM REAKSİYONLARI.....	51
6.2. CSGD GENİNİ İFADE EDEN S. TYPHIMURIUM 14028 SUŞUN ELDESİ.....	52
6.2.1. REKOMBİNANT PLAZMİDİN ELEKTROPORASYONU.....	52
6.2.2. REKOMBİNANT PLAZMİDLERİN İZOLASYONU VE DOĞRULANMASI.....	55
6.3. SALMONELLA SUŞLARININ AI-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	57

6.4. CSGD REGÜLASYONUNA BAĞLI OLARAK QS İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ.....	58
<u>7. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	65
<u>8. KAYNAKLAR</u>	77
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	95
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Salmonella</i> 'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü	5
Şekil 2.2. <i>Salmonella</i> cinsinin sınıflandırılması	7
Şekil 2.3. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma aşamaları.....	11
Şekil 2.4. <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin rdar morfoloji	13
Şekil 2.5. <i>S. Typhimurium</i> 'da CsgD aracılı biyofilm oluşumunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi	15
Şekil 2.6. <i>Salmonella</i> 'da AI-2 aracılı QS mekanizması	18
Şekil 2.7. Trans-kodlu ve cis-kodlu sRNA'ların genomik lokasyon farklılıklarının hedeflerine etkisi.....	19
Şekil 2.8. sRNA'ların Hfq ile ilişkisi ve hedef mRNA'lara etki mekanizmaları	20
Şekil 2.9. CsgD'yi kontrol eden genetik mekanizmaların biyofilm oluşumu ve hücre hareketliliği üzerine etkileri.....	22
Şekil 2.10. <i>Vibrio</i> türlerinde QS sisteminin Qrr'ler tarafından düzenlenmesi	24
Şekil 2.11. CsrA aktivitesinin CsrB tarafından düzenlenmesi	26
Şekil 4.1. pBAD24 plazmidinin genetik haritası.....	35
Şekil 6.1. <i>S. Typhimurium</i> 14028 genomik DNA'sının agaroz jel görüntüsü	48
Şekil 6.2. <i>csgD</i> PZR ürününün EcoRV enzimi ile kesilmesi sonucu meydana gelen DNA fragmentlerinin büyüklükleri.....	49
Şekil 6.3. <i>csgD</i> geni PZR ürününün agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 6.4. pBAD24 plazmidinin agaroz jel görüntüsü.....	51

Şekil 6.5. pBAD24 plazmid vektörü ve <i>csgD</i> geninin ikili RE enzim kesimi agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 6.6. <i>S. Typhimurium</i> 14028Δ <i>csgD</i> suşuna ligasyon ürünlerinin transformasyonu ile elde edilen kolonilerin seçici antibiyotik içeren LB agar ortamında gelişimi.	53
Şekil 6.7. Koloni PZR ile hedef geni içeren transformant kolonilerin belirlenmesi	54
Şekil 6.8. Koloni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	55
Şekil 6.9. <i>csgD</i> PZR ürününün pBAD24 plazmidine insersiyonu ile elde edilen rekombinant plazmidin EcoRV enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan DNA fragmentleri	56
Şekil 6.10. Seçilen kolonilerden izole edilen plazmid DNA'sı ve EcoRV enzim kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 6.11. <i>Salmonella</i> suşlarının 4 saatlik bağıl AI-2 aktivitesi.....	58
Şekil 6.12. <i>Salmonella</i> suşlarından izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel görüntüsü ..	59
Şekil 6.13. qRT-PZR denemelerinde gerçekleştirilen standardizasyon işleminin sonuçlar.60	
Şekil 6.14. <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan genlerin doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği	62
Şekil 6.15. Arabinoz varlığında ve yokluğunda <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan genlerin log2 kat değişim grafiği.....	63
Şekil 6.16. <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan Lsr taşıma sisteminde görevli genlerin ifade düzeylerinin doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği	64
Şekil 7.1. <i>Salmonella</i> 'da <i>crp/cya</i> tarafından aktive edilen <i>sirA</i> 'nın düzenleyici rolü	67
Şekil 7.2. CsgD ile CsrA arasındaki ilişkinin <i>Salmonella</i> 'daki hücresel süreçlere etkileri..69	
Şekil 7.3. QS ilişkili sRNA'ların hedefleri ve hücredeki fizyolojik etkileri.....	72
Şekil 7.4. <i>S. Typhimurium</i> 'da CsgD regülasyonunun biyofilm oluşumu, QS ilişkili sRNA'lar ve AI-2 aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkileri.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar	30
Çizelge 4.2. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)	30
Çizelge 4.3. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium) (devamı).....	30
Çizelge 4.4. Stok Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu	31
Çizelge 4.5. qRT PZR yöntemi ile ifade düzeylerindeki değişimlerin araştırıldığı genler ve bu genlere ait primer dizileri	31
Çizelge 4.6. <i>csgD</i> geninin PZR ile çoğaltılması amacıyla kullanılan primer çifti	32
Çizelge 4.7. pBAD24 vektörüne klonlanan genin doğrulanması amacıyla kullanılan koloni PZR primeri	32
Çizelge 4.8. <i>csgD</i> geninin amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı	33
Çizelge 4.9. <i>csgD</i> geninin amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüsü.....	34
Çizelge 4.10. PZR ürünü olan <i>csgD</i> geni için EcoRV RE kesim reaksiyon karışımı	34
Çizelge 4.11. PZR ürünü <i>csgD</i> geni için ikili RE kesim reaksiyon karışımı	36
Çizelge 4.12. pBAD24 vektör DNA için ikili RE kesim reaksiyon karışımı	36
Çizelge 4.13. Ligasyon reaksiyonu karışımı	37
Çizelge 4.14. Koloni PZR için kullanılan reaksiyon karışımı.....	39
Çizelge 4.15. Koloni PZR için kullanılan sıcaklık döngüsü	40
Çizelge 4.16. Rekombinant plazmidlerin kesiminde kullanılan EcoRV RE reaksiyon karışımı	40
Çizelge 4.17. Denatürasyon karışımı.....	42
Çizelge 4.18. Ters transkripsiyon karışımı.....	43

Çizelge 4.19. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü	43
Çizelge 4.20. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı	44
Çizelge 4.21. LightCycler 480 cihazında kullanılan qRT-PZR program	44
Çizelge 6.1. qRT-PZR denemelerinde kullanılan primer çiftlerinin amplifikasyon verimlilikleri	60
Çizelge 6.2. <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan sRNA'ların ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı	61
Çizelge 6.3. <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan sRNA'ların normalize edilmiş gen ifade seviyelerinin log2 tabanındaki değerleri	61
Çizelge 6.4. Arabinoz konsantrasyonuna bağlı olarak test gruplarında araştırılan sRNA'lar ve <i>csgD</i> ifade seviyelerinin log2 kat değişimleri	63
Çizelge 6.5. <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan AI-2 moleküllerinin hücre içine alımında görevli genlerin normalize edilmiş ifade seviyelerinin log2 tabanındaki değerleri	64
Çizelge 7.1. Tez çalışmasında araştırılan sRNA'ların bazı önemli hedefleri.	71

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
AB Broth	Otoindüktör biyoanaliz besiyeri
AHL	Açıl homoserin lakton
AI-2	Otoindüktör-2
AIP	Otoindüktör peptit
ATCC	American Type Culture Collection
bç	Baz çifti
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
c-di-GMP	Siklik diguanilat monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik döngüsü
ddH ₂ O	Çift distile su
DGC	Diguanilat siklaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP.	Deoksinükleotid trifosfat.
eDNA	Hücre dışı deoksiribonükleik asit

EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	Hücre dışı polimerik maddeler
EtBr	Etidyum bromür
g	Gram
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
HCD	Yüksek hücre yoğunluğu
kb	Kilobaz
LB	Luria-Bertani
LCD	Düşük hücre yoğunluğu
log	Logaritma
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ng	Nanogram
NK	Negatif kontrol
OD	Optik yoğunluk
ORF	Açık okuma çerçevesi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PDE	Fosfodiesteraz
pH	Hidrojen gücü

PGA	Poli-N-asetilglukozamin
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Qrr	Quorum düzenleyici ribonükleik asit
qRT-PZR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Quorum sensing
RBS	Ribozom bağlanma bölgesi
RE	Restriksiyon endonükleaz
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SPI	<i>Salmonella</i> patojenite adaları
sRNA	Küçük ribonükleik asit
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
UTR	Kodlanmayan bölge
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Salmonella cinsi bakteriler, insan ve kanatlı hayvanlar dahil olmak üzere çok çeşitli konaklarda hastalığa neden olabilen enterik patojenlerdir. *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan bu cins bakteriler, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ve *Salmonella bongori* (*S. bongori*) olmak üzere iki geniş türü kapsamaktadır. *S. enterica*'ya ait serovarların çoğu ise bakteriyel gıda kaynaklı hastalıkların en sık karşılaşılan sebebidir. Dahası, *Campylobacter*'den sonra, insan gastrointestinal sistem enfeksiyonlarından en çok sorumlu olan ikinci patojenlerdir (1,2).

Salmonella cinsinin üyeleri, doğada sadece planktonik hücreler olarak değil, aynı zamanda yüzeylere bağlı çok hücreli formlar olarak da bulunurlar. Biyofilm olarak adlandırılan bu yaşam formunda bakteriler, kendilerinin ürettikleri hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ile çevrili yüzeye gömülü bir şekilde yaşamlarına devam ederler. Biyofilm içerisinde yaşayan bakteriler; fagositoza, immün efektörlere ve antibiyotiklere karşı büyük ölçüde artan direnç gösterirler. Bu direncin büyük bir kısmı, hücresel bağışıklığa karşı güçlü bir fiziksel engel oluşturan ve ortadan kaldırılması son derece güç olan EPS yapısından ileri gelmektedir. EPS bakteri türleri arasında yapısal olarak çeşitlilik gösterse de; genellikle su, proteinler, polisakkaritler ve hücre dışı DNA (eDNA) içermektedir. EPS yapısı, bakterilerin gelişimlerini sağladığı mikroçevrelerini oluşturduğundan, konakçı hücre ile ilk etkileşime giren yapıdır. Bu nedenle, EPS'nin antimikrobiyallere ve bağışıklık sistemine karşı nasıl koruma sağladığını anlamak çok önemlidir (3,4). Biyofilmlerin, hastaneye yatış oranlarını, sağlık bakım maliyetlerini ve morbidite ve mortaliteyi artıran kronik enfeksiyonların yaklaşık % 80'inde yer aldığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, yüksek derecede tıbbi ve ekonomik etkileri vardır (5).

Salmonella biyofilmleri iki ana bileşenden meydana gelmektedir; protein yapısındaki curli (ince agregatif fimbriya) ve selüloz (6). Curli ve selülozun ekspresyonu ile birlikte hücreler oldukça kararlı bir yapı oluşturacak şekilde bir araya gelirler ve EPS matriksine sıkı bir biçimde tutunurlar (7). *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) biyofilmleri, kıvrımlı fimbriya ve selüloz sentezi sonucu, rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) olarak adlandırılan koloni morfolojii oluşturmaktadır (8). Selüloz ve kıvrımlı fimbriyaların ekspresyonu, transkripsiyonel regülatör olan CsgD'ye bağlıdır (9). *csgD*, kıvrımlı fimbriyalar için yapısal

alt birimleri kodlayan *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu pozitif olarak düzenler ve *adrA* transkripsiyonunu aktive ederek dolaylı olarak selüloz üretimine katkıda bulunur (7,8). AdrA ve di-guanilat siklazlar, ikincil mesajcı siklik diguanilat monofosfat (c-di-GMP) molekülünün üretilmesini uyararak selüloz üretiminin başlamasını sağlar (10,11). Bu sebeple *csgD*, biyofilm yapısının oluşumunu pozitif yönde regüle eden ana elemandır (12).

Biyofilm oluşumu, çevresel sinyallerle düzenlenen ve çok sayıda genin regülasyonunun gerçekleştiği dinamik bir süreçtir. Güncel bilgiler, Gram negatif bakterilerin çoğunda, biyofilm oluşumunun ana düzenleyicilerinin Quorum Sensing (QS) sistemi, c-di-GMP molekülleri ve bakteriyel küçük RNA'lar (sRNA'lar) olduğunu işaret etmektedir (13).

QS sistemi, hücreler arası iletişim için kullanılan ve otoindüktör (AI) olarak adlandırılan bakterinin kendi ürettiği küçük sinyal moleküllerine dayanan özel bir dil olarak kabul edilir. Populasyondaki bakteri sayısına bağlı olarak AI'ların konsantrasyonu bir eşik seviyesine ulaştığında, bakteriler kritik kütlelerini hissetmeye ve hedef genleri baskılayarak veya aktive ederek cevap vermeye başlar (14). Günümüzde, bakterilerin çeşitli sinyal molekülleri kullanarak hem tür içi hem de türler arası iletişime geçebildikleri bilinmektedir (15). Gram negatif bakteriler ağırlıklı olarak N-açıl homoserin lakton (AHL) moleküllerini (AI-1), Gram pozitif bakteriler ise modifikasyona uğramış peptitleri (AIP) kullanarak birbirleri ile iletişime geçmektedir. Üçüncü bir AI türü olan AI-2 molekülü ise hem Gram negatif hem Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenip algılanarak türler arası iletişimi sağlamaktadır (16).

S. Typhimurium'da LuxS tarafından sentezlenen AI-2 molekülü, logaritmik üreme fazında sentezlenip salınır ve ardından ABC transporter (ATP-binding cassette) aracılığıyla bakterilere aktarılır (17). Bu sinyal molekülü, biyofilm oluşumu, hücre bölünmesi, hareketlilik ve virülans gibi hücre davranışlarının düzenlenmesinde anahtar bir rol oynar (18). *Salmonella*, QS mekanizması sayesinde stres moleküllerini tespit edebilir, virülans faktörlerinin ekspresyonunu aktive edebilir ve konakçı hücrede kolonizasyon başarısını artırabilir (19).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, *Salmonella*'da biyofilm oluşumunun ana regülatörü olan CsgD'nin, sRNA'lar ve RNA şaperonu Hfq tarafından da kontrol edildiğini göstermektedir (20,21). sRNA'lar, özellikle stres koşullarında transkripsiyon sonrasında

protein sentezini doğrudan etkileyen ve gen ekspresyonuna önemli etkileri bulunan regülatörlerdir (22). Yaklaşık 30-500 nükleotid uzunluğunda olan sRNA'lar, hücrel metabolizmadaki değişikliklerin modüle edilmesine yardımcı olurlar. Transkripsiyonu, translasyonu ve mRNA (mesajcı ribonükleik asit) stabilitesini modüle edebilirler (23). CsgD'nin transkripsiyonel regülasyonuna ek olarak, çevresel sinyallerin etkisiyle sentezlenen en az beş adet Hfq-bağımlı sRNA (McaS, RprA, OmrA/OmrB, GcvB) tarafından mRNA seviyesinde regüle edildiği bilinmektedir. Söz konusu sRNA'ların tümü *Salmonella* ile yakın akraba olan *Escherichia coli* (*E. coli*) *csgD* mRNA'sının 5'-UTR (mRNA'nın translasyonu yapılmayan 5' ucu) bölgesi ile baz eşleşmesi yaparak, RBS'yi (ribozom bağlanma bölgesini) kapatıp translasyonun başlamasını engelledikleri gösterilmiştir (24).

sRNA'ların, bakterilerde QS sistemini ve dolayısı ile biyofilm oluşumunu regüle ettiği yönünde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *Salmonella*'daki QS sisteminin regülasyonundaki rolleri hala bilinmemekle birlikte, bazı bakteri gruplarında yapılan çalışmalar, transkripsiyon sonrası regülasyonu nasıl gerçekleştirdiklerini açıkça göstermektedir. Örneğin, Gram negatif bakterilerde bulunan Csr (karbon depolama regülatörü) sistemi; hücre hareketliliği, QS, biyofilm gelişimi ve virülans da dahil olmak üzere birçok özelliği regüle eder. Bir RNA bağlayıcı protein olan CsrA, üreme fazına geçişi teşvik eder. CsrB ve CsrC olarak adlandırılan sRNA'lar ise CsrA proteinine bağlanır ve etkilerini antagonize eder (25). 2004'de Lenz ve ark.'ları *Vibrio cholerae*'da QS sistemini regüle eden dört sRNA keşfetmişlerdir (26). Bu RNA'lar genel olarak Qrr1-4 (quorum düzenleyici RNA) olarak adlandırılmıştır ve bu keşif sRNA'ların önemini artırmış olup, ilerleyen yıllarda sRNA'lar üzerinde daha fazla çalışmanın gerçekleştirilmesini tetiklemiştir. 2007'de, Tu ve Bassler, tarafından *V. harveyi*'de QS sistemini kontrol eden beş adet Qrr daha tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (27). 2009'da De Lay ve Gottesman tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, RyeE (CyaR) isimli bir sRNA'nın doğrudan *luxS* geninin de dahil olduğu birçok geni negatif olarak etkilediği gösterilmiştir (28). 2010'da ise Kint ve ark.'ları tarafından *S. Typhimurium* *luxS* geni bakımından mutant suşlarla gerçekleştirilen bir çalışmada, biyofilm oluşumunun MicA adı verilen bir sRNA'dan etkilendiğini göstermişlerdir. Bu çalışma sonucunda, *luxS* mutantlar ile doğal tip suşlar arasında MicA ekspresyon seviyesi bakımından, yüksek düzeyde bir farklanma belirlenmiştir (29).

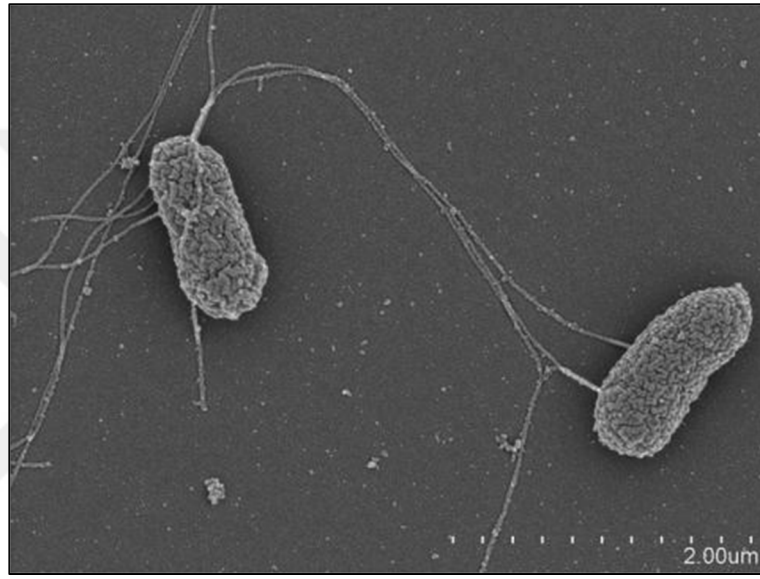
QS sisteminin regülasyonunu önemli ölçüde etkileyen sRNA'ların mevcudiyeti, biyofilm oluşumunun kompleks ve dinamik bir düzenleyici ağ tarafından kontrol edildiğini gözler önüne sermektedir. Biyofilm oluşum mekanizmalarının araştırılmasındaki ilerlemeler, biyofilmle ilişkili hastalıkları önlemek ve gıda üretiminde biyofilm kaynaklı *Salmonella*'yı dekontamine etmek için yeni araç ve stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu tez çalışmasında, *S. Typhimurium* biyofilmlerinin ana düzenleyicisi olduğu bilinen *csgD*'nin ifadesi kontrol altına alınması suretiyle hücrede ekspresyonu değişen QS ilişkili sRNA'ların belirlenmesi ve QS sinyalizasyonunu sağlayan AI-2 aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *SALMONELLA* CİNSİNE GENEL BAKIŞ

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına ait Gram-negatif, basil şeklinde bir bakteri cinsidir (Şekil 2.1.). Fakültatif anaerobiktirler. Dolayısıyla hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında üremelerine devam edebilirler. Buldukları ortama bağlı olarak 4 °C ila 54 °C arasında yaşamlarını sürdürebilirler. Üreme optimumları ise, insan vücudunun sıcaklığı olan 37 °C'de gerçekleşir (30).



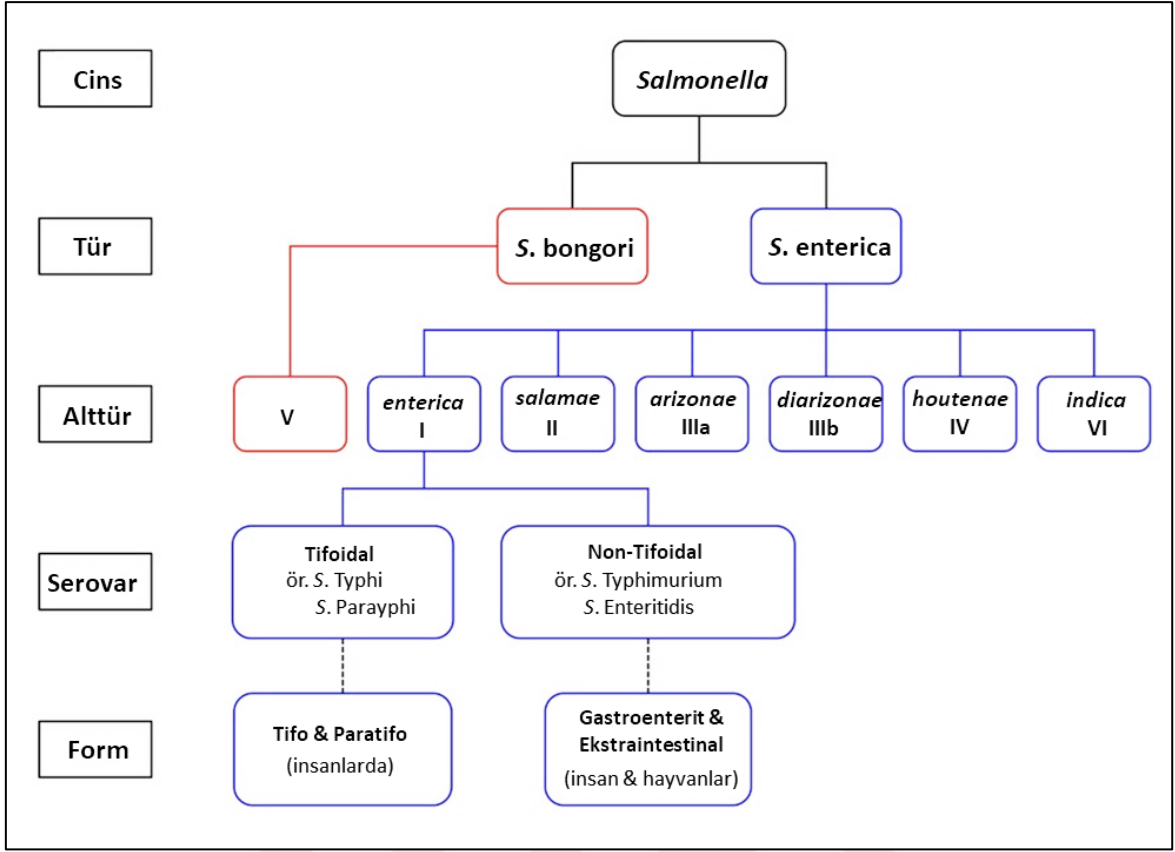
Şekil 2.1. *Salmonella*'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü (31).

Salmonella cinsi bakteriler en sık izole edilen gıda kaynaklı patojenlerdir ve ağırlıklı olarak kümes hayvanları, yumurta ve süt ürünlerinde bulunurlar. *Salmonella*'nın bulaşmasında rol oynayan diğer gıda kaynakları arasında ise taze meyve ve sebzeler yer almaktadır. *Salmonella* cinsi üyeleri, neden oldukları enfeksiyonlarla tıbbi sorunlara ve ekonomik kayıplara yol açtıkları için dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil ederler. Bugüne kadar 2500'den fazla *Salmonella* serotipi tanımlanmıştır. İnsanlar için patojenik olan üç ana serotip: *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium, Enteritidis ve Typhi'dir. Yalnızca insanlar için patojenik olan *S. Typhi* ve *S. Paratyphi*, tifo ateşine neden olurken, diğerleri gastroenterit ve bakteremiye yol açar (32,33).

Salmonella cinsi bakteriler, planktonik formda olabildikleri gibi, abiyotik veya biyotik bir yüzeye yapışmış halde çok hücreli formlar olarak da bulunabilirler. Bakterilerin oluşturdukları bu yaşam formu “biyofilm” olarak adlandırılır (34). Biyofilm oluşumu genellikle pH, sıcaklık, oksijen ve besin mevcudiyeti gibi değişimlerin algılanmasıyla, olumsuz çevresel uyarılara yanıt olarak gerçekleşir. Biyofilmdeki bakteriler antibiyotiklere ve konakçı bağışıklık sistemine daha dirençli olduğundan, biyofilm oluşumu *Salmonella* virülansına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle biyofilm yapısı, özellikle sağlık ve gıda sektöründe önemli problemlere neden olmaktadır (3).

2.1.1. *SALMONELLA* CİNSİNİN SINIFLANDIRILMASI

Salmonella cinsi bakteriler, *Enterobacteriaceae* familyası, *Enterobacteriales* takımı, *Gammaproteobacteria* sınıfı ve *Proteobacteria* şubesinde yer alırlar. Ayrıca taksonomi ve serolojiye dayalı olarak türlere, alt türlere ve serovarlara ayrılmaktadırlar (Şekil 2.2.). *Salmonella* cinsi, 16S rRNA (ribozomal ribonükleik asit) dizi analizlerine göre, daha önce belirtildiği gibi, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ve *Salmonella bongori* (*S. bongori*) olmak üzere iki büyük türe ayrılmıştır. Bu türler, White-Kauffmann-Le Minor şemasına göre flagella (H1 veya H2), oligosakkarit (O) ve kapsüler polisakkarit (K) yüzey antijenlerine dayalı olarak 2500'den fazla serotipe sahiptir. En iyi bilinen serotipleri; Typhi, Paratyphi, Enteriditis ve Typhimurium'dur. Genomik akrabalıkları ve biyokimyasal özelliklerine göre *S. enterica* türü, *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) ve *indica* (VI) olmak üzere isim ve roma rakamı ile adlandırılan altı alttüre ayrılmaktadır (35).



Şekil 2.2. *Salmonella* cinsi, White-Kauffman-Le Minor şemasına göre türler, alttürler ve serovarlar olarak sınıflandırılır. Serovarlar genellikle tifoidal veya non-tifoidal kategorilerine ayrılır. Ancak bu ayırım, resmi *Salmonella* sınıflandırma şemasında yer almaz (36).

Salmonella, aynı zamanda, insanlarda neden oldukları hastalıklara ve yaygın olarak izole edildikleri konakçı organizmalara göre de sınıflandırılabilir. İshal ile karakterize edilen ve sıklıkla bulantı, kusma ve baş ağrısının eşlik ettiği gastroenterite, yaygın olarak non-tifoidal serovarlar olan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* neden olmaktadır. Ekstraintestinal doku invazyonu ile karakterize edilen tifo veya enterik ateş ise, serovar *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* ve *S. Paratyphi B*'den kaynaklanmaktadır (32,37).

2.1.2. SALMONELLA ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ

Salmonella, fagositik olmayan insan konakçı hücrelerini istilası esnasında konakçı hücreye erişmek için kendi fagositozunu indüklemeyi esas alan ilginç bir strateji izler. Bu stratejiyi, bakteriyel kromozomal DNA'da yer alan *Salmonella* patojenite adaları (SPI) olarak adlandırılan ve istila sürecinde fonksiyonel olan efektör proteinleri kodlayan gen kümeleri sayesinde gerçekleştirir. SPI'lar ayrıca, *Salmonella*'nın efektör proteinlerini bağırsak epitel

hücre zarı boyunca sitoplazmaya enjekte etmesine izin veren tip III sekresyon sistemlerini (T3SS) kodlar. Hem tifoidal hem de non-tifoidal *Salmonella* serotiplerinin patogenezi, büyük ölçüde kullandıkları T3SS'nin fonksiyonlarından kaynaklanmaktadır (33,38)

T3SS ile enjekte edilen bakteriyel efektörler sinyal iletim yolunu aktive eder ve konakçı hücrenin aktin hücre iskeletinin yeniden yapılandırılmasını tetikler. Bu da, bakterileri sarmak için epitel hücre zarının dışarıya doğru uzamasına neden olur. Bu süreçte, membran kıvrımının morfolojisi tıpkı fagositoz sürecini andırır (39). *Salmonella*, konakçı hücreye bu modifiye fagozom (*Salmonella* içeren vakuol, SCV) ile girer ve farklı bir T3SS sistemi kullanarak yeni efektör proteinlerin salgılanmasını sağlar. Bu efektör proteinlerin gerçekleştirdiği modülasyon sayesinde, lizozomların füzyonu bloke edilir ve *Salmonella*'nın konakçı hücre içerisinde replikasyonu olanaklı hale getirilir. Bunun sonucunda *Salmonella*, diğer hücrelere ve dokulara ulaşarak invazif hastalığın neden olur (32,40).

Salmonella'nın oluşturduğu biyofilm yapısı ile kronik enfeksiyonlara yol açtığını ve virülansı etkilediğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (41–43). Bu çalışmalardan en dikkat çeken, *S. Typhi*'nin biyofilm aracılığıyla safra kesesinde lokalize olduğunun belirlendiği araştırmadır. Biyofilm yapısı, *S. Typhi*'ye konakçı bağışıklık sistemi ve antibiyotik tedavisi gibi diğer potansiyel tehditlere karşı artan bir direnç sağlayarak uzun süre hayatta kalma avantajı sağlar (44,45). Diğer yandan, non-tifoidal *Salmonella* suşları ile gerçekleştirilen araştırmalar da, biyofilm oluşturma yeteneğinin virülans özelliği artırdığını göstermektedir. 2001'de Solano ve ark. tarafından *S. Enteritidis* biyofilmlerinin, HEp-2 ve Caco-2 hücrelerinde epitelyal bariyerin bozulmasına yol açtığı ve virülans ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (46). Tavuklarda akut veya kalıcı enfeksiyona neden olarak önemli ekonomik kayıplara yol açan *S. Pullorum*'un biyofilm oluşturma kabiliyetinin enfeksiyon aşaması için önemli virülans faktörlerden biri olabileceği yönünde bulgular yukarıda anılan literatür verisini desteklemiştir (47). Ayrıca *S. Typhimurium* biyofilmlerinin ana bileşenlerinden olan fimbriyaların bakterinin yapışmasına ve bağırsak mukozasında üremesine aracılık ettiğine dair spesifik kanıtlar mevcuttur. Bu durum, konakçı bağırsak dokusunun kolonizasyonunun enfeksiyonun önemli bir erken basamağı olarak kabul edilmesi nedeniyle çok önemlidir (48).

2.2. BAKTERİYEL BİYOFİMLER

Biyofilmler, farklı biyotik veya abiyotik yüzeylerde yüksek düzeyde kalıcılık sağlamış olan mikrobiyal birlik veya topluluklardır. Biyofilm yapısının kalıcılığı, içerdiği hücrelerin üretmiş olduğu hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) meydana gelen matriks ile ilişkilendirilebilir. Bakteriler, bu matriks içerisine gömülü bir biçimde yaşayarak uzun süreli hayatta kalma yeteneği kazanırlar. EPS yapısı, genellikle; proteinler, lipitler, nükleik asitler (eDNA) ve polisakkaritlerden meydana gelmektedir. Bu bileşenler sadece biyofilmin yüzeye sabitlenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda besinleri hapseder, yapısal destek sağlar ve dış etkenlere karşı kalkan görevi üstlenerek bakterileri korur (49,50). Biyofilm bakterileri, sahip oldukları EPS kalkanı sayesinde planktonik formlar için ölümcül olan stres koşulları altında yaşamlarını sürdürebilmektedirler. EPS kalkan görevini, antimikrobiallerin ve konakçı bağışıklık sistemi elemanlarının bakterilere penetrasyonunu zorlaştırarak gerçekleştirir. Bunun yanı sıra, pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu gibi değişen olumsuz çevre koşullarında bakterilere direnç sağlar. EPS, aynı zamanda, biyofilm hücrelerini birbirlerine yakın tutması nedeniyle hücre-hücre iletişimini (QS) ve yatay gen transferini kolaylaştırır (51,52).

Biyofilmdeki bakterilerin genetik çeşitliliği, antibiyotik direncinin şekillenmesinden büyük ölçüde sorumludur. İnsanlarda meydana gelen tüm mikrobiyal enfeksiyonların yaklaşık % 80'inin doğrudan biyofilmlerin bir sonucu olduğu tahmin edilmektedir ve antibiyotik kullanımının bu biyofilm aracılı enfeksiyonların eradikasyonunda yetersiz olduğu bilinmektedir. Çoğu antibiyotik, planktonik bakterilere karşı geliştirilmiştir ve aynı bakterilerin biyofilm formlarına karşı etkili değildir. Özellikle son 20 yılda biyofilm esaslı enfeksiyonların, planktonik enfeksiyonlardan çok daha yoğun olduğunun belirlenmesi, anti-biyofilm ajanları üzerindeki çalışmaların ivme kazanmasına yol açmıştır (5).

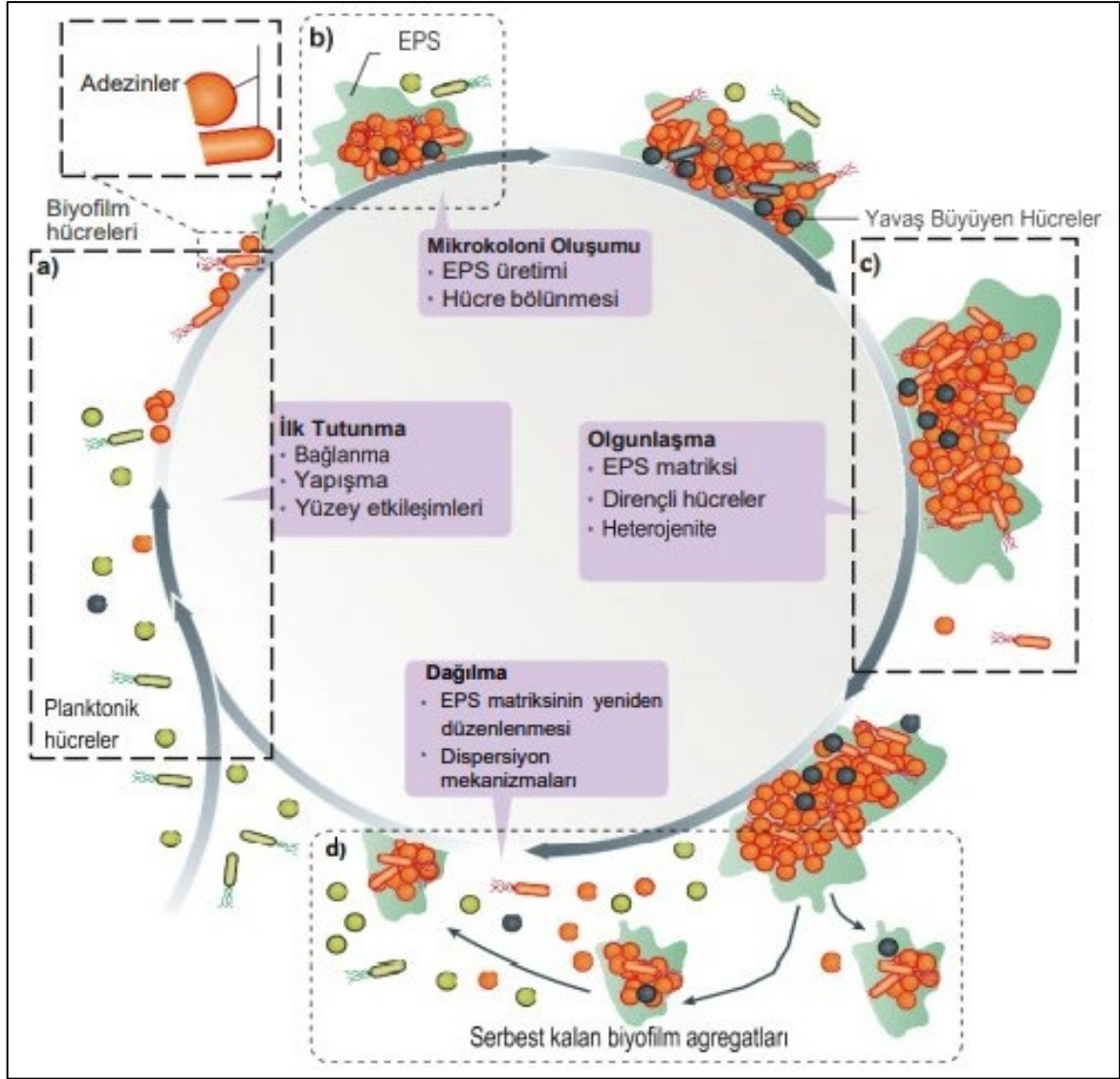
Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar içerisinde tıbbi açıdan en dikkat çeken, kistik fibroz hastalarının akciğerlerindeki *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleridir. Bu fırsatçı patojenin, yüksek düzeyde morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilen akut ve kronik akciğer enfeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir (53). Günümüzde gıda kaynaklı patojenlerin büyük bir çoğunluğunun biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu, hiçbir kuşkuyla yer bırakmayacak şekilde kanıtlanmıştır. Gıda işleme ortamları, özellikle biyofilm oluşumunun

erken aşaması olan mikrobiyal bağlanmanın gerçekleşmesi için oldukça uygun ortamlardır. Bu ortamların ve kullanılan ekipmanların yetersiz sanitasyonu, özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* için biyofilm oluşumunu tetiklemekte ve bu sayede sürekli enfeksiyon kaynakları oluşturularak, süreç inatçı gıda kaynaklı hastalıklara doğru evrilmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklar, her yıl yaklaşık 600 milyon insanın hastalanmasıyla küresel bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (54).

Biyofilm ilişkili enfeksiyonların sıkça karşımıza çıktığı bir diğer alan ise, implante edilmiş tıbbi cihazlardır. İmplant edilmiş tıbbi cihazlarda biyofilm oluşumuna neden olan mikrobiyal bağlanma yaygın rastlanan bir durumdur ve ciddi hastalıklara ve ölüme yol açabilir. Damar içi kateterleri, idrar sondalarını, kalp pillerini, kalp kapakçıklarını ve ortopedik implantları içerebilen bu tıbbi cihazlar, bakteriyel biyofilmler tarafından kolonize edildiğinde ortadan kaldırılması zor olan enfeksiyon sorunu ortaya çıkmaktadır(55).

2.2.1. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI

Bakterilerde biyofilm oluşumu, uygun bir yaşam alanı elde etmek, besin maddelerini korumak ve hayatta kalmayı sağlamak amacıyla gerçekleşir (56). Biyofilm oluşumunun genel mekanizması farklı bakteri türleri arasında benzer olmakla birlikte, türe bağlı olarak küçük farklılıklar içerebilir. Genel biyofilm oluşum mekanizması, tipik olarak dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar; ilk yapışma (geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz), mikrokoloni oluşumu, olgunlaşma ve dispersiyon (dağılma) aşamalarıdır (Şekil 2.3.) (57).



Şekil 2.3. Mikroorganizmaların biyofilim oluşturma aşamaları. a) Biyofilim oluşumunun ilk aşamasında, mikroorganizma ve yüzey arasında hücre yüzeyi ile ilişkili adezinler (hücre uzantıları ve adezin proteinler) aracılığıyla bir etkileşim meydana gelir. Aktif hale gelen adezinler mikroorganizmanın abiyotik veya biyotik yüzeye tutunmasını sağlar. b) Biyofilim gelişiminin erken aşamasında hücre bölünmesi ve EPS üretimi gerçekleştirilerek matriks oluşumu başlar. c) Olgun hale gelen biyofilim yapısı 3 boyutlu bir yapı haline dönüşerek bakteriyel etkileşimlerin gelişmesini ve dirençli hücrelerin meydana gelmesini sağlar. d) Olgun biyofilimden EPS matriksinin yeniden düzenlenmesini içeren dispersiyon mekanizmaları ile kopmalar gerçekleşir (58).

İlk yapışma aşamasında, planktonik formda olan bakteri, biyotik veya abiyotik bir yüzeye flagellasını kullanarak ulaşır. Yüzeye ulaştıktan sonra, fiziksel kuvvetler veya pili ve flagella gibi hücre uzantıları ya da MisL gibi adezin proteinleri sayesinde tutunma gerçekleştirilir. Bu aşama geri dönüşümlü tutunma olarak adlandırılır. Çünkü bakteri ile yüzey arasında zayıf etkileşimler mevcuttur. Tutunma süreci, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler, adezin

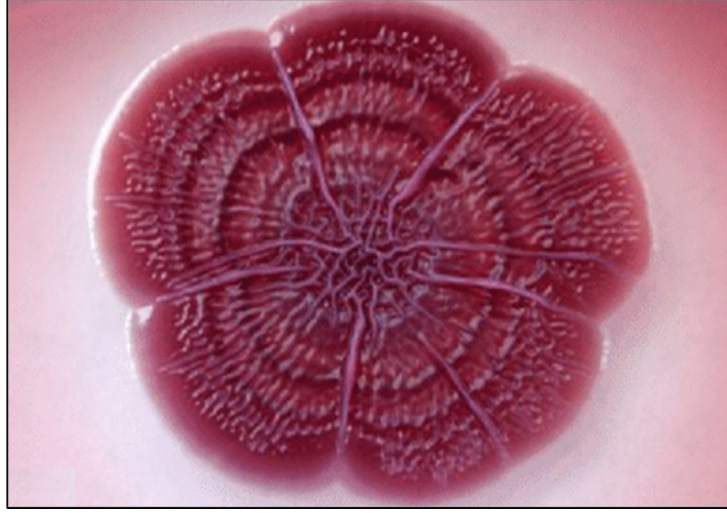
proteinleri ve Van der Waals kuvvetleri tarafından yönetilir. Bu esnada bazı bakteriler, tutunduğu yüzeyde meydana gelen itme kuvvetinin üstesinden gelerek hareketsiz kalır ve geri dönüşü olmayan bir şekilde ilişkilene (tutunma) gerçekleştirilir (59).

Geri dönüşümsüz tutunma gerçekleştiikten sonra, yüzeye yapışan hücreler, biyofilm ilişkili spesifik genlerin ekspresyonu ile sonuçlanan otoindüktör sinyal moleküllerinin üretimi ile kendi aralarında etkileşerek çoğalır ve olgunlaşır. Bu aşamada bakteri hücrelerini kaplayacak EPS'nin salgılanması başlar. Biyofilm içerisindeki bakterileri dış etkenlerden koruyacak olan bu yapı, aynı zamanda biyofilm komünitesini stabilize eder. Özetle, olgunlaşma aşaması; EPS matriksinin oluşması, hücrelerin bir araya gelmesi, kimyasal etkileşimler, sinyalleşme ve mikro ve makrokolonilerin oluşumu gibi temel aşamalarla karakterize edilebilir (60).

Biyofilm yapısı olgunlaştıkça, bakterilerin kullandığı kaynaklar sınırlı hale gelerek toksik ürünler birikebilir. Bu nedenle, hücreler daha çok besine ulaşmak ve strese neden olan koşulları ve atıkları ortadan kaldırmak için dağılabilir (dispersiyon). Hücrelerin dispersiyonu bağımsız hücreler veya hücre kümeleri halinde meydana gelebilir. Dispersiyon aşamasının, oksijen seviyesinin düşmesi (aerobik durumda) veya besin miktarının azalmasıyla gerçekleşen bir süreç olduğu düşünülmektedir. Serbest hale gelen bakteri hücreleri farklı bölgelerde daha fazla biyofilm oluşturabilir veya hareketliliğinde onlara yardımcı olmak için flagella proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek yüzeyde serbest halde bulunabilirler (61,62).

2.2.2. SALMONELLA BİYOFİMLERİ

Salmonella hücrelerinin planktonik formdan biyofilm yaşam formuna geçişinin sebebi ortamdaki çeşitli çevresel tetikleyicilerdir. Biyofilm oluşum süreci; bakteri hücreleri (flagella, pili, kapsül veya ekzopolimerik maddelerin varlığı), hücrelerin bağlandıkları yüzeyin özellikleri ve çevresel koşullar (pH, sıcaklık ve besin miktarı) arasındaki etkileşimlere bağlıdır (63,64). *Salmonella* biyofilmleri, kongo kırmızısı olarak adlandırılan boya ile yarı katı agar üzerinde rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfoloji oluşturmasıyla tanımlanır (Şekil 2.4.). Biyofilm gelişimi, 30 °C'nin altındaki sıcaklıklarda düşük tuzlu ortamda veya 37 °C'de demirden yoksun ortamlarda gözlenir (10).



Şekil 2.4. *Salmonella* biyofilmlerinin rdar morfolojisi (66).

Rdar kolonileri protein yapısındaki bileşiklerden ve ekzopolisakkaritlerden meydana gelir. Kongo kırmızısı boyası, *Salmonella* biyofilmlerinin iki ana bileşeni olan kıvrımlı fimbriyalara ve selüloza bağlanır (67). *Salmonella Typhimurium*'da kıvrımlı fimbriya ve selüloz gibi hücre dışı polisakkaritlerin sentezi transkripsiyonel regülatör olan CsgD'ye bağlıdır. CsgD tarafından yönetilen biyofilm oluşumunun düzenlenmesi daha sonra tartışılacaktır (9). Kıvrımlı fimbriyalar esas olarak buldukları yüzeye yapışmayı ve hücrelerin bir araya gelmesini sağlar. Ayrıca konakçı hücrelere tutunmaya ve konakçı hücre işgaline aracılık ederler (68). 1-4- β -D-glukoz birimlerinin tekrarlayan doğrusal zincirlerinden meydana gelen selüloz ise biyofilm matriksinin temel ekzopolisakkaritidir ve bakterinin hareketliliğini inhibe ederek biyofilm yapısının olgunlaşmasında rol oynar (7,69,70).

Lataşa ve ark. (2005) kıvrımlı fimbriyalar ve selüloz yapısına ek olarak BapA adını verdikleri proteinin biyofilm yapısına katıldığını keşfetmişlerdir. BapA, homofilik etkileşim yoluyla hava-sıvı ara yüzeyinde bakteri hücrelerinin agregasyonunu sağlar ve biyofilm oluşumunda önemli bir role sahiptir. Ayrıca enfeksiyon aşamasında kolonizasyon sürecine katkıda bulunur (71).

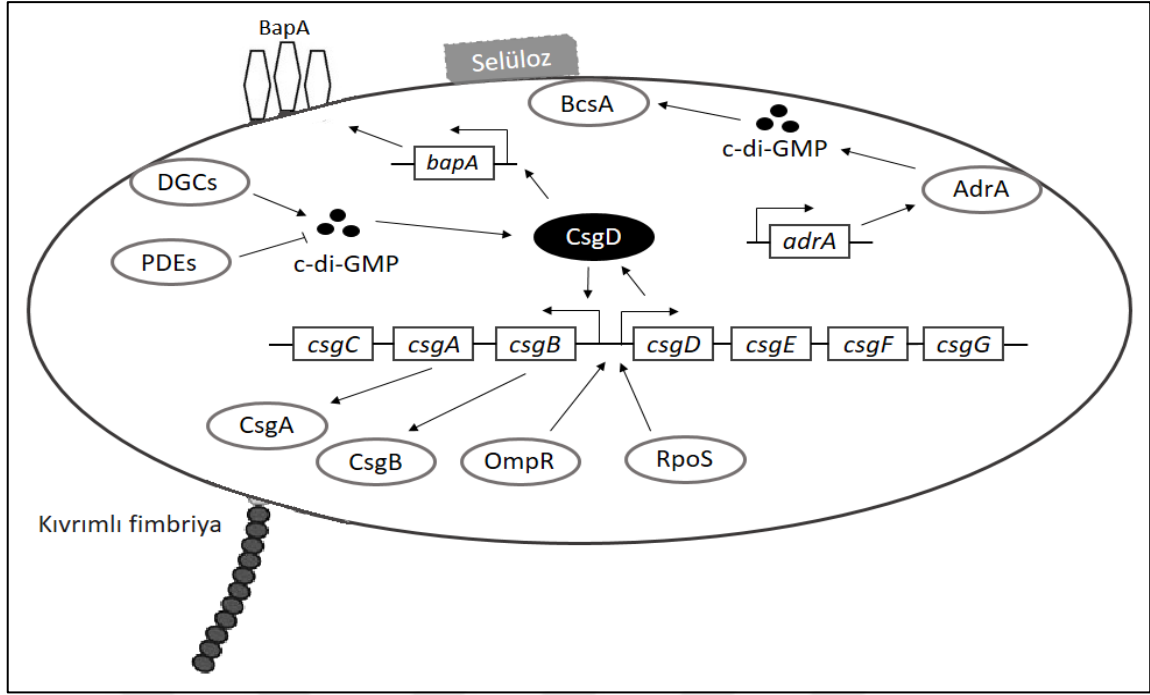
2.2.2.1. *Salmonella* Biyofilmlerinin Regülasyonu

Biyofilm oluşumu ve dağılımı, çevresel sinyallerle düzenlenen dinamik bir süreçtir. Biyofilm hücreleri ile planktonik hücreler tarafından ifade edilen gen setlerinin ekspresyon seviyeleri birbirlerinden önemli ölçüde farklılık göstermesi, bu iki yaşam formunun oldukça

farklı olan doğasından kaynaklanmaktadır (72). Enterik bakterilerde biyofilm oluşumunun regülasyonu, kıvrımlı fimbriya, selüloz, kolanik asit ve poli-N-asetilglukozamin (PGA) gibi biyofilm matriks bileşenlerinin sentezinin düzenlenmesini içerir. Bu süreçler, moleküler düzeyde, RNA polimeraz için rekabet eden çeşitli sigma faktörleri, bir dizi transkripsiyon faktörü, c-di-GMP gibi ikincil mesajcılar ve QS sistemi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilirler. Ek olarak, şaşırtıcı derecede çok sayıda sRNA'nın doğrudan veya dolaylı olarak hareketliliği ve/veya biyofilm oluşumunu modüle ettiği bilinmektedir (73). Hareketlilik ve biyofilm oluşumunda rol oynayan diğer düzenleyici sistem ise, iki bileşenli BarA/SirA sistemidir. Bu sistem, pH, metabolik son ürünler (format, asetat), kısa zincirli yağ asitleri veya safra tuzları gibi faktörler tarafından modüle edilir. SirA, hareketlilik, virülans, karbon depolama, ikincil metabolizma ve biyofilm oluşumunun önemli bir düzenleyicisi olan Csr sistemini düzenler. CsrA, esas olarak hareketliliği aktive ederek, sabit hücreler ve hareketlilik arasındaki değişimi kontrol eder. SirA ayrıca, CsrA aktivitesini ve hareketlilikle ilgili genleri inhibe eden sRNA'lar olan CsrB ve CsrC'nin transkripsiyonunu aktive eder. Bu durum, tip I fimbriya üretimini ve dolayısıyla biyofilm oluşumunu artırır (74,75). Csr tarafından düzenlenen PGA sentezine “sRNA'ların biyofilm oluşumuna etkileri” kısmında daha ayrıntılı değinilecektir.

2.2.2.1.1. CsgD

S. Typhimurium'da biyofilm oluşumunun ana regülatörü daha önce de belirtildiği üzere CsgD'dir. CsgD, kıvrımlı fimbriyalar için yapısal alt birimleri kodlayan *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu pozitif olarak düzenler ve c-di-GMP'nin sentezi için *adrA* genini aktive eder. AdrA, selüloz sentaz enzimi olan BcsA'yı aktive eden ve selüloz üretiminin artmasına neden olan c-di-GMP'yi sentezler. Bu da flagellum üretiminin ve rotasyonunun inhibisyonuna neden olur. Bu sebeple; CsgD, hücre hareketliliğinin kontrolü ve yüzeye tutunmada yer alan genlerin ekspresyonunu koordine ederek planktonik ve biyofilm yaşam formu arasında bir geçiş görevi görür (76,77). *csgD*, *csgBAC* ve *csgDEFG* operonlarının farklı transkripsiyonu ile oluşturulan kıvrımlı fimbriya biyosentezinin ayrılmaz bir parçasıdır (78). CsgD'nin ekspresyonu için alternatif sigma faktörü RpoS gerekir ve bu ekspresyon işlemi çevresel faktörlere bağlı olarak düzenleyici proteinler veya küçük nükleotitler tarafından kontrol edilir (Şekil 2.5.) (9,79).



Şekil 2.5. *S. Typhimurium*'da CsgD aracılı biyofilm oluşumunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi. CsgD'nin ifadesi için RpoS ve OmpR gereklidir. CsgD, kıvrımlı fimbriyalar için yapısal alt birimleri kodlayan *csgBAC* operonunun ve selüloz biyosentezinin aktivasyonu için gereken diguanilat siklazların üretilmesini sağlayan *adrA*'nın transkripsiyonunu gerçekleştirir. Ayrıca CsgD, *Salmonella*'da BapA ekspresyonu için bir düzenleyici olarak kabul edilir. CsgD ekspresyonu, diguanilat siklazlar (DGCs) gibi c-di-GMP'ye özgü fosfodiesterazların (PDEs) aktivitesi ile belirlenen c-di-GMP tarafından pozitif olarak modüle edilebilir (80).

S. Typhimurium'da *csgD*'nin transkripsiyonel regülasyonu, RpoS, OmpR, H-NS ve IHF gibi transkripsiyonel regülatörler tarafından düzenlenir (81). RpoS, yardımcı protein Crl'nin desteği ile *csgD* ekspresyonunu aktive eder. Bu nedenle *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumu ve rdar morfoloji gelişimi için önemli bir faktördür (82). OmpR, yüksek ozmolariteye yanıt olarak fosforile olur ve yüksek/düşük ozmolaritede DNA'ya bağlanabilme özelliği göstererek *csgD*'nin ekspresyonunu düzenler (10). Histon benzeri proteinler olan IHF ve H-NS ise, *csgD* dahil olmak üzere çeşitli genetik süreçleri kontrol eder. IHF, *csgD* promotörü üzerinde birden fazla bölgeye bağlanabilen nükleoprotein kompleksi olarak tanımlanmıştır ve IHF1 olarak adlandırılan bölgeye bağlandığında transkripsiyonu artırdığı gözlemlenmiştir. H-NS (histon benzeri çekirdek materyali), DNA'nın AT (adenin-timin) açısından zengin bölgelerine bağlanan bir proteindir ve bağlandığı konuma bağlı olarak *csgD*'nin transkripsiyonunu aktive eder veya baskılar (81).

2.2.2.1.2. c-di-GMP Sinyalizasyonu

Diğer bir biyofilm regülatörü olan c-di-GMP sinyalizasyonu, bakterilerde bulunan en karmaşık ikincil sinyal sistemi olarak kabul edilir ve planktonik hücrelerden biyofilm formuna geçişte önemli bir rol oynar. c-di-GMP molekülleri, çeşitli hücresele reseptörlere bağlandıktan sonra, transkripsiyonu, enzimlerin aktivitesini ve hatta daha büyük hücresele yapıların işleyişini kontrol edebilir (83,84). c-di-GMP üç boyutlu biyofilm yapısının gelişmesi için önemli olan faktörleri regüle eder. Bu faktörler; ekzopolisakkaritlerin sentezi, pili ve adezinler, eDNA'nın salgılanması ve hücre ölümünün ve hareketliliğinin kontrolünün sağlanmasıdır (85). Genellikle hücre dışı matriks üretimini uyararak ve hareketliliği baskılayarak sağlamlığı destekler. Selüloz biyosentezini aktive etmenin yanı sıra, yüksek c-di-GMP konsantrasyonlarının, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası *csqD* ve *csqA* ekspresyonunu teşvik ederek kıvrımlı fimbriya üretimini de artırdığı gösterilmiştir (86,87). Ayrıca *Salmonella* biyofilmlerinin “rdar” morfoloji, farklı biyofilm koşullarında c-di-GMP tarafından yüksek oranda düzenlenir (88).

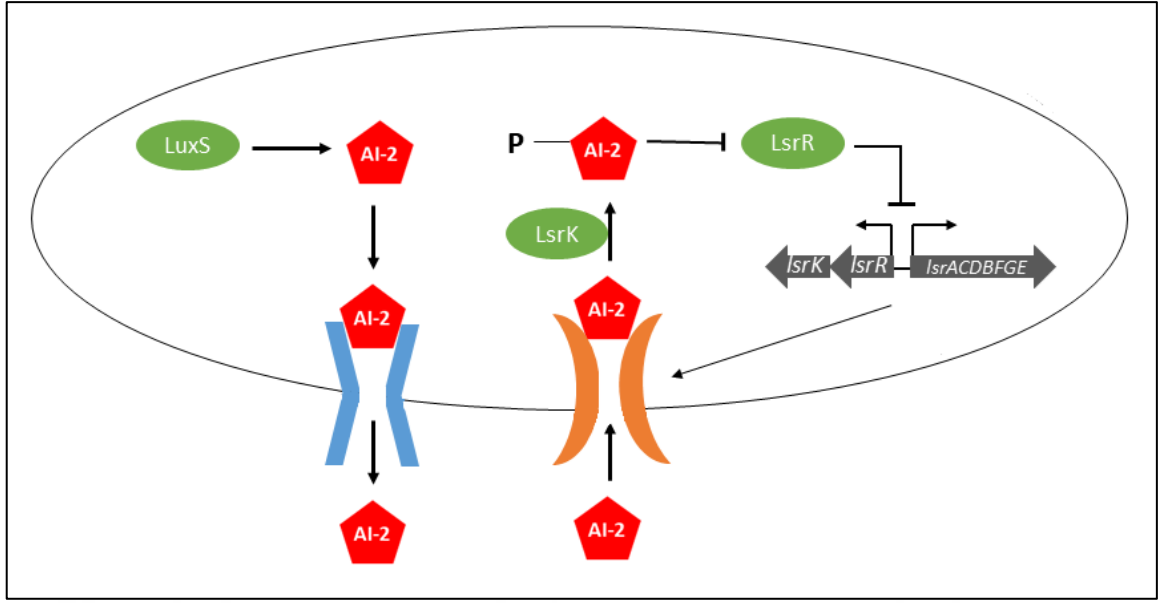
2.2.2.1.3. QS

QS sistemi ilk olarak, 40 yılı aşkın bir süre önce lüminesans (ışıldama) özelliğine sahip deniz bakterileri olan *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) ve *Vibrio harveyi*'de (*V. harveyi*) keşfedilmiştir. Her iki türde de lüminesans özelliğinin, salgılanan AI sinyal moleküllerinin birikimine yanıt olarak sadece yüksek hücre popülasyon yoğunluğunda meydana geldiği belirlenmiştir. Bu durum bakterilerin kendilerinin üretmiş olduğu sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleri ile iletişime geçtiklerinin ilk kanıtıydı (89). Günümüzde ise hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerin bu tür iletişimi kullandıkları bilinmektedir. Ancak kullandıkları sinyal molekülleri her iki grup arasında yapısal ve işlevsel olarak farklılık gösterir. QS sadece aynı türün hücreleri arasında (tür içi) değil, aynı zamanda türler arasında ve bakteriler ile daha yüksek organizasyonlu canlılar arasında da tanımlanmıştır (90). Gram negatif bakteriler ağırlıklı olarak AHL moleküllerini (AI-1) kullanırken, Gram pozitif bakteriler modifikasyona uğramış peptitleri (AIP) kullanırlar. Üçüncü bir AI türü olan AI-2 molekülü ise hem Gram negatif hem Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenip algılanarak türler arası iletişimi sağlamaktadır (16).

Biyofilm oluşum sürecinde ve dağılnmasında önemli bir mekanizma olan QS sistemi sayesinde, bakteriler ürettikleri sinyal molekülleri ile iletişime geçerek populasyon yoğunluğunu ölçebilmektedir. Yzeyeye tutunan bakteri miktarı arttıa bu sinyal moleküllerinin konsantrasyonu artar ve bu artışla birlikte bir takım işlemler doğrudan biyofilm oluşumunun başlamasına neden olur (91).

Salmonella'da  tip QS molekülü tanımlanmıştır. Bunlar, AI-1 olarak adlandırılan AHL'ler, AI-2 adı verilen furanosil borat diesterler ve konak hücre ile ilişkili AI-3 molekülleridir. İlk sistemde *Salmonella*, diğer bakteri türleri tarafından üretilen AHL'lere yanıt vermek için SdiA adlı proteini kullanır. SdiA esasen, LuxR ailesinden kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. SdiA ve *Salmonella* biyofilmleri arasında doğrudan bir bağlantı bildirilmemiş olsa da, SdiA tarafından düzenlenen genlerin biyofilm oluşumunda da bir rolü olabileceğini öne sürülmüştür. Çünkü SdiA, fimbriyal proteinlerin ekspresyonunu ve bir araya gelmesini dolaylı olarak etkileyebilir (92,93).

İkinci QS sisteminde, *Salmonella* AI-2'nin sentezi için LuxS enzimini kullanır (94). Sentezlenen AI-2 sinyal moleküllerinin hücre tarafından tanınması ve taşınmasında ise Lsr taşıma sistemi görevlidir (şekil 2.6.) (95). AI-2 sinyal molekülleri hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılan ortak bir dildir (96). Jesudhasan ve ark. (2010), *Salmonella*'da biyofilm oluşumunun *luxS* geninin mutasyona uğramasından etkilendiğini saptamıştır. *S. Typhimurium luxS* mutant suşlarının polistiren üzerinde bozulmuş bir biyofilm yapısı oluşturdukları gözlenmiştir. Mikrodizin analizleri, doğal tipe kıyasla *luxS* geni delesyona uğratılmış mutantta bazı hareketlilik genleri yanında, biyofilm ile ilgili genlerin ifadelerinin de azaldığını ortaya koymuştur (97).



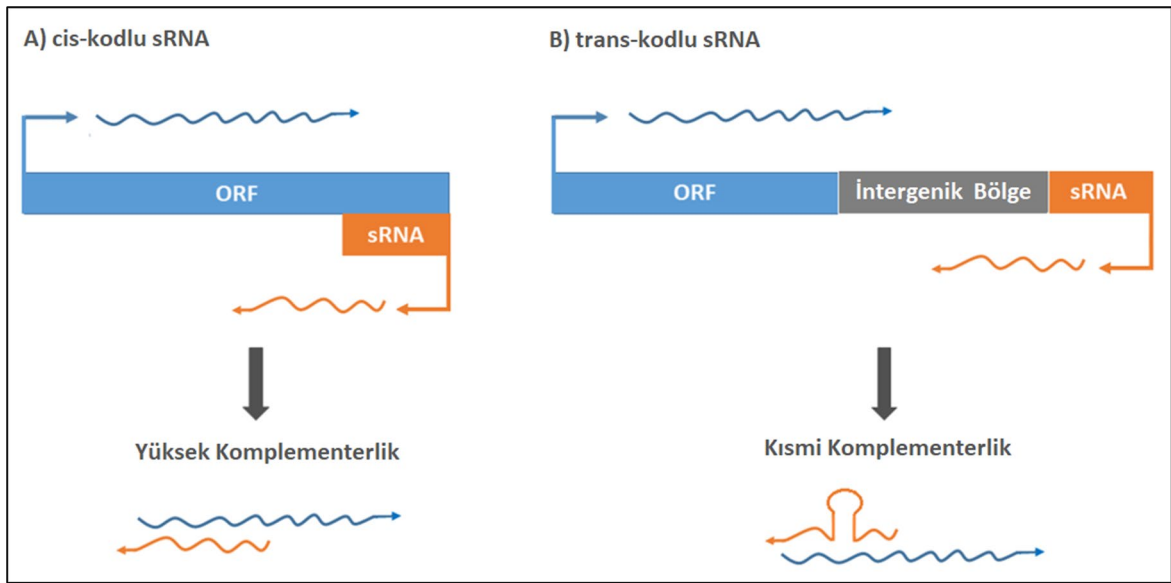
Şekil 2.6. *Salmonella*'da AI-2 aracılı QS mekanizması. AI-2 sentezi LuxS tarafından gerçekleşir ve dışa atım pompası ile hücre dışına salınır. Hücre dışı AI-2, LsrB'ye bağlanır ve *lsr* operonunda kodlanan bir ATP taşıyıcısı yoluyla bakteri hücrelerine taşınır. AI-2, *Salmonella* hücrelerine girdikten sonra, LsrK tarafından fosforile edilir ve fosforile edilmiş olan AI-2, LsrR'nin *lsr* operonuna olan baskılayıcı etkisini hafifletmesine neden olarak daha fazla AI-2 içe alınmasına izin verir (98).

Üçüncü QS sistemi, iki bileşenli PreA/B elemanlarını kullanır. Bu sistem, *E. coli*'de AI-3 moleküllerini ve ökaryotik hormonlar olan epinefrin ve norepinefrini algıladığı gösterilen QseB/C iki bileşenli sistemle homologdur (99).

2.3. BAKTERİYEL KÜÇÜK RNA'LAR

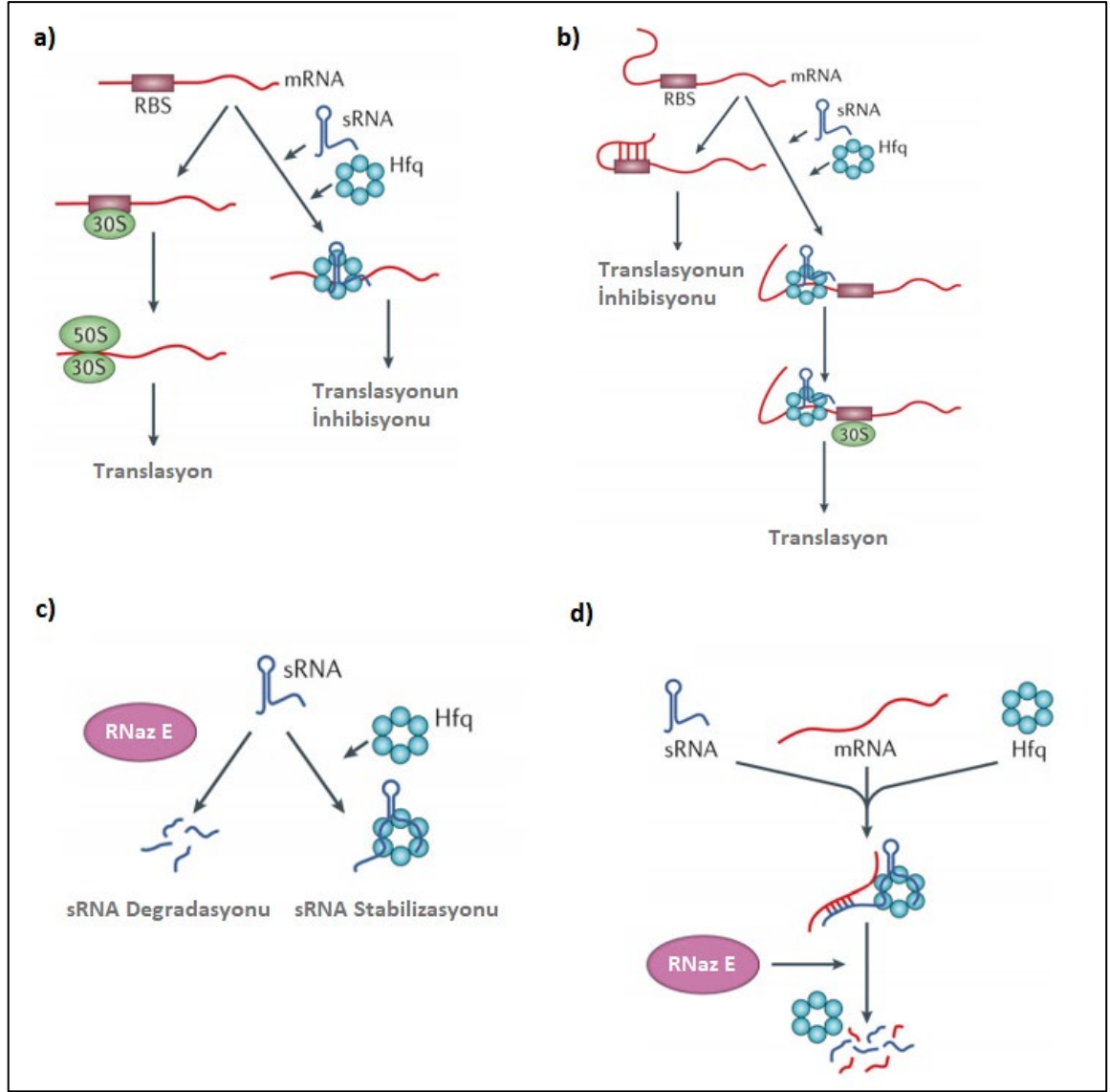
Bakterilere özgü küçük RNA'lar (sRNA'lar), yaklaşık 30-500 nükleotid uzunluğunda olup genellikle stres koşullarında hücrel metabolizmadaki değişikliklerin düzenlenmesine yardımcı olurlar. Bu sayede mevcut besinlerin kullanımını optimize ederek bakterinin hayatta kalma olasılığını artırır. Regülatör RNA'lar transkripsiyonu, translasyonu ve mRNA stabilitesini düzenleyebilir. Bu düzenlemeleri; RNA konformasyonunda değişiklikler yaparak, proteinlere bağlanarak, diğer RNA'larla baz eşleşmesi yaparak ve DNA ile etkileşime girerek gerçekleştirebilirler (23). sRNA'ların çoğu hedef mRNA'larla baz eşleşmesi gerçekleştirerek etki ederler. Baz eşleşmesi yapan sRNA'lar trans-kodlu ve cis-kodlu olarak iki kategoriye ayrılır (Şekil 2.7.).

Trans-kodlu sRNA'lar, düzenledikleri mRNA'lardan uzak olan genomik konumlarda kodlanır ve genellikle hedefleriyle kısmi bir komplementerlik paylaşırlar. Bu nedenle, trans-kodlu sRNA'ların çoğunun birden fazla mRNA hedefi vardır. Bazı bakterilerde, bu tip baz eşleşmeleri, RNA şaperonu olan Hfq proteinini gerektirir. Hfq, bakterilerde yaygın olarak bulunan ve gen ekspresyonunun kontrolünde anahtar rolleri olan RNA'ya bağlanabilen bir proteindir. Hfq, sRNA'ların hedef mRNA'larıyla eşleşmesini kolaylaştırarak spesifik transkriptlerin translasyonunu etkiler. Cis-kodlu sRNA'lar ise, bakteri kromozomları üzerinde hedef genlerinin karşı zincirinden transkribe olurlar ve bu nedenle hedef mRNA'ları ile yüksek düzeyde komplementerlik gösterirler (100).



Şekil 2.7. Trans-kodlu ve cis-kodlu sRNA'ların genomik lokasyon farklılıklarının hedeflerine etkisi. A) cis-kodlu sRNA'lar, hedef genlerinin karşı zincirinden transkribe olurlar ve hedef mRNA'ları ile yüksek komplementerlik gösterirler. B) Trans-kodlu sRNA'lar, hedef genlerine göre genomun herhangi bir bölgesinden transkribe olabilirler ve hedef mRNA'ları ile kısmi komplementerlik gösterirler. Turuncu kutular sRNA'yı, mavi kutular hedef mRNA'nın açık okuma çerçevesini (ORF), gri kutu ise genler arası bölgeyi temsil etmektedir (101).

Baz eşleşmesi yoluyla etki eden sRNA'lar; RBS'ye erişimi değiştirebilirler, ribonükleaz (RNaz) aracılı degradasyonu teşvik edebilirler, mRNA'nın ikincil yapısını değiştirebilirler veya hedef mRNA'da bulunan protein bağlanma sekanslarını taklit edebilirler (Şekil 2.8.) (23).



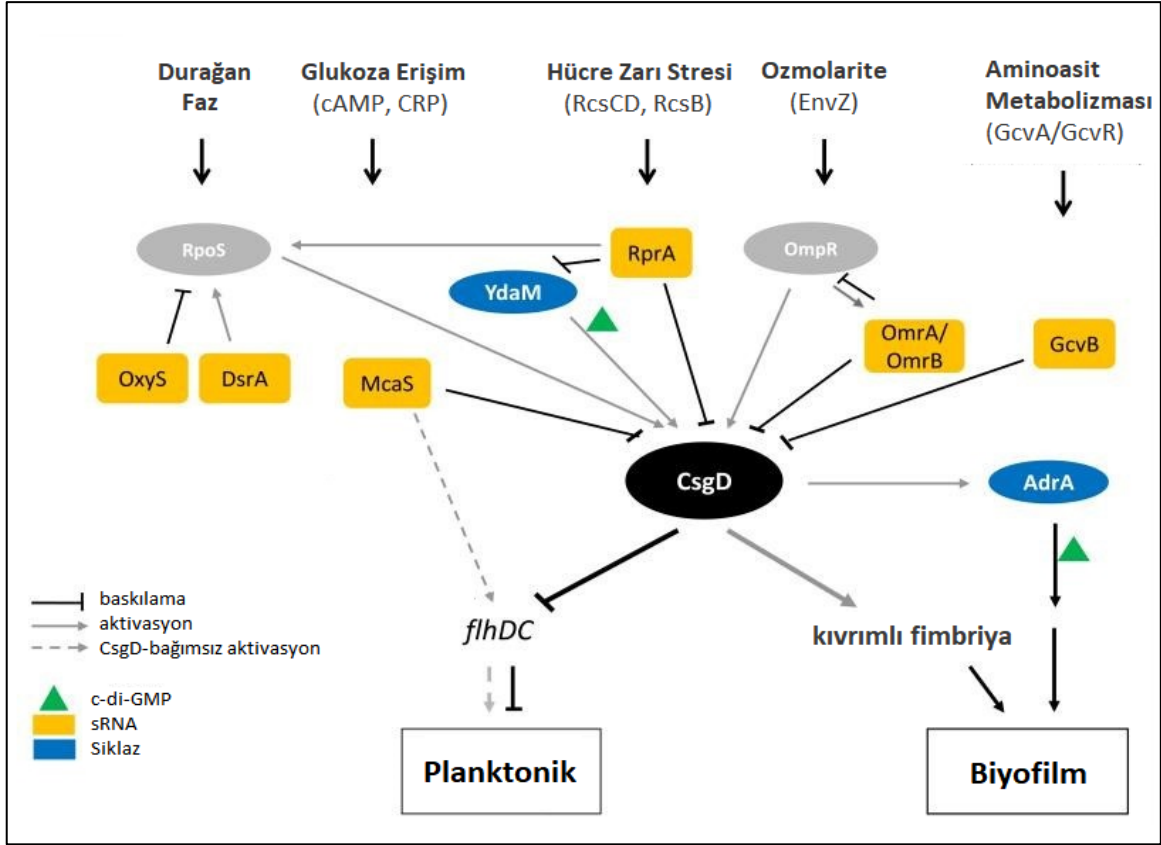
Şekil 2.8. sRNA'ların Hfq ile ilişkisi ve hedef mRNA'lara etki mekanizmaları. a) Hfq-sRNA kompleksi hedef mRNA'nın RBS'sini etkisiz hale getirebilir (sekestre edebilir), böylece 30S ve 50S ribozomal alt birimlerinin bağlanmasını bloke edebilir ve translasyonu baskılayabilir. b) Bazı mRNA'larda, 5' translasyona uğramayan bölgedeki (UTR) sekonder bir yapı, RBS'yi gizleyebilir ve translasyonu engelleyebilir. Hfq-sRNA kompleksi, RBS'yi açığa çıkararak mRNA'nın translasyonunu aktive edebilir. c) Hfq, bazı sRNA'ları, pek çok durumda RNaz E tarafından gerçekleştirilen degradasyondan koruyabilir. d) Hfq, bazı sRNA'ların ve hedef mRNA'larının degradasyonunu RNaz E aracılığı ile indükleyebilir (102).

2.3.1. sRNA'LARIN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİLERİ

Biyofilm sentezi çok sayıda genin regülasyonunun gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Flagella yapısı bakteri hücresinin yüzeye ulaşmasında ve biyofilm oluşumunun diğer aşamalarında rol alan bir yapıdır ve bu yapının sentezinden sorumlu ana regülatör *flhDC*'dir.

Kıvrımlı fimbriya uzantıları gibi proteinler ve PGA gibi ekzopolisakkaritler hücrelerin birbiriyle ve yüzeyle ilişki kurmalarını sağlamanın yanı sıra, bakterilerin etrafında matriks yapısının oluşmasına da katkıda bulunur (77). Kıvrımlı fimbriya sentezinin transkripsiyonel regülatörü, daha önce de ifade edildiği üzere CsgD'dir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, CsgD ekspresyonunun sRNA'lar ve RNA şaperonu Hfq tarafından da kontrol edildiğini göstermektedir (21). sRNA'ların biyofilm oluşumunun genetik regülasyonuna katıldığı ve *flhDC* ve *csgD* ifadesini düzenlediği bilinmektedir (Şekil 2.9.) (103). Ayrıca Hfq bağımlı sRNA'ların çeşitli stres koşullarına cevap olarak, kıvrımlı fimbriya sentezinde, hücre hareketliliğinin regülasyonunda ve biyofilm oluşumunda önemli olduğu bilinen neredeyse bütün yolaklarda kilit rollere sahiptir (104).

sRNA'ların biyofilm oluşumunda rol alan genler üzerindeki regülasyon karakteristikleri, farklı bakteri grupları kullanılarak çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Örneğin, *E. coli*'de biyofilm oluşumu ile ilgili yüze yakın sRNA tanımlanmıştır ve bu sRNA'ların biyofilm oluşumu ile ilgili fenotiplere etkisi belirlenmiştir (105).



Şekil 2.9. CsgD'yi kontrol eden genetik mekanizmaların biyofilm oluşumu ve hücre hareketliliği üzerine etkileri. CsgD'nin ekspresyonu, transkripsiyonel seviyede, alternatif sigma faktörü RpoS, transkripsiyonel regülatör protein OmpR ve dolaylı olarak c-di-GMP seviyelerine bağlı olarak YdaM tarafından kontrol edilir. Ayrıca CsgD ifadesi, çevresel faktörlerin etkisiyle uyarılan çeşitli sRNA'lar vasıtasıyla transkripsiyon sonrası da regüle edilmektedir. Şekilde görülen her bir sRNA, farklı stres koşullarında ifade edilmektedir. Bu stres koşullarına bağlı olarak CsgD'nin regülasyonu OxyS, RprA, McaS, OmrA/B ve GcvB tarafından negatif regüle edilirken, DsrA tarafından pozitif regüle edilir. CsgD'nin aktivasyonu, planktonik yaşam tarzıyla ilişkili genleri baskılar (örneğin *flhDC*) ve kıvrımlı fimbriya ve selüloz gibi biyofilm ile ilişkili genleri aktive eder (104).

DsrA, transkripsiyonel regülatör olan RpoS'nin translasyonunu düzenlediği bilinen yaklaşık 87 nükleotid uzunluğunda bir sRNA'dır ve düşük sıcaklıkta indüklenerek bakterinin soğuğa karşı dirençli hale gelmesine katkı sağlar (106). DsrA, doğrudan *rpoS* mRNA'nın translasyonunu uyarır ve *flhDC* ifadesinin dolaylı bir aktivatörü olarak etki eder (103). DsrA'nın bu fonksiyonlarının sonucu olarak *E. coli*'de aşırı ekspresyonunun biyofilm oluşumunu önemli derecede artırdığı bilinmektedir. Buna karşılık DsrA'nın delesyonu ise biyofilm oluşumunu azaltır (107). Bir başka çalışmada ise, *E. coli*'de DsrA'nın aşırı ekspresyonunun biyofilm oluşumunu azalttığı ve DsrA'nın delesyonunun biyofilm oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (105).

RprA, ozmotik şoka cevap olarak RpoS üretimi için gerekli olan sRNA'dır (108). RprA'nın, durağan fazda ekspresyonu gerçekleşir ve RcsC-RcsB sistemi tarafından aktive edilir (109). RprA'nın aşırı ifadesinin asit toleransını artırdığı gösterilmiştir (110). Hem DsrA hem de RprA, RpoS translasyonunu kolaylaştırmak ve *rpoS* mRNA'nın hem birikimini hem de yarı ömrünü artırmak için *rpoS* mRNA'nın lider dizisindeki ikincil yapıyı değiştirirler (111,112). Ayrıca *E. coli*'de RprA'nın, *csgD* ve *ydaM* genlerinin ifadesini negatif olarak düzenlediği bilinmektedir. RprA'nın aşırı ekspresyonu *csgD* mRNA miktarını doğrudan azaltır veya *ydaM* ifadesini düşürerek dolaylı olarak *csgD* ifadesini de azaltmış olur (113,114). Tüm bu bulgularla birlikte yorumlandığında, RprA'nın biyofilm oluşumunu negatif yönde regüle ettiği sonucu ortaya çıkmaktadır (105).

GcvB, aminoasit metabolizmasının regülasyonunu sağlayan yaklaşık 205 nükleotit uzunluğunda bir sRNA'dır ve transkripsiyonu, GcvA tarafından uyarılır (115,116). GcvB'nin, *S. Typhimurium*'da periplazmik taşıyıcı bileşenleri olan *dppA* ve *oppA* mRNA'larına bağlanarak translasyonu engellediği bilinmektedir. *E. coli*'de ise GcvB'nin, RpoS'nin ifadesini artırdığı ancak *csgD* mRNA'sına bağlanarak *csgD*'nin translasyonunu engellediği belirlenmiştir (117). GcvB'nin bu fonksiyonlarının, *E. coli*'de biyofilm oluşumunu artırdığı ve hareketliliği azalttığı belirlenmiştir (105).

OxyS ise, oksidatif strese bağlı olarak ekspresyonu gerçekleşen ve transkripsiyonel olarak OxyR tarafından aktive edilen yaklaşık 110 nükleotit uzunluğundaki bir sRNA'dır. *E. coli*'de, RprA'nın aksine OxyS, RpoS'nin translasyonunu baskılar (118,119). Ayrıca *flhDC* ekspresyonunu azaltarak flagella sentezini inhibe eder (120). Buna bağlı olarak OxyS'nin aşırı ekspresyonunun kıvrımlı fimbriya sentezini ve *E. coli* hücre hareketliliğini azalttığı ileri sürülmüştür (105).

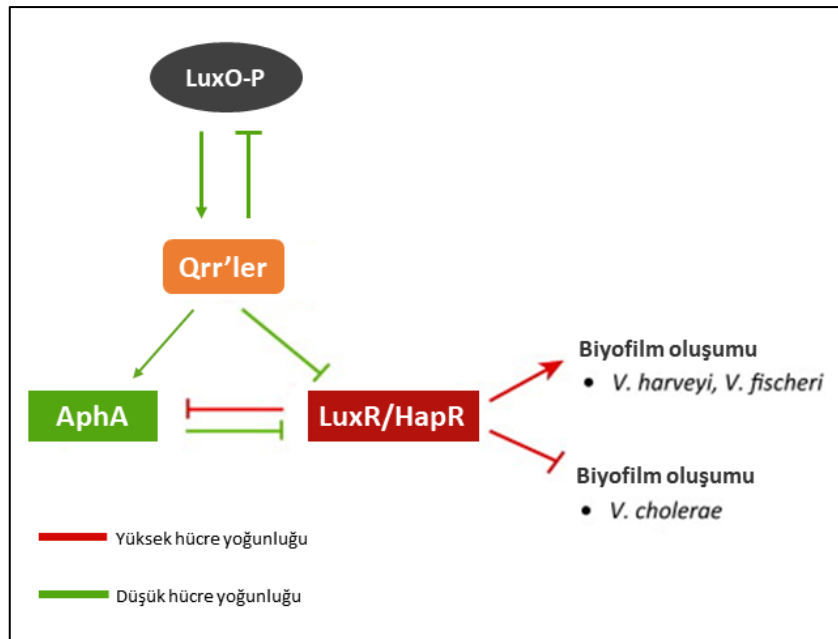
2.3.2. QUORUM SENSING İLİŞKİLİ sRNA'LAR

Bakterilerde Quorum sensing (QS) sisteminin sRNA'lar tarafından kontrol edildiğine dair bulunan kanıtların çok uzak olmayan bir geçmişi vardır (121,122). Özellikle, Gram negatif *Vibrionaceae* ailesi ve Gram pozitif stafilokoklar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, tamamen sRNA'lar tarafından yönetilen QS regülasyonunu açıkça göstermiştir (123,124). Bu sRNA'lar, AI moleküllerinin sentezini katalize eden enzimlerin üretimini etkilemek

suretiyle QS sistemini ve buna bağılı olarak biyofilm oluşumu gibi bir çok biyolojik sürecin kontrolünü sağlarlar.

İlk olarak 2004'te *Vibrionaceae* ailesinde tanımlanan QS ilişkili sRNA'lar, Quorum düzenleyici RNA'lar (Qrr'ler) olarak adlandırılmıştır. Qrr'lerin ifadesi, fosforile edilmiş LuxO tarafından aktive edilir ve Csr sistemi tarafından da ek bir regülasyon içerir (26). Qrr'ler, 5' UTR'ye baz eşleşmesi yoluyla hedef mRNA'ların translasyonunu aktive etmek veya baskılamak için Hfq'ya bağımlı trans-kodlu sRNA'lar gibi davranır. *V. harveyi*'deki Qrr'ler için şimdiye kadar toplam 20 hedef mRNA tanımlanmıştır (125). Bunlardan ikisi, QS regülasyonunun büyük çoğunluğunu kontrol eden ana transkripsiyon faktörlerini kodlayan *luxR* ve *aphA*'dır. AphA ve LuxR, biyoluminesans, hareketlilik ve tip III ve tip VI sekresyon sistemleri gibi çeşitli davranışları kontrol eder (126).

Qrr'lerin ifadesi, fosforile edilmiş LuxO tarafından aktive edilir. Düşük hücre yoğunluğunda (LCD), Qrr'ler, düşük hücre yoğunluğunun ana düzenleyicisi olan AphA'nın translasyonunu sağlar ve yüksek hücre yoğunluğunun (HCD) ana düzenleyicisi olan LuxR/HapR'nin translasyonunu engeller. HCD durumunda ise; defosforile edilmiş LuxO inaktif olduğu için Qrr ifadesi ile AphA translasyonu durur ve LuxR/HapR translasyonu gerçekleşir. LuxO üretimi, bir negatif geri besleme döngüsünde Qrr'ler tarafından baskılanır. Ayrıca AphA ve LuxR, transkripsiyonel düzeyde birbirini baskılar. (Şekil 2.10.) (127).



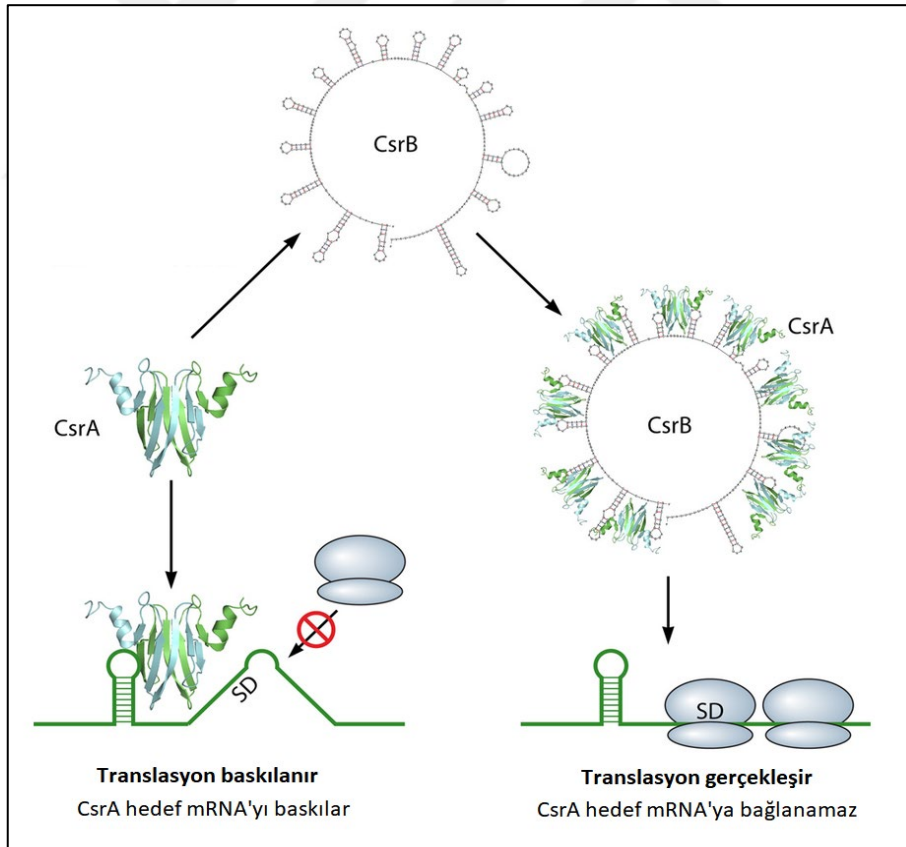
Şekil 2.10. *Vibrio* türlerinde QS sisteminin Qrr'ler tarafından düzenlenmesi (104).

Enterik bakterilerde, sRNA'ların QS sistemini regüle ettiği yönünde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların önemli bir örneği, *Salmonella* ile yakın akraba olan *E. coli*'deki AI-2 sentezini kodlayan *luxS* mRNA'nın CRP-cAMP tarafından aktive edilen RyeE (CyaR) olarak adlandırılan bir sRNA tarafından baskılanmasıdır (28). cAMP, glikoz gibi hızla metabolize olabilen karbon kaynaklarının yokluğunda birikir ve transkripsiyon faktörü CRP'nin (cAMP reseptör proteini) indükleyicisi olarak görev yapar. CRP-cAMP ayrıca AI-2'nin hücre içine alınması ve işlenmesi için gerekli proteini kodlayan Lsr operonunu da aktive eder. Bu nedenle, AI-2'nin sentezi ve tanınması, *E. coli*'deki karbon kaynağı mevcudiyetine güçlü bir şekilde bağlıdır (128). Ayrıca RyeE'nin, *E. coli*'de kıvrımlı fimbriya oluşumunu baskıladığı da bilinmektedir (105).

Enterobacteriaceae ailesinde yüksek oranda korunmuş olan MicA isimli sRNA, *luxS* geni ile komşudur ve 5' UTR'si ile örtüşür (129). MicA ekspresyonu; biyofilm oluşumu, hücre hareketliliği, virülans ve dış membranın yeniden modellenmesi gibi süreçlerle ilişkilendirilmiştir. MicA'nın ilk tanımlanan hedefi, ifadesi durağan faz esnasında düzenlenen OmpA'dır. MicA, *ompA* mRNA'sının RBS'sini bloke ederek translasyonunu baskılar. Bu düzenleme, Hfq proteini gerektirir. Hfq proteini, MicA ve *ompA*'yı yakınlaştırarak şaperon görevi görür (130–132). MicA'nın en dikkat çeken işlevi ise, *luxS* mRNA'nın translasyonunu tıpkı RyeE gibi baskılamasıdır (133). Ayrıca *S. Typhimurium*'da *luxS* bakımından mutant suşların bozulmuş bir biyofilm fenotipi sergilemesinin, LuxS'nin kendisinin yokluğundan ziyade, dengesiz MicA seviyesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (29).

Gram negatif bakterilerde bulunan Csr (karbon depolama regülatörü) sistemi; hücre hareketliliği, QS, biyofilm gelişimi ve virülans da dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik özellikleri kontrol eder. CsrA proteini ise bu sistemin merkezi bileşenidir ve durağan faz ile ilişkili metabolik süreçleri baskılayarak logaritmik üreme fazına geçişi teşvik eder. Csr sistemi, iki bileşenli sensör/regülatör sistemler ve sRNA'lar tarafından regüle edilmektedir. Bu sistem, *E. coli*'de, CsrA proteini ve CsrB/C adlı iki sRNA'dan oluşur (134). CsrA, aslında glikojen biyosentezinin bir regülatörüdür. Bakteri durağan fazdayken glikojen biyosentezini engellemek için hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe eder. Shine-Dalgarno (SD) sekansına yakın bir bölgeye bağlanarak translasyonu önler ve mRNA degradasyonunu kolaylaştırır. CsrB ve CsrC olarak adlandırılan sRNA'lar ise, CsrA proteinine bağlanarak

aktivitesini düzenler ve onun hedef mRNA'sına bağlanmasını önlerler (Şekil 2.11.) (25). Ayrıca CsrB ve CsrC'nin *E. coli*'de biyofilm oluşumunu ve kıvrımlı fimbriya sentezini teşvik ettiği bilinmektedir (105). Lenz ve ark. (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, insan patojeni *V. cholerae*'da *E. coli*'nin CsrB/C sRNA'larına benzeyen üç sRNA tanımlanmıştır. CsrB, CsrC ve CsrD olarak adlandırılan bu sRNA'lar, global regülatör olan CsrA'nın aktivitesini kontrol ederler. Bu sRNA'ların ekspresyonu ise, iki bileşenli VarS/VarA sensör sistemi tarafından sağlanır. VarS/VarA homologları, *E. coli*'de BarA/UvrY, *S. Typhimurium*'da BarA/SirA olmak üzere çeşitli Gram negatif bakterilerde bulunur. *V. cholerae*'da gerçekleştirilen çalışmanın en önemli bulgularından biri de, VarS/VarA-CsrA/BCD'nin QS regülatörü olan *hapR*'nin ifadesinin regülasyonunda yer almasıdır. VarS/VarA-CsrA/BCD'nin *hapR*'yi kontrol etmek için öncelikli olarak LuxO aracılığıyla çalıştığını gösteren ön kanıtlar mevcuttur. Sonuç olarak biyoinformatik analizler ve deneysel yöntemler, VarS/VarA ve CsrA arasındaki bağlantının CsrB/C/D olarak adlandırılan üç sRNA olduğunu ortaya çıkarmıştır (135).



Şekil 2.11. CsrA aktivitesinin CsrB tarafından düzenlenmesi. CsrB, yüksek afinite ile birden fazla CsrA dimerine bağlanır ve CsrA'nın hedef mRNA'lara bağlanmasını önler. Ribozomlar mavi renkle gösterilmiştir ve Shine-Dalgarno dizisi SD olarak kısaltılmıştır (136).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Salmonella cinsi bakteriler, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturan ve en sık izole edilen gıda kaynaklı patojenlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her yıl 10 kişiden 1'i gıda kaynaklı hastalık geçirmektedir (137). Aynı zamanda biyofilm oluşturmaları sebebiyle, patojenitesi artmakta ve tedavi edilmeleri güç haline gelmektedir (138). Bu nedenle, *Salmonella*'nın biyofilm yaşam döngüsünün daha iyi anlaşılması, bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların yükünü azaltmamızı sağlayacaktır.

Son yıllarda, bakteriyel sRNA'lar, transkripsiyon faktörleri üzerindeki düzenleyici işlevleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Başlangıçta ağırlıklı olarak stres tepkilerini düzenlemeyle ilişkilendirilen sRNA'lar, bakterilerde gelişimsel süreçlerin yanı sıra QS sinyalizasyonu, biyofilm oluşumu ve hücre hareketliliği gibi birçok davranışın kontrolünde de anahtar unsurlar olarak yer alırlar (139). *Salmonella* cinsinde çok sayıda sRNA ayrıntılı olarak incelenmiş olsa da, bu sRNA'ların QS düzenlemesindeki rolleri halen bilinmemektedir. Ancak diğer bakteri gruplarında yapılan bazı çalışmalar, QS sistemi ile biyofilm oluşumu arasındaki bağlantının sRNA'lar olduğunu göstermektedir. Bu durumun en belirgin örneği, *V. cholerae*'da, QS regülatörü olan *hapR*'nin ifadesini düzenleyen VarS/VarA sensör sistemi ile biyofilm oluşumu ve hücre hareketliliğinin kontrolünü sağlayan Csr sistemi arasındaki bağlantının CsrB/C/D adlı üç sRNA olmasıdır. *S. Typhimurium*'da BarA/SirA olarak bilinen *V. cholerae*'nin VarS/VarA sensör sistemi, QS sinyal iletim yolunu CsrA ve CsrA'yı inhibe eden bu üç sRNA aracılığıyla dolaylı olarak düzenlediği bilinmektedir (135). Buna karşın *Salmonella*'da QS sinyal ileti yolağı ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin varlığı ve hangi mekanizmaları içerdiği halen gizliliğini korumaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda *S. Typhimurium* biyofilmlerinin ana regülatörü olan CsgD'nin AI-2 aktivitesi ve QS ilişkili sRNA'lar ile bağlantısının olduğunu ön kanıtlarını sunmak istedik. Bu amaçla aşağıda yer alan hedefleri gerçekleştirdik:

- *E. coli* ve *V. cholerae* gibi farklı bakteri gruplarındaki güncel çalışmaların taranması ile *S. Typhimurium*'da var olan QS ilişkili sRNA'ların belirlenmesi
- *S. Typhimurium*'da *csgD* ifadesinin kontrol altına alınması için arabinoz ile indüklenebilir pBAD24 plazmidine klonlanması ve *csgD* bakımından mutant *S. Typhimurium* suşuna aktarılması

- QS ilişkili sRNA'ların, *csgD* ifadesine bağı olarak hücredeki ekspresyon seviyelerinde meydana gelen farklanmaların qRT-PZR denemeleri ile saptanması
- Doğal tip ve *csgD* ifadesinin kontrol altına alındığı *S. Typhimurium* suşlarındaki AI-2 aktivitesinin belirlenerek karşılaştırmalı analizinin gerçekleştirilmesi
- AI-2 aktivitesinde anlamlı farklılıkların belirlendiği suşlarda bu moleküllerinin hücre içine alımında görevli genlerin ifade seviyeleri üzerindeki etkisinin qRT-PZR denemeleri ile araştırılarak regülasyonun hangi yolak üzerinden gerçekleştiğini kararlaştırmak

Biyofilm ile mücadelede yeni stratejilerin belirlenebilmesi için, altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması son derece önemlidir. *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumu ile ilişkili bu tip düzenleyici mekanizmaların aydınlatılması, hem sağlık hem de ekonomik açıdan kayıpların önlenmesine katkılar sunmakla birlikte, literatürde bu konu ile ilgili mevcut olan eksikliği tamamlayacaktır. Bu çalışmada sunulan birçok varsayılan düzenleyici etkileşimin gelecekte diğer araştırmacılar tarafından doğrulanacağını umut ediyoruz. Ayrıca CsgD regülasyonunun indüklediği sRNA'ların, QS regülasyonunda da rol aldığını gösteren çalışmalara ihtiyaç vardır. Bulgularımız, *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunun ana regülatörü olan CsgD ile QS ilişkili sRNA'ların yer aldığı post-transkripsiyonel ağları genişletecektir. Üstelik *csgD*'nin, AI-2 aktivitesindeki üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, QS sinyal ileti yolağında yer alan faktörler üzerinde de doğrudan veya dolaylı olarak rol aldığına dair ipuçları verebilir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. BAKTERİLER VE PLAZMİD

Çalışmada kullanılan pBAD24 plazmidi, doğal tip *S. Typhimurium* 14028 ve *csgD* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* suşu ve pBAD24 plazmidini içeren *S. Typhimurium* MZ1629 suşu Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda mevcut olan kültür koleksiyonundan sağlandı. *csgD* geninin ifadesinin kontrol altına alınması amacıyla BAD promotörü arkasına klonlandığı *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD*/pBAD24+*csgD* suşu ise bu tez çalışması sırasında oluşturuldu ve tez süresince MN1630 kodu kullanılarak adlandırıldı. *Salmonella* suşlarının AI-2 sentez aktivitelerinin araştırılmasında kullanılan *Vibrio harveyi* BB170 suşu ATCC (American Type Culture Collection) kültür koleksiyonundan sağlandı.

4.1.1.1. Gelişme Koşulları

Salmonella suşları, Luria Bertani Broth (LB) ortamında 37 °C'de 18 saat çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* suşunun gelişme ortamına kanamisin (75 µg/mL), *S. Typhimurium* MN1630 suşunun gelişme ortamına ise kanamisin (75 µg/mL) ve ampisilin (100 µg/mL) antibiyotikleri ilave edildi. Ayrıca *csgD* ifadesinin sağlanması için MN1630 suşunun gelişme ortamına, daha önceki çalışmalarımız sonucunda pBAD promotörünü optimum düzeyde teşvik ettiği belirlenen % 0.1 oranında L-arabinoz ilave edildi. *Vibrio harveyi* BB170 suşu, otoindüktör biyoanaliz besiyeri (AB Broth) ortamında 30 °C'de 18 saat çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. Bakteri kültürleri, % 60 gliserol içeren Luria-Bertani (LB) sıvı besi ortamında, pBAD24 plazmidi ise uygun tampon (Tris-EDTA) içerisinde -80 °C'de saklandı.

4.1.2. BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER

Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin içerikleri aşağıda yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)

İçerik	Miktar (g/L)
Trypton (Fluka,France)	10 g
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5 g
Agar (Merck,Germany)	15 g

Çizelge 4.1.'deki besiyeri içerikleri distile su ilavesi ile çözdürülerek toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandı. Hazırlanan sıvı besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan sonra, katı besiyeri ise agar ilavesinden sonra otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edildi. Katı besiyerleri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 15 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 4.2. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)

İçerik	Miktar (g/L)
NaCl (Merck, Germany)	17,5 g
MgSO ₄ (BioShop, Canada)	12,3 g
Casamino asit (BD, USA)	2 g

Çizelge 4.3. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)

İçerik	Hacim
KH ₂ PO ₄ (pH 7.0) (BioShop, Canada)	10 mL
0,1 M L-Arjinin (Merck, Germany)	10 mL
Gliserol (Sigma, USA)	10 mL

Çizelge 4.2.'de verilen içerik 970 mL distile su içerisinde çözdürülerek 3N NaOH ile pH değeri 7.5 ± 0.02 'ye ayarlanarak otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edildi. Tamamen soğuduktan sonra Çizelge 4.3.'de belirtilen hacimlerde eklemeler yapılarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Çizelge 4.4. Stok Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu (5X)

İçerik	Miktar
Trizma (Sigma, USA)	54 g
Borik asit (Sigma, USA)	27,5 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0) (Sigma, USA)	20 mL

Çizelge 4.4.'de verilen içerik distile su ilavesi ile çözdürülerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

4.1.3. PRİMERLER

Tez çalışmasında kullanılan primerler aşağıda yer almaktadır.

Çizelge 4.5. qRT PZR yöntemi ile ifade düzeylerindeki değişimlerin araştırıldığı genler ve bu genlere ait primer dizileri

Gen Adı	Primer Dizisi (5' - 3')	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>csgD</i>	F: GCGATGAGTGAGTAATGCGG	176
	R: GGCCTCAATATTAACGGCGTG	
<i>csrB</i>	F: CAGGATGAAGCAAAGTGGAAAG	131
	R: GCCCGATGTGATAGCTTCTT	
<i>csrC</i>	F: CGAGGACGCTAACAGGATCA	116
	R: GCCCTGTTTTTCCCTTAGCC	
<i>micA</i>	F: GGGCGAGTCTGAGTATATGAAAG	112
	R: AAACACGCCTGACCCAAA	
<i>ryeE</i>	F: TTCGCTCAATGCGGGTATTA	148
	R: GGCGGGAAGTACCACTTT	
<i>lsrA</i>	F: AACTGGCTGAAACGCTGTAC	184
	R: AGCGAACAGACATTCCATGC	
<i>lsrK</i>	F: GGATGGCCTTTATGCTCAGC	144
	R: TTACCGGCGAGAGAATGTCA	
<i>lsrR</i>	F: CGATATTGGTCTGCGCTTAG	156
	R: GTGACCAGTCGGATTTGTTG	

Çizelge 4.6. *csuD* geninin PZR ile çoğaltılması amacıyla kullanılan primer çifti

Gen Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün büyüklüğü (bç)
<i>csuD</i> F <u>EcoRI</u>	CAACGAATTCATGTTTAATGAAGTCCATAGTAGTC	671
<i>csuD</i> R <u>PstI</u>	TCATCTGCAGTTACCGCCTGAGATTATCG	

Altı çizili diziler RE kesim bölgelerini göstermektedir.

Çizelge 4.7. pBAD24 vektörüne klonlanan genin doğrulanması amacıyla kullanılan koloni PZR primeri

Gen Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün büyüklüğü (bç)
pBAD24	F: ATGCCATAGCATT TTTATCC	*209
	R: GATTTAATCTGTATCAGG	

*Hedef genin pBAD24 vektörünün klonlama bölgesine insersiyonu gerçekleşirse, 209 bç olan PZR ürün büyüklüğüne klonlanan dizinin büyüklüğü (bç) eklenir.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. *csuD* GENİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI

Gerçekleştirilen bu çalışmada, *csuD* gen ifadesini kontrolümüz altına almak amacı ile *csuD* geninin açık okuma çerçevesi arabinoz ile indüklenebilir BAD promotorunun arkasına klonlandı. Bu doğrultuda öncelikle hedef gen, restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Ardından hem pBAD24 vektörü hem de *csuD* kodlama bölgesi uygun enzimlerle (EcoRI ve PstI) kesilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmid, bir sonraki aşamada transformasyon işlemi için kullanıldı. Bu aşamalar detaylı olarak aşağıda yer almaktadır.

4.2.1.1. Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu

S. Typhimurium 14028 suşu, LB sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat süre ile çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. Genomik DNA izolasyonu için, GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma/ABD) kiti kullanıldı ve üretici firma tarafından belirtilen aşamalar takip edildi. İzolasyon sonrası elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) cihazı kullanılarak belirlendi. Absorbans 260/280 nm değeri 1.7-2.0 aralığında ve 260/230 nm değeri 2.0-2.2 aralığında olan DNA'lar saf olarak değerlendirildi. Saflığı belirlenen DNA'lar, % 1 agaroz jelde 100 V (volt) sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Bu süre sonunda jel, 366 nm

dalga boyunda ultraviyole (UV) ışıktaki Syngene Gene Genius Jel Görüntüleme Sistemi SN:SYDR2 (Synoptics Group, Cambridge, Birleşik Krallık) kullanılarak görüntülendi.

4.2.1.2. *csgD* Geninin PZR İle Amplifikasyonu

csgD geninin amplifikasyonu, *S. Typhimurium* 14028 suşundan izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirildi. *csgD* geninin çoğaltılmasında kullanılacak primer çifti, *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz (RE) tanıma bölgeleri eklenerek dizayn edilmiştir (Çizelge 4.6.). Primerlere eklenen RE tanıma dizilerinin ait olduğu enzimin çoğaltılacak gen içerisinde kesim bölgesi içermemesine ve pBAD24 vektörünün klonlama bölgesinde var olmasına dikkat edildi. Amplifikasyon, Thermal Cycler (Bio-Rad T100, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4.8. ve Çizelge 4.9.'da verilmiştir. PZR sonrasında, çoğaltılan DNA örnekleri Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak saflaştırıldı ve TBE tamponu içeren tankta, 0.2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldü. Son aşamada jel UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 4.8. *csgD* geninin amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı (1X)

İçerik	Hacim (µL)
Taq tampon çözeltisi (10X)	2.5
dNTP (10 mM)	1
İleri primer (10 µM)	1.25
Geri primer (10 µM)	1.25
MgCl ₂ (25 mM)	4
Taq DNA polimeraz (Fermentas, 1 U/µL)	0.125
Nükleaz içermeyen su	12.875
DNA (100 ng/µL)	2
Toplam	25

Çizelge 4.9. *csuD* geninin amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	30
Bağlanma	60 °C	45 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

4.2.1.3. PZR Ürününün RE Enzim Kesim Reaksiyonu İle Doğrulanması

Saflaştırılan *csuD* PZR ürünü, *EcoRV* RE enzimi ile kesilerek doğru bölgenin amplifikasyonunun gerçekleştiği kontrol edildi. *EcoRV* enzimi, toplam uzunluğu 671 bp olan *csuD* PZR ürünü tek bir bölgeden keserek 514 bp ve 157 bp olmak üzere iki DNA parçasına ayırmaktadır. Kesim ürünlerinin uzunluğunu belirlemek için RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>, version 3) hizmetinden yararlanıldı. *EcoRV* enzimi ve tampon çözeltisi Jena Bioscience firmasından sağlandı ve kesim reaksiyonu için bu firma tarafından önerilen reaksiyon karışımı (Çizelge 4.10.) hazırlanarak, önerilen inkübasyon koşulları takip edildi. Kesim ürünleri 0.2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldü ve jel UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

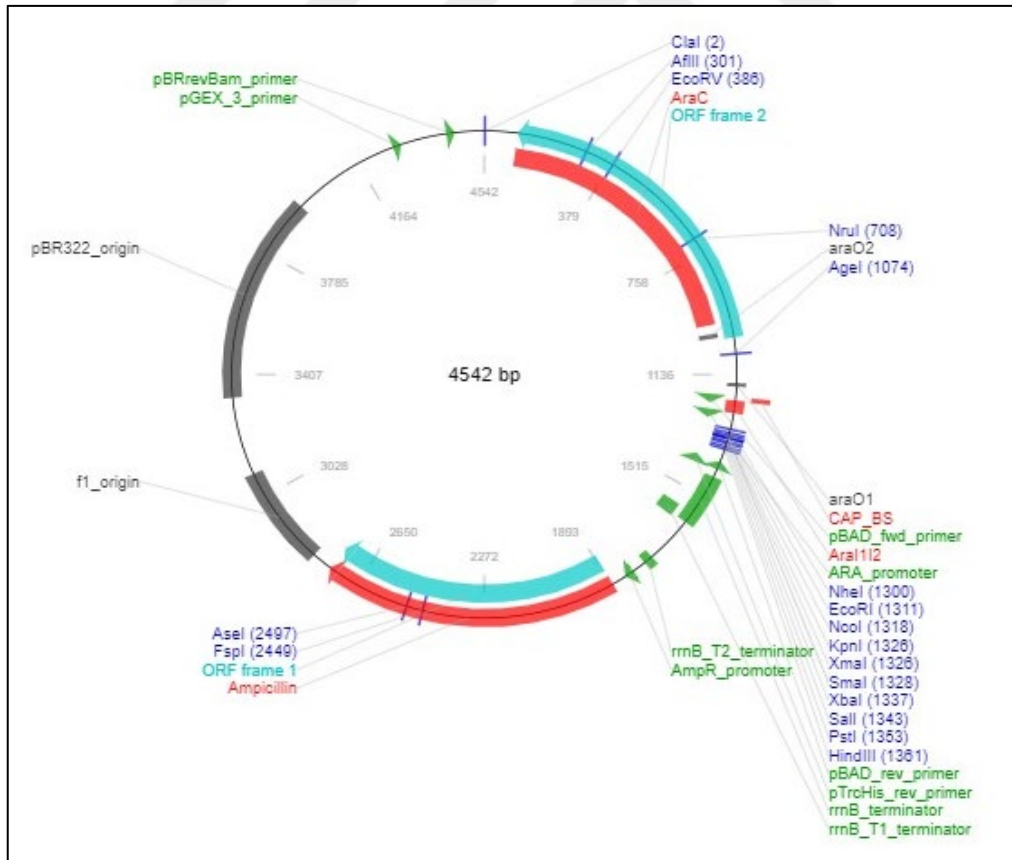
Çizelge 4.10. PZR ürünü olan *csuD* geni için *EcoRV* RE kesim reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	24.4
Universal tampon UB (10X)	5
Saflaştırılmış <i>csuD</i> PZR ürünü (500 ng/µL)	20
<i>EcoRV</i> RE enzimi (10 U/µL)	0.6
Toplam	50

Çizelge 4.10.'da belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve kesim reaksiyonu için 37 °C'de 30 dakika inkübasyon uygulandı. Ardından *EcoRV* enziminin inaktivasyonu için 80 °C'de 20 dakika bekletildi. Sıcaklık işlemleri, Thermal Cycler (Bio-Rad T100, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.1.4. pBAD24 Plazmid DNA'sının İzolasyonu

pBAD24 plazmidini (Şekil 4.1.) içeren *S. Typhimurium* MZ1629 suşu, 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C'de 18 saat süre ile çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. Aktif kültürden High Pure Plasmid Isolation (Roche, USA) kitinin protokolü izlenerek plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmid DNA'ların saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) cihazı kullanılarak belirlendi ve 0.2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi sonunda jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 1 kb (kilobaz) DNA Ladder (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. pBAD24 plazmidinin genetik haritası (140).

4.2.1.5. RE Enzim Kesim Reaksiyonları

csgD geninin klonlanmasında kullanılan RE enzimleri ve bu enzimlere ait tampon çözeltiler Thermo Scientific/ABD firmasından sağlandı. Tüm kesim reaksiyonları için, bu firma tarafından önerilen reaksiyon karışımları (Çizelge 4.11. ve Çizelge 4.12.) kullanıldı.

Çizelge 4.11. PZR ürünü *csgD* geni için ikili RE kesim reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	11
Tango tamponu (10X)	5
Saflaştırılmış <i>csgD</i> PZR ürünü (500 ng/µL)	7
<i>Pst</i> I RE enzimi (10 U/µL)	1
<i>Eco</i> RI RE enzimi (10 U/µL)	1
Toplam	25

Çizelge 4.12. pBAD24 vektör DNA için ikili RE kesim reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	3
Tango tamponu (10X)	5
pBAD24 DNA (500 ng/µL)	15
<i>Pst</i> I RE enzimi (10 U/µL)	1
<i>Eco</i> RI RE enzimi (10 U/µL)	1
Toplam	25

RE enzim kesim reaksiyonları için 37 °C’de 2 saat inkübasyon uygulandı. Ardından *Pst*I RE enziminin inaktivasyonu için 65 °C’de 20 dakika ve *Eco*RI RE enziminin inaktivasyonu için 80 °C’de 20 dakika bekletildi. Enzimatik reaksiyonlarla kesilen DNA’lar Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak saflaştırıldı. Kesim ürünleri, moleküler büyüklük tespiti için GeneRuler 1 kb ve 100 bç DNA Ladder varlığında % 1’lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülendi.

4.2.1.6. Ligasyon

Kesim ürünlerinde oluşan yapışkan uçlar vasıtasıyla PZR ürününü lineer hale getirilen pBAD24 vektörüne aktararak rekombinant plazmid elde etmek için ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi. T4 DNA ligaz enzimi ve bu enzime ait tampon çözeltileri Thermo Scientific/ABD firmasından sağlandı. Üretici firmanın uygulama önerisi dikkate alınarak, pBAD24 vektörü ve vektöre klonlanacak *csgD* gen dizisinin molar konsantrasyonlarına göre 3:1 oranında ligasyon karışımları (Çizelge 4.13.) hazırlandı ve bu karışımlar 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışım, 70 °C’de 5 dakika inkübe edilerek T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu sağlandı. Rekombinant plazmid DNA’lar, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aracılığı ile saflaştırıldı ve kullanımına kadar -20 °C’de muhafaza edildi. DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanmasında aşağıda verilen denklemden yararlanıldı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu (ng)} = \frac{\text{DNA boyutu (bç)}}{\text{Vektör boyutu (bç)}} \times \text{Vektör Konsantrasyonu (ng)} \times \text{Ligasyon oranı (3:1)}$$

Çizelge 4.13. Ligasyon reaksiyonu karışımı

İçerik	3:1	*Kontrol Grubu
Nükleaz içermeyen su	2 µL	7 µL
T4 DNA ligaz tamponu (10X)	2 µL	2 µL
Saflaştırılmış <i>csgD</i> PZR ürünü (88,64 ng/µL)	5 µL	-
pBAD24 (200 ng/µL)	10 µL	10 µL
T4 DNA ligaz (1 Weiss U)	1 µL	1 µL
Toplam Hacim	20 µL	20 µL

*Kontrol grubu olarak yalnızca vektörü içeren bir ligasyon karışımı hazırlandı.

4.2.2. REKOMBİNANT PLAZMİDİN TRANSFORMASYONU

Ligasyon reaksiyonu ile elde edilen rekombinant plazmid (pBAD24+*csgD*), elektrokompentan hale getirilmiş *S. Typhimurium* 14028Δ*csgD* suşuna aktarıldı. Daha sonra, rekombinant plazmidi içeren kolonilerin, kanamisin (75 µg/mL) ve ampisilin (100 µg/mL) içeren LB besiyerlerinden seçilimi yapıldı ve bu plazmidi içerdikleri doğrulandı. Bu aşamalar detaylı olarak aşağıda anlatılmıştır.

4.2.2.1. Elektrokompentan *S. Typhimurium* 14028 Δ *csdD* Hücrelerinin Hazırlanması

S. Typhimurium 14028 Δ *csdD* suşu, 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplerde 37 °C ve 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda 1 gece geliştirildikten sonra, 75 µg/mL kanamisin içeren LB Agar petri plaklarına tek koloni düşürülecek şekilde steril öze ile ekildi ve 37 °C'de 18 saat inkübe edildi. Agar yüzeyinde gelişen tek koloniler seçilerek steril öze ile 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplere alındı ve 37 °C'de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda 1 gece inkübe edildi. Üreme gözlenen kültürden LB besiyerine 1/50 oranında (5 mL LB besiyerine 100 µL aktif kültür) inoküle edildi ve 37 °C'de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda 1 saatlik inkübasyonun ardından, 15 dakikalık periyotlarda kültürün optik yoğunluk (OD₆₀₀) değeri belirlendi. Kültürün optik yoğunluğu 0.3-0.4 aralığına ulaştıktan sonra inkübasyon sonlandırıldı ve kültür ortamı 4 °C'de 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra hücre çöktelleri önceden 4 °C'ye soğutulmuş % 10 gliserol içeren steril deiyonize su içerisinde süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon, 4 °C'de 5500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek tekrar hücre çöktelleri elde edildi. Üst sıvı döküldükten sonra hücre çöktelleri önceden % 10 gliserol içeren steril deiyonize su içerisinde süspansiyon edildi ve önceden buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 50 µL'lik süspansiyonlar halinde dağıtıldı. Hazırlanan kompetan hücreler kullanımlarına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

4.2.2.2. Rekombinant Plazmidin Elektroporasyonu

Ligasyon reaksiyonu ile elde edilen rekombinant plazmid, Gene Pulser Xcell Electroporation System cihazında (Bio-Rad, USA), 2 mm genişliğinde örnek haznesine sahip elektroporasyon küvetleri (Gene Pulser Cuvettes, Bio-Rad, USA) kullanılarak *S. Typhimurium* 14028 Δ *csdD* elektrokompentan hücrelerine aktarıldı. Elektroporasyon öncesinde -80 °C'de muhafaza edilen kompetan hücreler, -20 °C'de muhafaza edilen rekombinant plazmid ve elektroporasyon küvetleri buz üzerinde bekletildi. 50 µL kompetan bakteri süspansiyonu ile 0.1-1 µg rekombinant plazmid DNA karıştırılarak küvete aktarıldı. Bu işlem esnasında küvetin kuru olmasına ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edildi. Elektroporatör cihazında 2500 V değeri ayarlanarak 5 ms elektrik akımı uygulandı. Elektroporasyon uygulanmış hücrelerin bulunduğu küvete önceden 37 °C'ye ısıtılmış 500 µL LB besiyeri eklendi ve pipet yardımıyla karıştırıldı. Ardından tüm içerik steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve tekrar 500 µL LB besiyeri eklendi. 1 saat boyunca 37 °C'de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda inkübe edilen ortamdan seçici antibiyotikler

içeren (100 µg/mL ampisilin ve 75 µg/mL kanamisin) LB agar plaklarına yayma ekim yapıldı ve 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. Besiyeri üzerinde gelişen koloni elde edene kadar bu basamak tekrar edildi.

4.2.2.3. Rekombinant Kolonilerin PZR İle Doğrulanması

Ampisilin ve kanamisin içeren LB agar plakları üzerinde ürettiği gözlenen koloniler rastgele seçildi ve hedef genin varlığının saptanması amacıyla pBAD24 primerleri (Çizelge 4.7.) kullanılarak koloni PZR gerçekleştirildi. PZR öncesinde, seçilen her bir koloninin rekombinant plazmidini içermesi olasılığı göz önüne alınarak LB agar plaklarına ekimi yapıldı ve 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. PZR sonrasında, hedef geni içermeyen pBAD24 plazmidleri 209 bç ürün oluştururken, rekombinant plazmidlerde bu ürüne hedef genin uzunluğu eklenir. İnsersiyonu hedeflenen *csdD* geni 665 bç olduğu için pozitif kolonilerin PZR işlemi sonrasında 874 bç uzunluğunda ürün oluşturması beklendi. Koloni PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4.14. ve Çizelge 4.15.'de verilmiştir. Seçilen koloniler 50 µL distile su içerisinde süspanse edilerek 98 °C'de 10 dakika inkübe edildi ve ardından 2 µL alınarak PZR denemesinde kalıp DNA olarak kullanıldı. PZR ürünleri, TBE tamponu içeren tankta, 0.2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldü. Süre sonunda jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 4.14. Koloni PZR için kullanılan reaksiyon karışımı (1X)

İçerik	Hacim (µL)
Taq tampon çözeltisi (10X)	2
dNTP (10 mM)	0.5
İleri primer (10 µM)	0.5
Geri primer (10 µM)	0.5
MgCl ₂ (25 mM)	2
Taq DNA polimeraz (1 U/µL)	0.1
Nükleaz içermeyen su	7.4
Süspanse koloni örneği	2
Toplam	15

Çizelge 4.15. Koloni PZR için kullanılan sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	15 saniye	25
Bağlanma	54 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

4.2.2.4. Rekombinant Plazmidlerin Doğrulanması

Koloni PZR ile hedef geni içerdiği doğrulanmış koloniler öze ile 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplere alındı ve 37 °C’de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında High Pure Plasmid Isolation (Roche, USA) kitinin protokolü izlenerek plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmid DNA’ların hedef geni içerip içermediği RE enzim kesimiyle belirlendi. Kesim reaksiyonu için hem hedef gen dizisi hem de plazmid DNA dizisi içerisinde birer kesim bölgesi bulunan *EcoRV* enzimi tercih edildi. *EcoRV*, toplam büyüklüğü 5175 bp (*csuD*+pBAD24) olan rekombinant plazmid bu iki tanıma bölgesinden keserek 4088 bp ve 1087 bp olmak üzere iki parçaya ayırır. Kesim ürünlerinin uzunluğunu belirlemek için RestrictionMapper version 3 hizmetinden yararlanıldı. *EcoRV* enzimi ve tampon çözeltisi Jena Bioscience firmasından sağlandı ve kesim reaksiyonu için bu firma tarafından önerilen reaksiyon karışımı (Çizelge 4.16.) kullanıldı. Kesim ürünleri % 1’lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldü. Son aşamada, 0.2 µg/mL EtBr içeren jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 1 kb DNA Ladder kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.16. Rekombinant plazmidlerin kesiminde kullanılan *EcoRV* RE reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	14
Universal tampon UB (10X)	5
Plazmid DNA (500 ng/µL)	30
<i>EcoRV</i> RE Enzimi (10 U/µL)	1
Toplam	50

Çizelge 4.16.'da belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve kesim reaksiyonu için 37 °C'de 30 dakika inkübasyon uygulandı. Ardından *EcoRV* enziminin inaktivasyonu için 80 °C'de 20 dakika bekletildi.

4.3. CsgD REGÜLASYONUNA BAĞLI OLARAK QS İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Doğal tip *S. Typhimurium* 14028, *csgD* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* ve *csgD* geninin ifadesinin kontrol altına alınması amacıyla BAD promotörü arkasına klonlandığı *S. Typhimurium* MN1630 suşlarında *csrB*, *csrC*, *micA*, *ryeE* sRNA'ların ve AI-2 moleküllerinin hücre için alımında görevli *lsrA*, *lsrK*, *lsrR* genlerinin ifade düzeyi araştırıldı. Tüm suşlar LB sıvı besiyerinde 18 saat boyunca 37 °C'de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda geliştirildi. *S. Typhimurium* MN1630 suşu, süre bitiminde yine uygun antibiyotikleri içeren LB sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edildi. OD₅₉₅ değeri 0.2 düzeyine ulaşana kadar çalkalamalı koşullarda, 37 °C'de geliştirildikten sonra, otama BAD promotörünün teşviki için % 0.1 oranında L-arabinoz ilave edilerek 30 dakika daha inkübasyona tabi tutuldu ve böylece *csgD* geninin over-ekspresyonu sağlandı. Ardından çalışma kapsamında araştırılan genlerin CsgD regülasyonuna bağlı ifade değişimlerinin belirlenmesi çalışmaları için tüm suşlardan toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. L-arabinoz ile indüklenmemiş *S. Typhimurium* MN1630 suşu kontrol grubu olarak kullanıldı. Tüm suşlardan elde edilen RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra qRT-PZR ile sRNA genlerinin göreceli kat değişimleri (fold-change) belirlendi.

4.3.1. TOPLAM RNA İZOLASYONU

Tüm *Salmonella* suşları LB sıvı besiyerinde OD₅₉₅ değeri yaklaşık 0.3 düzeyine ulaşana kadar (durağan faz) çalkalamalı koşullarda, 37 °C'de geliştirildikten sonra, toplam RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation (Roche/Germany) kiti kullanıldı ve üretici firma tarafından belirtilen aşamalar gerçekleştirildi. Aktif kültürlerden 1.5 mL alınıp mikrosantrifüj tüplerine aktararak 4 °C'de ve 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre çöktelleri 200 µL pepton ile tamponlanmış tuzlu su (PBS, pH 8.0) ile süspansiyon edildi. Üzerine 400 µL liziz/bağlama tamponu ilave edilerek 15 saniye karıştırıldı. Ardından 100 µL lizozim (50 mg/ml) eklenip 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon

sonunda solüsyon, kitin içerisinde bulunan spin kolona aktarılarak 4 °C’de, 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra spin kolondaki filtrenin üzerine 90 µl DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I karıştırılarak eklendi. 25 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kolona 500 µL yıkama tamponu I eklendi ve 4 °C’de 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak kolona 500 µL yıkama tamponu II eklendi ve 4 °C’de 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak kolona 200 µl yıkama tamponu II eklenip 2 dakika santrifüj edildi. Son aşamada, kolonda bulunan filtrenin üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklendi ve 4 °C’de 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA’ların saflık ve miktar tayinleri ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) cihazı kullanılarak belirlendi ve % 2 agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda, 0.2 µg/mL EtBr içeren jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 1 kb (kilobaz) DNA Ladder (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. cDNA SENTEZİ

Tüm *Salmonella* suşlarından elde edilen RNA örnekleri ile cDNA sentezi, cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımları ve uygulanan sıcaklık döngüsü Çizelge 4.17., Çizelge 4.18. ve Çizelge 4.19.’da verilmiştir. Elde edilen cDNA’lar, qRT-PZR denemelerine kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Çizelge 4.17. Denatürasyon karışımı

İçerik	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Hacim (µL)
RNA	-	1000 ng/µL	-
Random hekzamer primer	600 pmol/µL	60 µM	2
Su (PCR grade)	-	-	Son hacmi 13 µL’ye tamamlar.

Son hacim su ile 13 μL 'ye tamamlandıktan sonra tüpler 65 $^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika RNA denatürasyonu için bekletildi. Süre bitiminde hemen buz üzerine alınarak Çizelge 4.18.'de belirtilen miktarlarda ters transkripsiyon karışımı eklendi.

Çizelge 4.18. Ters transkripsiyon karışımı

İçerik	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Hacim (μL)
Ters transkriptaz tamponu	5X	1X (8 mM MgCl_2)	4
RNaz inhibitörü	40 U/ μL	20 U	0.5
dNTP karışımı	Her nükleotid için 10 mM	Her nükleotid için 1 mM	2
Ters transkriptaz	20 U/mL	10 U	0.5
Son Hacim	-	-	20

Çizelge 4.18.'de belirtilen içerikler sırası ile steril bir tüpe aktarıldıktan sonra pipet yardımı ile karıştırıldı. Ardından Çizelge 4.19.'da belirtilen ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 4.19. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Uzama 1	25	10	1
Uzama 2	50	60	1
İnaktivasyon	85	5	1

Döngü sonunda tüpler buz üzerine alınarak reaksiyon durduruldu ve örnekler qRT-PZR denemelerine kadar -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

4.3.3. GEN İFADE DÜZEYLERİNİN qRT-PZR İLE BELİRLENMESİ

qRT-PZR denemelerinde ifade düzeyleri araştırılan genler ve gene özgü primerler, Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir. qRT-PZR denemeleri Light Cycler 480 (Roche, Germany) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm genler için kullanılan amplifikasyon karışımları 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonia) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı (Çizelge 4.20.). Amplifikasyon reaksiyonları 96

kuyulu plaklarda toplam 10 µL hacimde gerçekleştirildi. cDNA kalıbını içermeyip aynı hacimde ddH₂O içeren reaksiyon karışımı negatif kontrol (NK) olarak kullanıldı. Light Cycler 480 cihazında amplifikasyon için kullanılan döngü program Çizelge 4.21.'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı

İçerik	Son Konsantrasyon	Hacim (µl)
EvaGreen qPCR supermix (5X)	1X	2
İleri primer	10 pmol/µL	0.5
Geri primer	10 pmol/µL	0.5
cDNA (1:10 sulandırılmış)	10 ng/µL	1
ddH ₂ O	-	6
Toplam hacim	-	10

Çizelge 4.21. LightCycler 480 cihazında kullanılan qRT-PZR program

Basamak	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Artış (°C/s)
İlk Denatürasyon	İlk Denatürasyon	95	15 dk	4.4
Amplifikasyon (40 Döngü)	Denatürasyon	95	15 sn	4.4
	Bağlanma	58*	20 sn	2.2
	Uzama	72	20 sn	4.4
Erime Eğrisi	Denatürasyon	95	30 sn	4.4
	Bağlanma	60	30 sn	2.2
	Denatürasyon	99		0.11
Soğuma	Soğuma	40	30 sn	2.2

*Primer bağlanma sıcaklığı (T_m) tüm genler için 58 °C iken referans gen olan 16S için 55 °C olarak belirlendi.

4.3.4. qRT-PZR VERİ ANALİZİ

4.3.4.1. Göreceli Kantifikasyon

qRT-PZR verilerinin analizi için öncelikle örneklerin grupları oluşturuldu. Doğal tip *Salmonella* 14028 suşu kontrol grubu, diğer iki suş (*S. Typhimurium* 14028/*ΔcsgD* ve *S. Typhimurium* MN1630) test grubu olarak belirlendi. Veri analizi için göreceli kantifikasyon olarak adlandırılan ve kontrol ve test grubunda bulunan hedef genin göreceli ifade miktarına (kat farkına, fold change) dayanan yöntem kullanıldı. Bu yöntem, hedef genin farklı gruplar arasındaki ifade düzeyindeki değişimine oranlanmasını esas alır. Hesaplamalar, eşik döngü değeri (Ct) farklılıklarının amplifikasyon verimi de göz önünde bulundurularak karşılaştırılmasına dayanır. qRT-PZR ile elde edilen veriler, biyolojik olarak anlamlı hale getirilmesi amacıyla normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi için, ekspresyon seviyelerinin tüm test gruplarında sabit olduğu kabul edilen 16S referans geni kullanıldı. Hedef genlerin ifade seviyeleri; referans gen olarak kullanılan 16S geninin her bir örnek grubundaki ifade seviyeleri ile oranlanarak normalize edildi.

4.3.4.2. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) Metodu

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodunu kullanmadan önce, hedef ve referans genin amplifikasyon verimliliklerini belirleyerek varsayımları doğrulamak esastır. Tüm genlerin % 100'e yakın amplifikasyon verimliliğine sahip olduğu belirlendikten sonra, normalize edilmiş örnek gruplarındaki genlerin ifade seviyelerinin kat farkının hesaplanması için aşağıda verilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanıldı (141).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{(Ct_X - Ct_R)_K - (Ct_X - Ct_R)_T}$$

Ct_X : Hedef genin ortalama Ct değeri

Ct_R : Referans genin ortalama Ct değeri

K: Kontrol grubu (doğal tip suş grubu)

T: Test grubu (mutant suş grupları)

4.4. *SALMONELLA*'DA *CsgD* REGÜLASYONUNUN AI-2 AKTİVİTESİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

4.4.1. SUŞLARDAN SÜPERNATANT ELDESİ

QS sinyalizasyon sürecinde rol alan otoindüktör molekülleri, hücreler tarafından dış ortama salgılanmaktadır. Deney kapsamında, *Salmonella* test suşlarının sentezlediği AI-2 moleküllerinin elde edilmesi amacıyla, bakteri hücrelerinden arındırılmış süpernatant örnekleri kullanıldı. Bu amaçla; *csgD* geni bakımından mutant ve doğal tip *Salmonella* suşları LB sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C'de çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) eksponansiyel fazın ortalarına kadar (OD₅₉₅ 0.3-0.5) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra test edilecek olan suşlardan 1.5 mL alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 60 dakika santrifüj uygulaması ile hücreler çöktürüldü. Hücrelerin tamamen uzaklaştırılması amacı ile süpernatant, 0.22 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril bir başka mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Suşlardan toplanan süpernatantlar otoindüktör aktivitesi analizine kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

4.4.2. SUŞLARIN AI-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Kontrol suş *V. harveyi* BB170, otoindüktör biyoanaliz besiyerine (AB Broth) % 1 oranında inoküle edilerek 175 rpm çalkalamalı koşullarda 30 °C'de 18 saat inkübe edildi. Ardından bir gecelik aktif *V. harveyi* BB170 kültürü steril AB besiyerinde 1:5000 oranında dilüe edildi ve 96 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plaklarına 90 µL hacimde dağıtıldı. Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşlarının otoindüktör aktivitesinin belirlenmesi için, bir önceki aşamada hazırlanan süpernatantlardan 10 µL alınarak *V. harveyi* BB170 suşunun üzerine aktarıldı. Kontrol kuyularına ise 10 µL AB Broth eklendi ve 30 °C'de 200 rpm'de 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her saat başı mikropilaka okuyucuda (Perkin-Elmer Victor V3) luminometrik ölçümler ile okumalar gerçekleştirildi. Suşların otoindüktör-2 aktiviteleri süpernatant içeren örnek kuyularından elde edilen okumaların yalnızca AB Broth eklenen kontrol kuyularından elde edilen okumalara oranlanması ile yüzde (%) kat değişimi olarak hesaplandı. Hesaplama için, aşağıda verilen denklemden yararlanıldı (142).

$$\text{Yüzde kat değişimi (\%)} = (\text{süpernatant kuyuları} / \text{kontrol kuyuları}) \times 100$$

5. İSTATİSTİKİ ANALİZLER

Tüm istatistiki analizler, GraphPad Prism (sürüm 9.2) Windows paketi kullanılarak gerçekleştirildi. Gen ifadesi ve AI-2 aktivitesi analizlerinde anlamlı farklılıkları değerlendirmek amacıyla Mann-Whitney testi kullanıldı ve $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

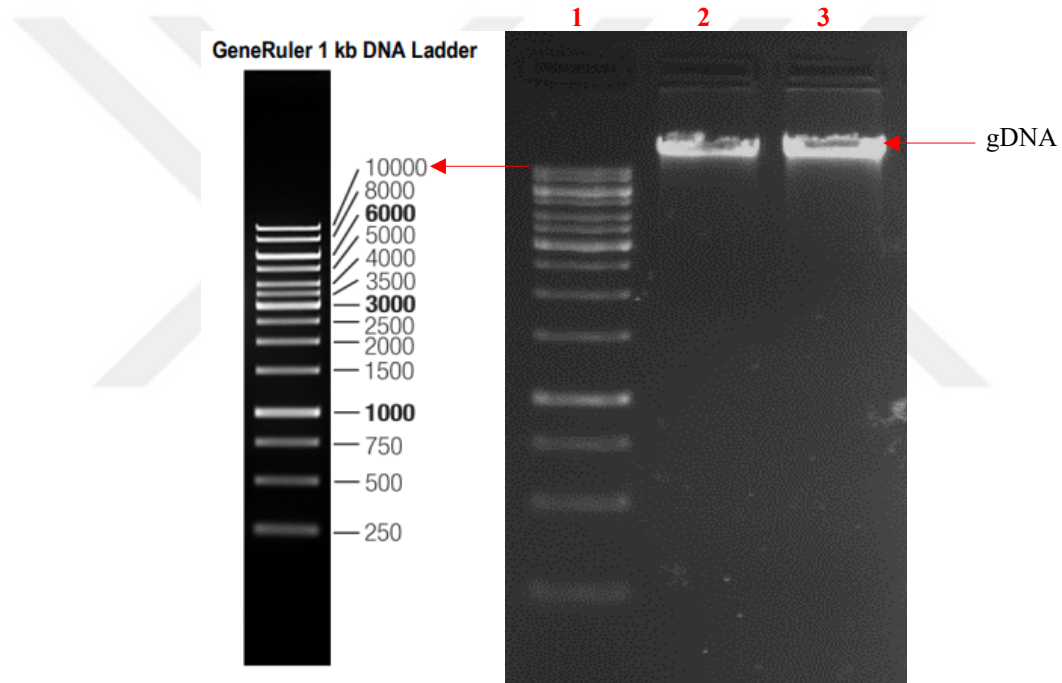


6. ARAŞTIRMA BULGULARI

6.1. *csgD* GENİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI

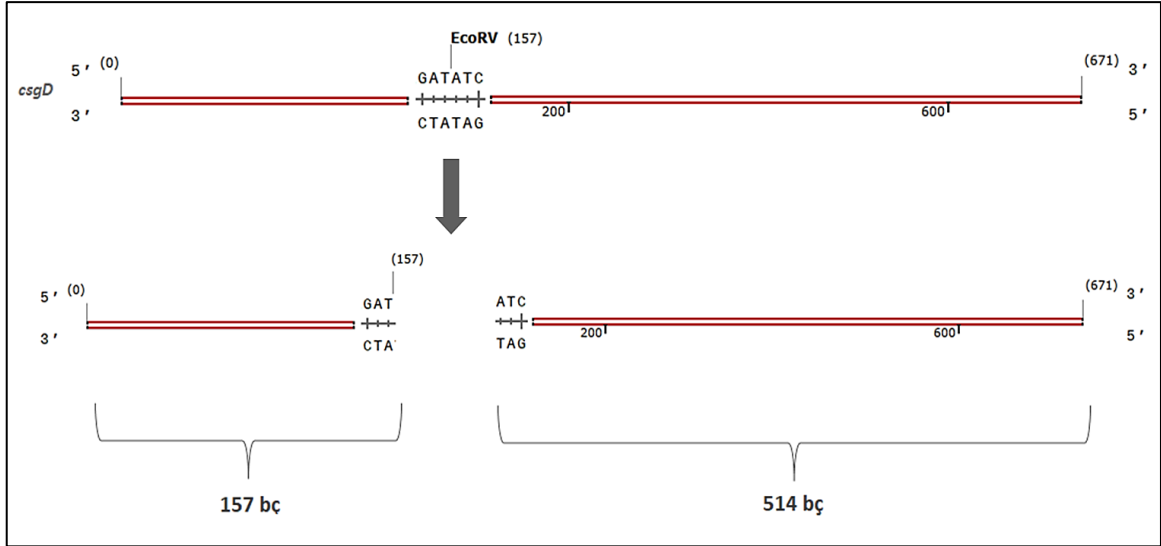
6.1.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU VE *csgD* GENİNİN AMPLİFİKASYONU

csgD geninin PZR ile çoğaltılması için ihtiyaç duyulan kalıp genomik DNA (gDNA), doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşundan izole edilerek % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda gDNA'nın çalışmalarda kullanılabilir saflıkta elde edildiği, UV ışık altında görüntülenerek kontrol edildi (Şekil 6.1.).



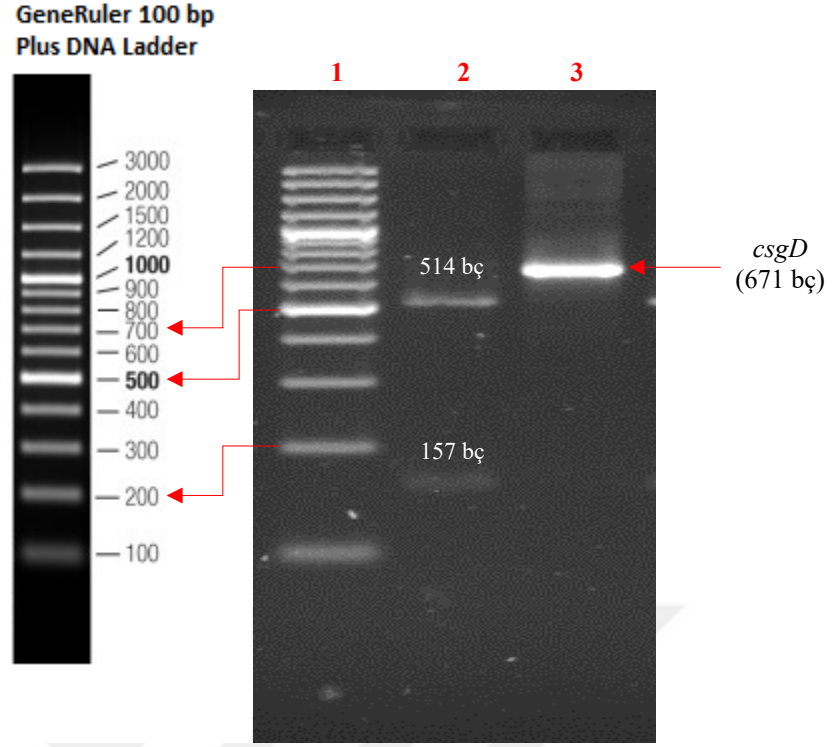
Şekil 6.1. *S. Typhimurium* 14028 genomik DNA'sının agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, #SM0311); kuyu 2-3, *S. Typhimurium* 14028 genomik DNA'sı (>10 kb) içermektedir.

S. Typhimurium 14028 suşundan izole edilen gDNA kullanılarak *csgD* geninin açık okuma çerçevesi PZR ile çoğaltıldı. *EcoRI* ve *PstI* RE enzim kesim bölgelerinin de dahil edildiği primerler ile 671 bç büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi. Elde edilen *csgD* PZR ürünü, saflaştırma sonrası, Şekil 6.2.'de gösterildiği üzere, oluşturacağı fragment büyüklüğü bilinen *EcoRV* RE enzimi ile tek bir bölgeden kesilerek doğrulandı.



Şekil 6.2. *csgD* PZR ürününün *EcoRV* enzimi ile kesilmesi sonucu meydana gelen DNA fragmentlerinin büyüklükleri. *EcoRV* enzimi, toplam uzunluğu 671 bç olan *csgD* PZR ürününü tek bir bölgeden keserek 514 bç ve 157 bç olmak üzere iki DNA fragmenti meydana getirir.

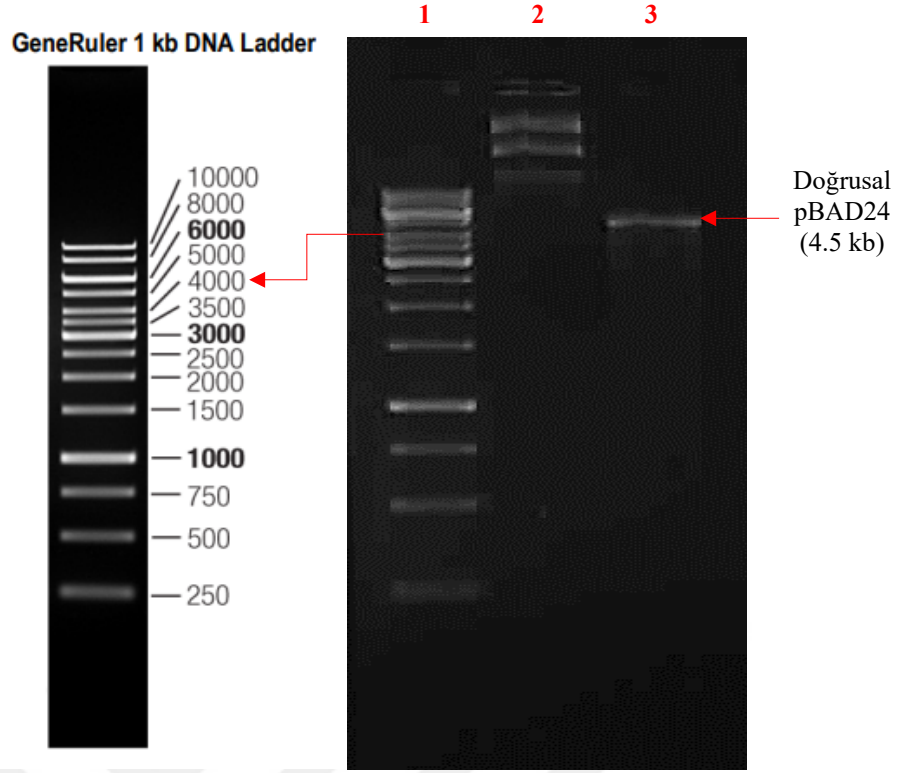
Elde edilen kesim ürünleri, agaroz jelde yürütüldükten sonra DNA fragmentlerinin büyüklükleri UV ışık altında 514 bç ve 157 bç olmak üzere gösterildi. Şekil 6.3.'de verilen agaroz jel görüntüsü, *EcoRV* enzimi ile tek bir bölgeden kesilen *csgD* PZR ürününün amplifikasyonunu doğrulamaktadır.



Şekil 6.3. *csgD* geni PZR ürününün agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Scientific #SM0321); kuyu 2, *csgD* geni PZR ürününün *EcoRV* RE enzim kesim ürünleri (514 ve 157 bç); kuyu 3, *csgD* geni PZR ürünü (671 bç).

6.1.2. PLAZMİD DNA İZOLASYONU

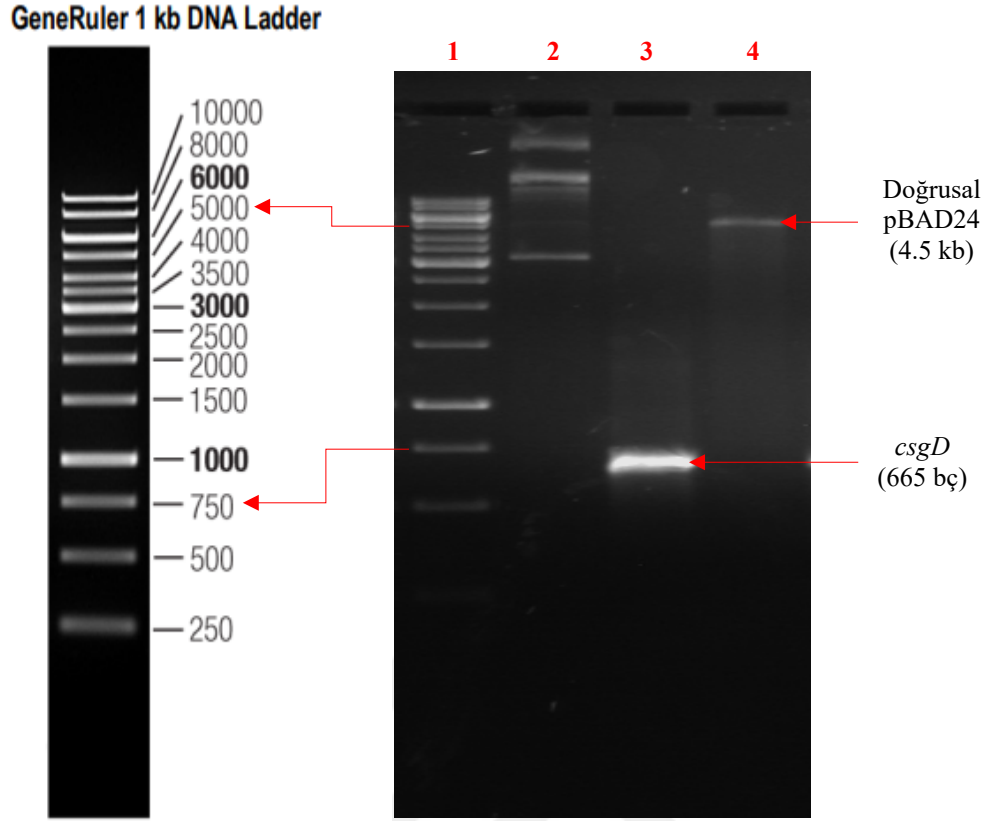
Gen klonlaması çalışmalarında kullanılması amacıyla, *S. Typhimurium* MZ1629 suşundan pBAD24 plazmidinin izolasyonu gerçekleştirildi. Moleküler büyüklüğü 4542 bç olan plazmid DNA'lar, tek bir bölgeden kestiği bilinen *EcoRV* RE enzimiyle kesilerek agaroz jelde doğrusal formda gösterildi (Şekil 6.4.).



Şekil 6.4. pBAD24 plazmidinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 1 kb DNA Ladder; kuyu 2, pBAD24 plazmidi; kuyu 3, pBAD24 plazmidinin doğrusal formunu (4.5 kb) içermektedir.

6.1.3. RE ENZİM KESİM REAKSİYONLARI

Dairesel formda bulunan saflaştırılmış saf pBAD24 vektörü ile saflaştırılmış *csuD* geni PZR ürünü yapışkan uç oluşturmaları için *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesime tabi tutuldu. pBAD24 vektörünün çoklu kesim bölgesinde yer alan *EcoRI* ve *PstI* enzim kesim bölgeleri arasındaki uzaklık yalnızca 42 bp olması nedeniyle kesim sonucu agaroz jelde 4.5 kb büyüklüğünde tek bir bant olarak lineer halde görüntülendi. İkili kesim sonrası *csuD* gen ürünü ise sadece uç bölgelerinde RE kesim dizisini içerdiğinden agaroz jelde yaklaşık 665 bp büyüklüğünde bir bant olarak görüntülendi (Şekil 6.5.).

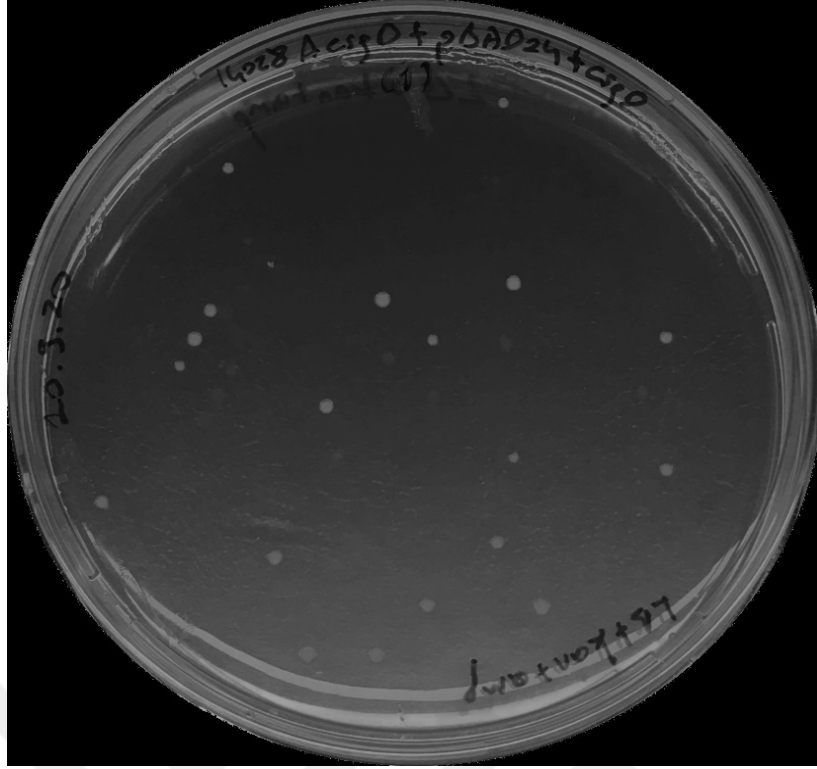


Şekil 6.5. pBAD24 plazmid vektörü ve *csgD* geninin ikili RE enzim kesimi agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 1 kb DNA Ladder; kuyu 2, pBAD24 plazmidi; kuyu 3, *csgD* geninin *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesim ürünü; kuyu 4, pBAD24 plazmidinin *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesim ürününü içermektedir.

6.2. *csgD* GENİNİ İFADE EDEN *S. TYPHIMURIUM* 14028 SUŞUN ELDESİ

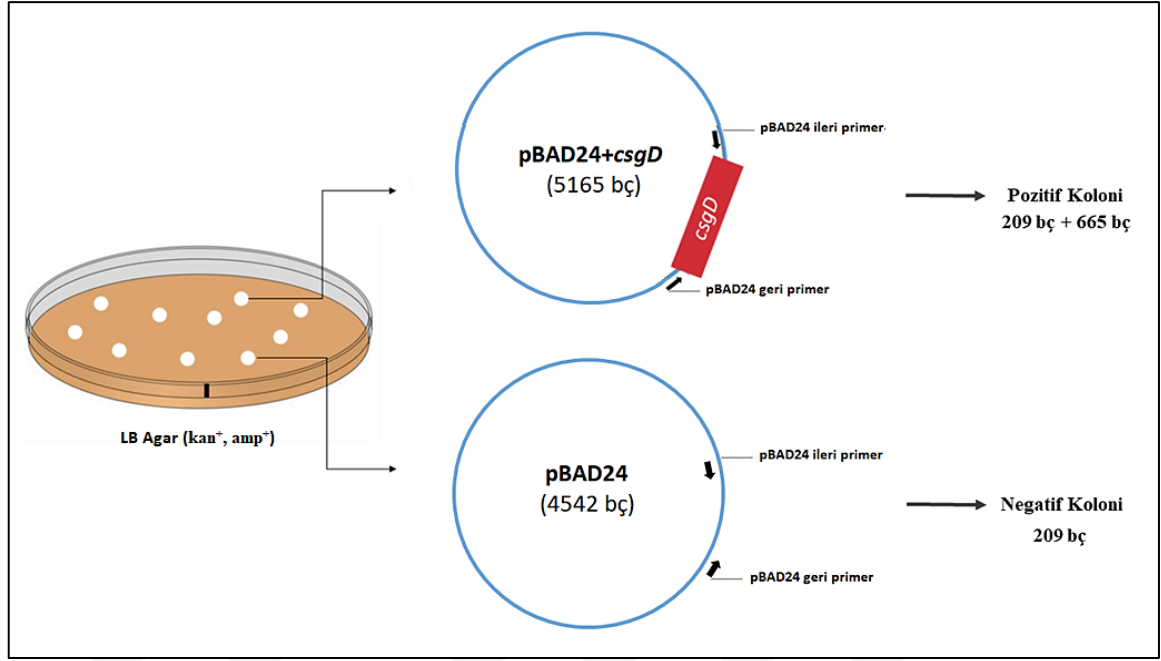
6.2.1. REKOMBİNANT PLAZMİDİN ELEKTROPORASYONU

Ligasyon reaksiyonu ile elde edilen rekombinant plazmid (pBAD24+*csgD*), elektrokompentan hale getirilen *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* hücrelerine elektroporasyon cihazı yardımıyla aktarıldı. Çalışmada kullanılan pBAD24 vektörü ampisilin, *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* suşu ise kanamisin dirençliliği taşıması nedeni ile seçici besiyeri olarak kanamisin (75 μ g/mL) ve ampisilin (100 μ g/mL) içeren LB agar kullanıldı. Seçici besiyeri yüzeyinde ürettiği gözlenen kolonilerden (Şekil 6.6.) rastgele seçim yapılarak koloni PZR gerçekleştirildi.



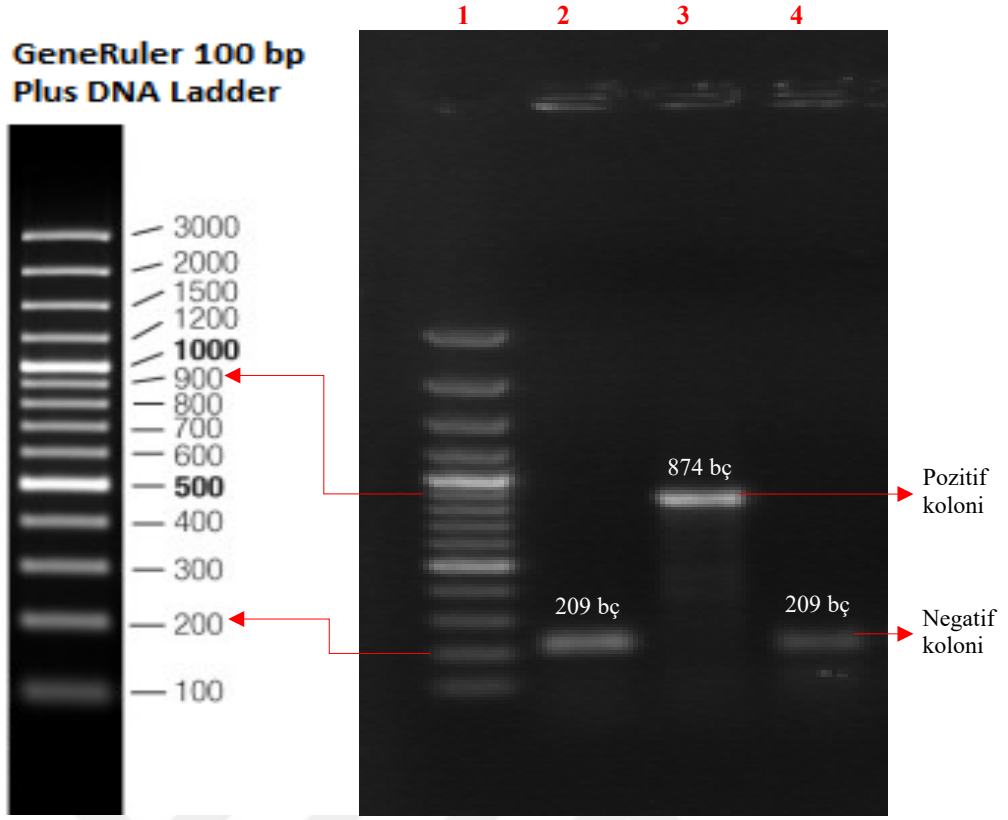
Şekil 6.6. *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* suşuna ligasyon ürünlerinin (*csgD* genini içeren pBAD24 vektörü) transformasyonu ile elde edilen kolonilerin seçici antibiyotik içeren LB agar ortamında gelişimi.

Gerçekleştirilen koloni PZR sonucu, 874 bç büyüklüğünde ürün elde edilen kolonilerin transformant hücreler olduğu belirlendi. pBAD24 plazmidine özgü primerler ile gerçekleştirilen PZR sonucu hedef geni içermeyen pBAD24 plazmidleri 209 bç ürün oluştururken, rekombinant plazmidlerde bu ürüne hedef genin (*csgD*) büyüklüğü (665 bç) dahil edildiğinden 874 bç büyüklüğünde ürün meydana getirmesi beklendi. Transformant kolonilerin vektör spesifik primerler kullanılarak seçiliminin yapıldığı bu işlemler Şekil 6.7.'de özetlenmiştir.



Şekil 6.7. Koloni PZR ile hedef geni içeren transformant kolonilerin belirlenmesi. pBAD24 vektörüne özgü primerlerle gerçekleştirilen koloni PZR sonucunda, *csgD* geninin insersiyonu gerçekleşmemiş olan pBAD24 vektörünü içeren negatif koloniler 209 bç büyüklüğünde ürün meydana getirir. *csgD* geninin insersiyonu gerçekleşmiş olan pozitif koloniler ise 665 bç büyüklüğünde olan *csgD* geninin amplifikasyonu ile birlikte 874 bç büyüklüğünde ürün meydana getirir.

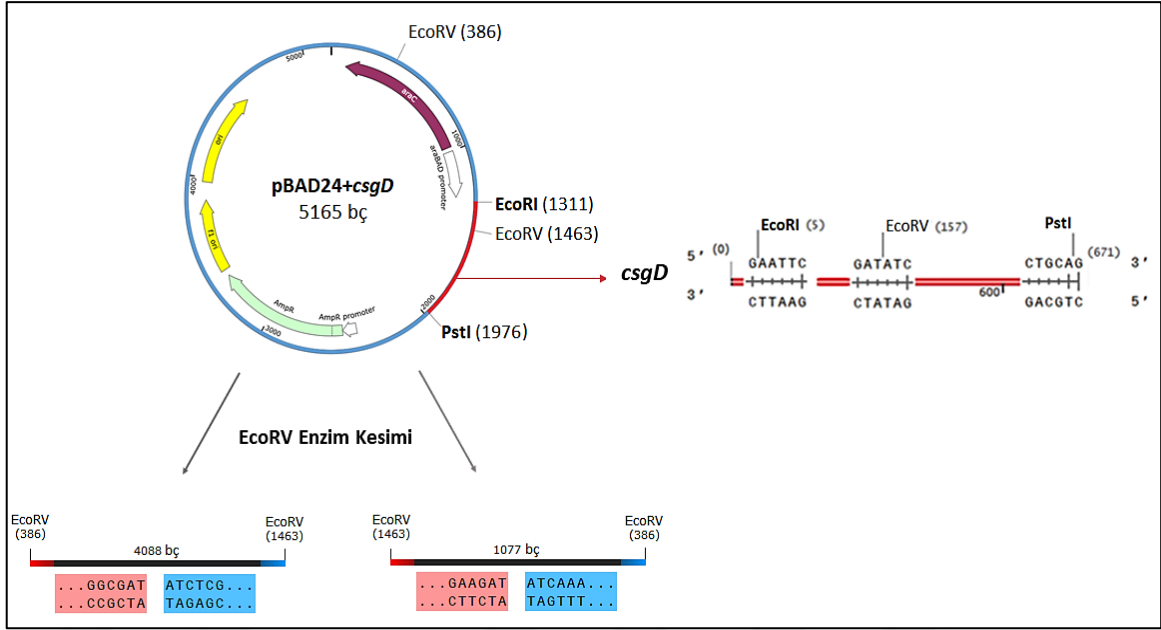
Koloni PZR ürünleri, büyüklüklerinin belirlenmesi amacı ile agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 6.8.). Rekombinant plazmidi (pBAD24+csgD) içeren transformant koloniler daha önce belirtildiği gibi 874 bç uzunluğunda ürün oluştururken sadece pBAD24 plazmidini içeren koloniler 209 bç büyüklüğünde PZR ürünü oluşturdu. Agaroz jel görüntüsü esas alınarak, pozitif olduğu belirlenen kolonilerin seçilimi gerçekleştirildi.



Şekil 6.8. Koloni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 100 bç Plus DNA Ladder; kuyu 2 ve 4, transformant olmayan kolonilerin PZR ürünleri; kuyu 3, transformant kolonilerin PZR ürünü.

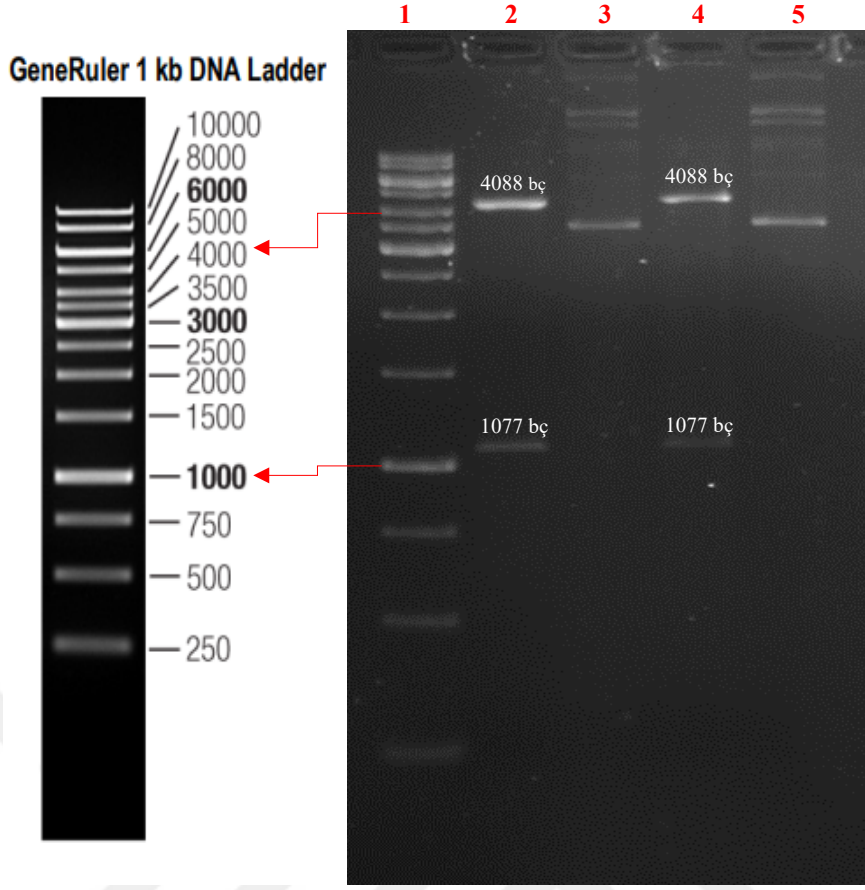
6.2.2. REKOMBİNANT PLAZMİDLERİN İZOLASYONU VE DOĞRULANMASI

Koloni PZR ile hedef geni içerdiği belirlenen transformant hücrelerden High Pure Plasmid Isolation (Roche, USA) kitinin protokolü izlenerek plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından hem pBAD24 plazmidinde hem de hedef gen dizisinde olmak üzere sadece iki bölgede kesim yaptığı bilinen *EcoRV* RE enzimi ile kesilerek rekombinant plazmidin (pBAD24+csgD) varlığı doğrulandı. pBAD24 plazmidi ve *csgD* gen dizisinde yer alan *EcoRV* enzim kesim bölgeleri ve kesim reaksiyonu sonucu oluşan DNA fragmentlerinin moleküler büyüklükleri Şekil 6.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 6.9. *csgD* PZR ürününün pBAD24 plazmidine insersiyonu ile elde edilen rekombinant plazmidin *EcoRV* enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan DNA fragmentleri. Kesim ürünlerinin görselleştirilmesi için SnapGene 5.3 (<https://www.snapgene.com>) hizmetinden yararlanıldı.

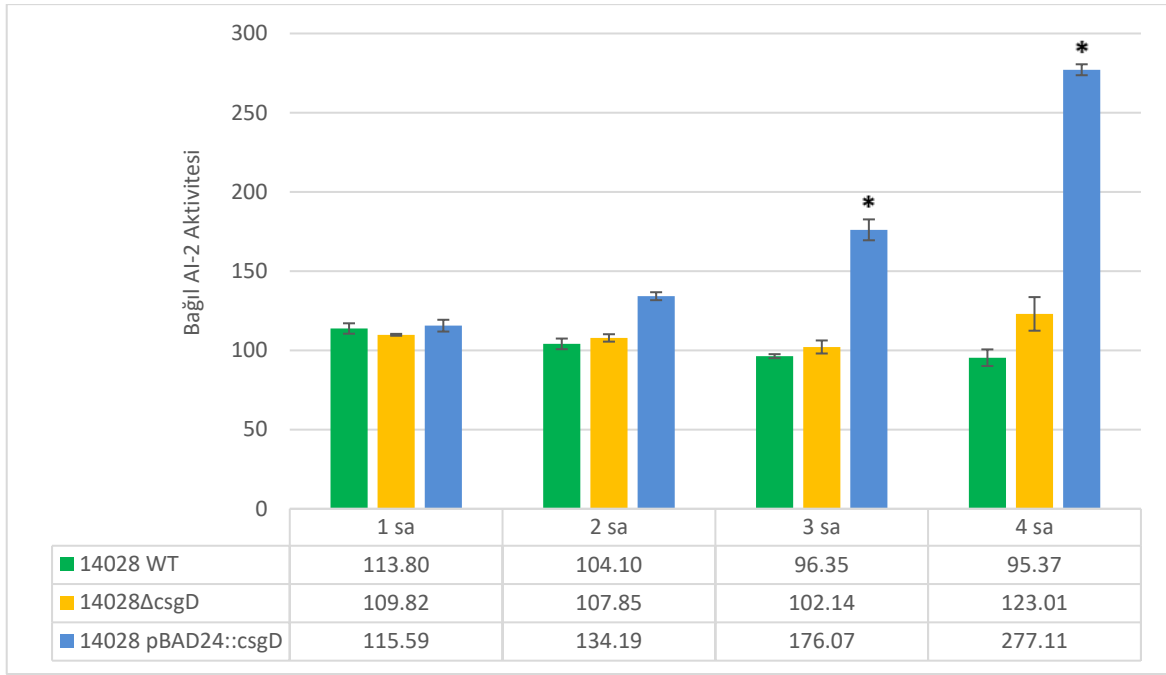
Moleküler büyüklüğü 5165 olan rekombinant plazmid (pBAD24+csgD), hem pBAD24 plazmidinde hem de hedef gen dizisinde kesim yaptığı bilinen *EcoRV* enzimi ile kesilerek 1077 bç ve 4088 bç kesim ürünleri elde edildi. Kesim ürünlerinin moleküler büyüklüğü agaroz jelde gösterildi (Şekil 6.10.). Rekombinant plazmidin *csgD* gen bölgesini içerdiği doğrulandıktan sonra transformantların (*S. Typhimurium* MN1630 suşu) çalışma ve stok kültürleri oluşturuldu.



Şekil 6.10. Seçilen kolonilerden izole edilen plazmid DNA'sı ve *EcoRV* enzim kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 1 kb DNA Ladder; kuyu 2 ve 4, rekombinant plazmid DNA'nın (pBAD24+*csgD*) *EcoRV* enzim kesim ürünleri; kuyu 3 ve 5, rekombinant plazmid DNA.

6.3. *SALMONELLA* SUŞLARININ AI-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

csgD geni bakımından mutant ve doğal tip *Salmonella* suşlarının bağlı AI-2 aktivitesi, 4 saat süre ile luminometrik olarak ölçüldü. Kontrol suşu olan *V. harveyi* BB170 varlığında tüm suşlardan elde edilen süpernatantların içerdiği AI-2 miktarı, yüzde (%) kat değişimi olarak hesaplandı ve Şekil 6.11.'de verilen sütun grafiği halinde görselleştirildi. Hesaplamalar, süpernatant içeren örnek kuyularından elde edilen okumaların AB Broth eklenen kontrol kuyularından elde edilen okumalara oranlanması ile elde edilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism (sürüm 9.2) Windows paketi kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları hesaplamak için Mann-Whitney testi kullanıldı ve $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

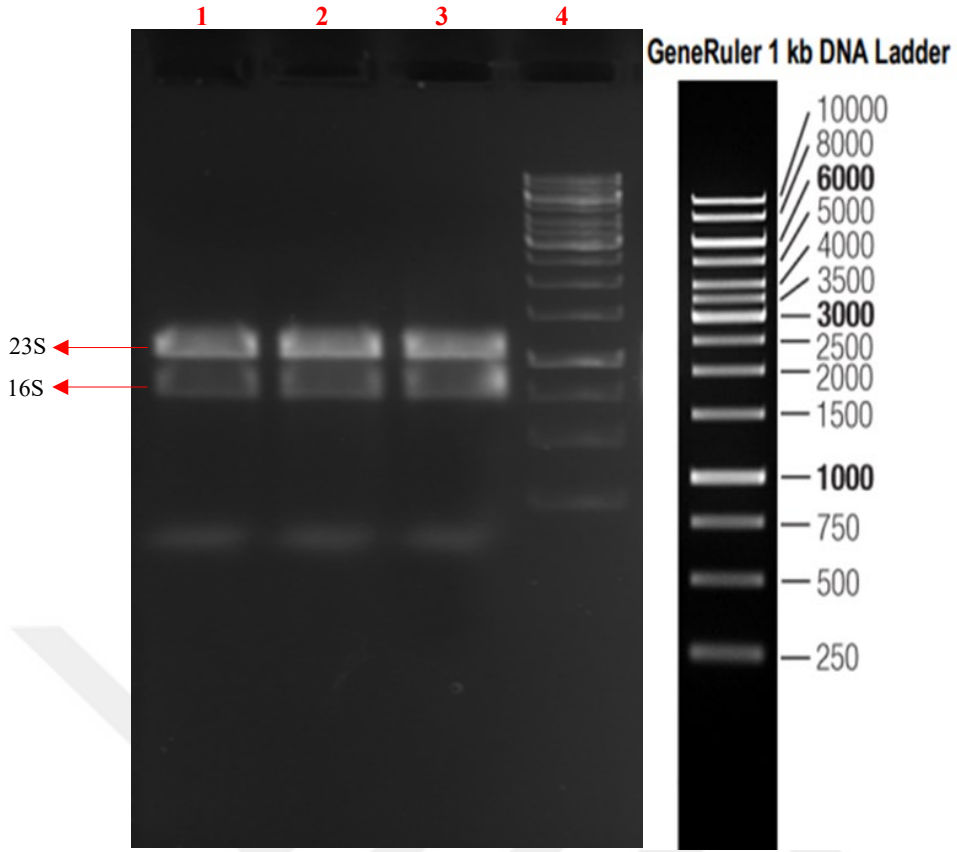


Şekil 6.11. *Salmonella* suşlarının 4 saatlik bağıl AI-2 aktivitesi. Luminometrik ölçümler, *V. harveyi* BB170 raportör suşun 4 saat (sa) inkübasyonu ile farklı zaman noktalarında (1, 2, 3 ve 4 sa) elde edilmiştir. Hata çubukları, üç bağımsız tekrara dayalı standart sapmaları göstermektedir ve * sembolü, $p \leq 0.05$, anlamlı fark derecesini temsil etmektedir.

Doğal tip (WT) *S. Typhimurium* 14028 suşu, 4 saat süre boyunca büyük ölçüde sabit bir AI-2 aktivitesi gösterdi. Doğal tip suş ile karşılaştırıldığında, *csgD* geninin aşırı eksprese edildiği suşta (MN1630), AI-2 aktivitesinin önemli ölçüde ($p \leq 0.05$) arttığı görüldü. Şekil 6.11., bu artışın özellikle 3 saatten sonra hızlandığını göstermektedir. Ancak *csgD* geni bakımından mutant suşun (14028Δ*csgD*), AI-2 aktivitesinde önemli ölçüde bir artış veya düşüş görülmedi.

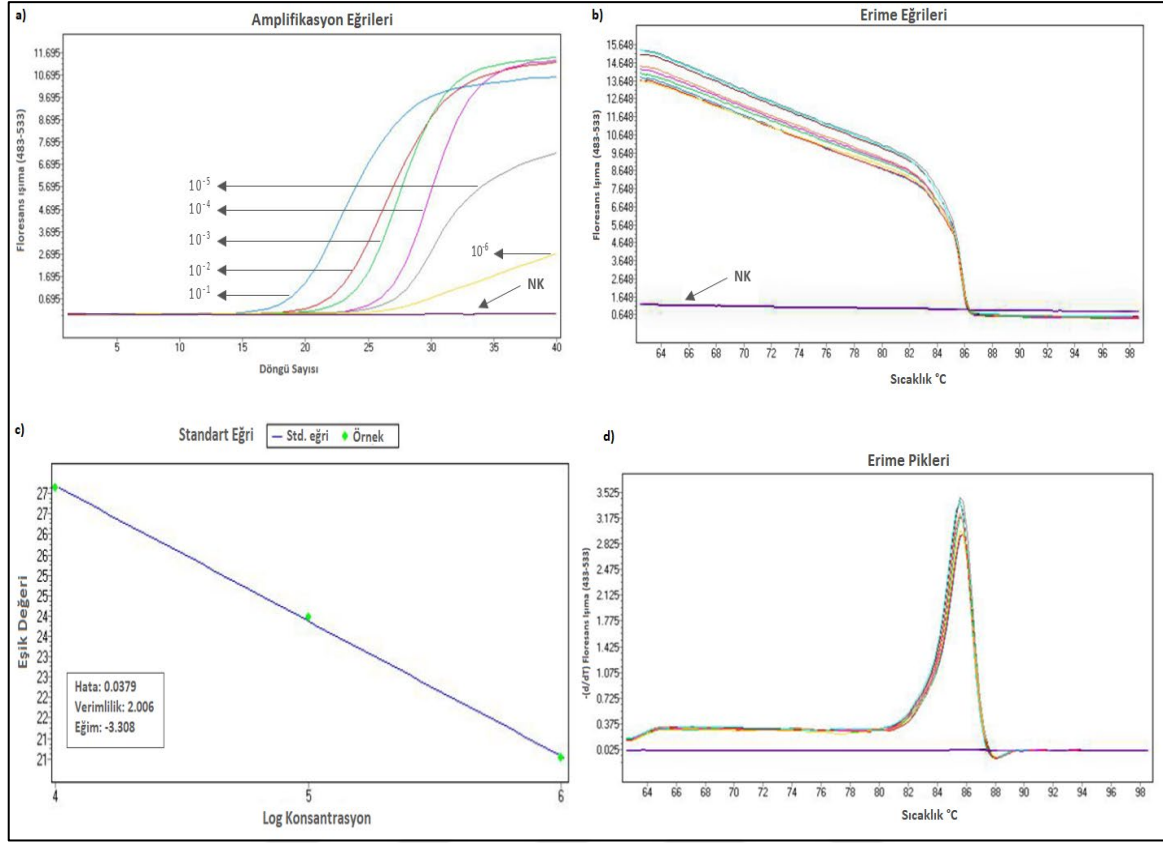
6.4. CsgD REGÜLASYONUNA BAĞLI OLARAK QS İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Doğal tip 14028, 14028Δ*csgD* ve MN1630 *Salmonella* suşlarında araştırılan *csrB*, *csrC*, *micA*, *ryeE* sRNA'ların ve AI-2 moleküllerinin hücre içine alımında görevli *lsrA*, *lsrK*, *lsrR* genlerinin ifadelerindeki farklılığı belirleyebilmek amacıyla yapılan qRT-PZR denemeleri için ilk aşamada tüm suşlardan toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve saflıkları agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 6.12.). Ardından, izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi ve qRT-PZR denemelerinde kullanıldı.



Şekil 6.12. *Salmonella* suşlarından izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1, 1 kb DNA Ladder; kuyu 2, *S. Typhimurium* 14028 toplam RNA; kuyu 3, *S. Typhimurium* 14028 Δ *csgD* toplam RNA; kuyu 4, MN1630 toplam RNA.

qRT-PZR sonuçlarının analizinde kullanılan kantifikasyon için, primerlerin amplifikasyon verimlilikleri belirlendi. Doğal tip suşun cDNA'sının seri dilüsyonları ile her primer çiftinin Ct değerleri kalibratör olarak kullanıldı ve amplifikasyon verimlilikleri (Çizelge 6.1.) belirlendi. Şekil 6.13.'de oluşturulan reaksiyonun amplifikasyon eğrileri, standart eğrisi, erime eğrileri ve erime pikleri gösterilmiştir.



Şekil 6.13. qRT-PZR denemelerinde gerçekleştirilen standardizasyon işleminin sonuçları. a) amplifikasyon eğrileri, b) erime eğrileri, c) standart eğri, d) erime pikleri. NK, negatif kontrol.

Çizelge 6.1. qRT-PZR denemelerinde kullanılan primer çiftlerinin amplifikasyon verimlilikleri

Gen Adı	Verimlilik (E)	Verimlilik Yüzdesi (%)
<i>csgD</i>	2.042	104.2
<i>csrB</i>	2.192	115.3
<i>csrC</i>	2.153	119.2
<i>micA</i>	2.006	100.5
<i>ryeE</i>	2.007	100.7
<i>lsrA</i>	2.094	109.4
<i>lsrK</i>	1.954	95.3
<i>lsrR</i>	2.206	120.6
<i>16S</i>	2.128	112.8

Amplifikasyon verimliliğinin belirlenmesinin ardından Livak metodu kullanılarak doğal tip ve mutant *Salmonella* suşlarında araştırılan sRNA'ların ifade seviyelerinin kat farkı hesaplandı (Çizelge 6.2.).

Çizelge 6.2. *Salmonella* suşlarında araştırılan sRNA'ların ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı

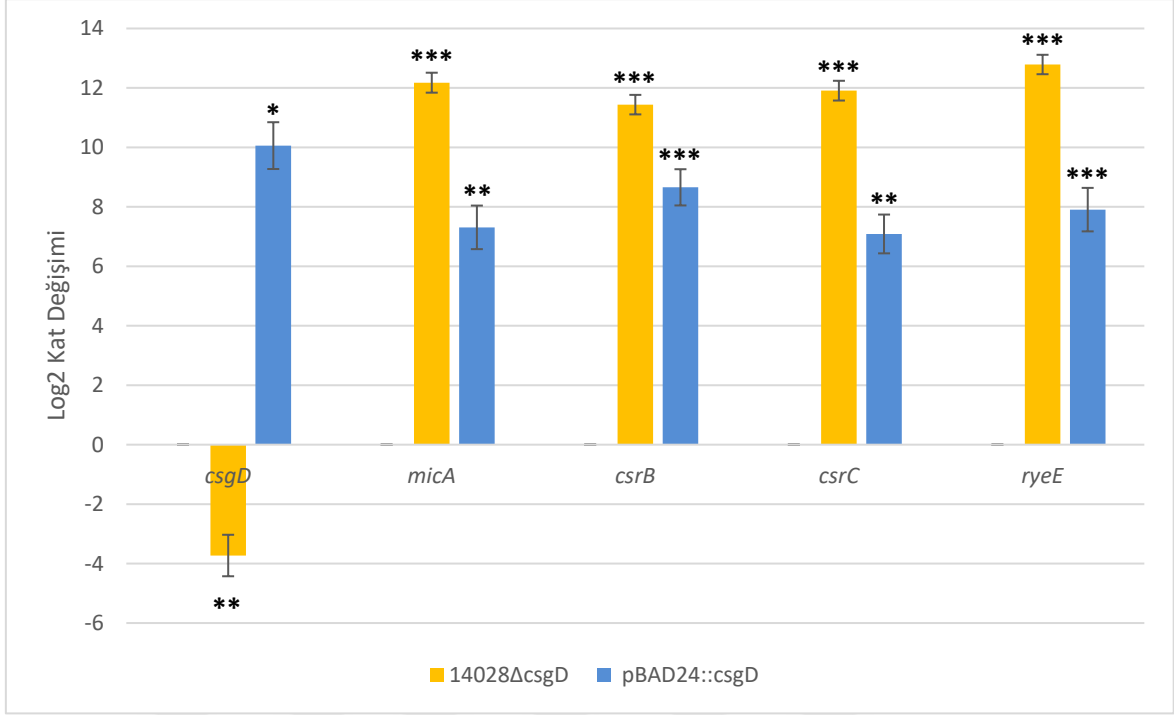
	<i>csgD</i>	<i>micA</i>	<i>csrB</i>	<i>csrC</i>	<i>ryeE</i>
WT 14028	0,075	1	1	1	1
14028Δ<i>csgD</i>	1	4629,583	2775,118	3843,842	7074,112
pBAD24::<i>csgD</i>	1067,485	158,683	403,568	136,082	239,963

Test grupları arasında yukarı veya aşağı regüle edilen genleri belirlemek amacıyla normalize edilmiş kat farkı verileri kullanılarak logaritma 2 (log2) tabanına göre kat değişimleri belirlenmiştir (Çizelge 6.3.).

Çizelge 6.3. *Salmonella* suşlarında araştırılan sRNA'ların normalize edilmiş gen ifade seviyelerinin log2 tabanındaki değerleri

	<i>csgD</i>	<i>micA</i>	<i>csrB</i>	<i>csrC</i>	<i>ryeE</i>
WT 14028	0	0	0	0	0
14028Δ<i>csgD</i>	-3,728	12,177	11,438	11,908	12,788
pBAD24::<i>csgD</i>	10,060	7,310	8,657	7,088	7,907

Çizelge 6.2. ve Çizelge 6.3.'de belirtilen suşlar sırası ile WT 14028, doğal tip *S. Typhimurium*; 14028Δ*csgD*, *csgD* geni bakımından mutant *S. Typhimurium*; pBAD24::*csgD*, *csgD* genini aşırı eksprese eden pBAD24 plazmidini içeren *S. Typhimurium* MN1630 kodlu suşu temsil etmektedir. Gen ifadelerindeki kat değişimi, doğal tip suşa kıyasla belirlenmiş olup Şekil 6.14.'de grafiksel olarak gösterilmiştir.



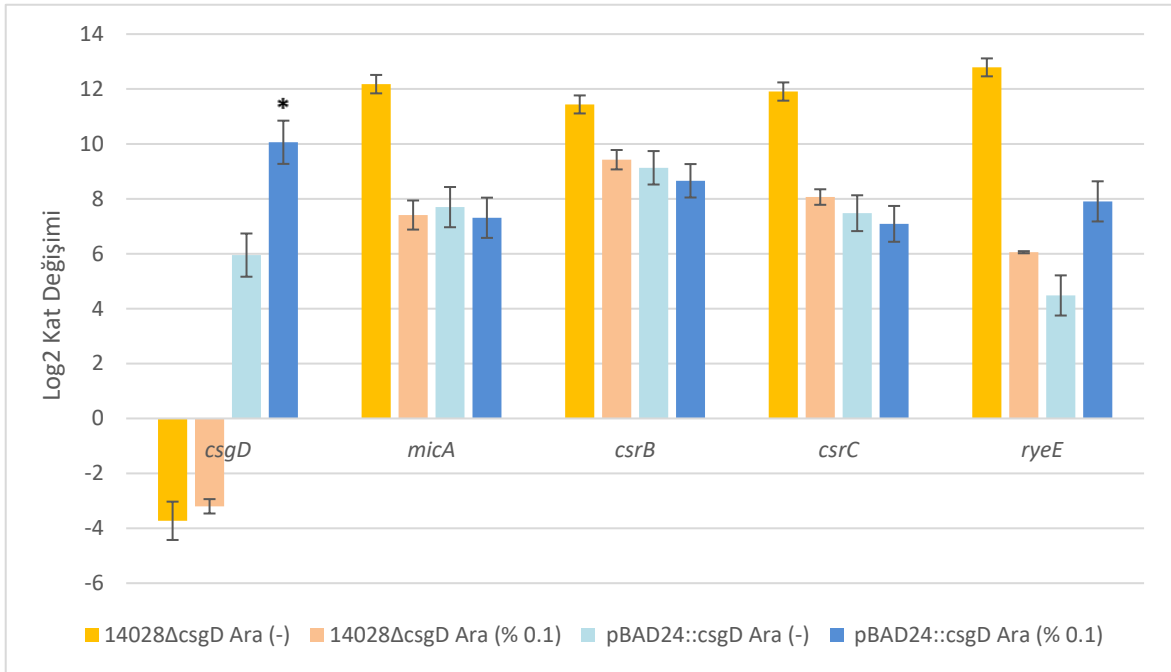
Şekil 6.14. *Salmonella* suşlarında araştırılan genlerin doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. Önemli ölçüde farklı olan $\Delta\Delta Ct$ değerlerini belirtmek üzere * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$ sembolleri kullanılmıştır.

Doğal tip suşa kıyasla, *csgD* genini aşırı ifade eden *Salmonella* suşunda *csgD* ifadesinin önemli ölçüde (* $p\leq 0.05$) artışının sağlandığı Şekil 6.14.'de gösterilmiştir. *csgD* geninin aşırı ifade edilmesi, QS ilişkili sRNA genlerinin (*micA*, *csrB*, *csrC* ve *ryeE*) istatistiki olarak anlamlı seviyelerde artışına neden olmuştur. Benzer bir şekilde, *csgD* geni yokluğunda, sRNA genlerinin ifade düzeylerinin önemli derecede ($p\leq 0.001$) artış gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlar, *Salmonella*'da *csgD*'nin aşırı veya düşük ekspresyonunun araştırılan QS ilişkili sRNA'ların ifade seviyelerinin pozitif yönde regülasyonunu sağladığına işaret etmektedir.

MN1630 suşunda *csgD* ifadesi, BAD promotorunu en yüksek düzeyde teşvik ettiğini belirlediğimiz % 0.1 oranında L-arabinoz lavesi ile indüklenmiştir. Arabinoz konsantrasyonunun test gruplarında araştırılan sRNA'lar ve *csgD* ifadesi üzerindeki etkisi belirlenmiş olup normalize edilmiş kat farkı verileri kullanılarak log2 tabanına göre kat değişimleri hesaplanmıştır (Çizelge 6.4.). Gen ifadelerindeki kat değişimi Şekil 6.15.'de grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 6.4. Arabinoz konsantrasyonuna bağlı olarak test gruplarında araştırılan sRNA'lar ve *csgD* ifade seviyelerinin log2 kat değişimleri.

	<i>csgD</i>	<i>micA</i>	<i>csrB</i>	<i>csrC</i>	<i>ryeE</i>
14028Δ<i>csgD</i> Ara (-)	-3,728	12,177	11,438	11,908	12,788
14028Δ<i>csgD</i> Ara (% 0.1)	-3,200	7,410	9,425	8,065	6,055
pBAD24::<i>csgD</i> Ara (-)	5,950	7,698	9,130	7,477	4,480
pBAD24::<i>csgD</i> Ara (% 0.1)	10,060	7,310	8,657	7,088	7,907



Şekil 6.15. Arabinoz varlığında ve yokluğunda *Salmonella* suşlarında araştırılan genlerin log2 kat değişim grafiği. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. Test grupları arasında önemli ölçüde farklı olan $\Delta\Delta Ct$ değerlerini belirtmek üzere * $p \leq 0.05$ sembolü kullanılmıştır.

Arabinoz konsantrasyonuna bağlı olarak yalnızca % 0.1 arabinoz ile indüklenen pBAD24::*csgD* suşunda, *csgD*'nin ifadesi istatistiki olarak anlamlı seviyede artmıştır. Araştırılan diğer genlerin ifade seviyeleri, arabinoz konsantrasyonundan önemli derecede etkilenmemiştir. Tüm bu veriler, arabinoz konsantrasyonunun yalnızca *csgD* ifadesi üzerinde etkili olduğunu kanıtlamaktadır.

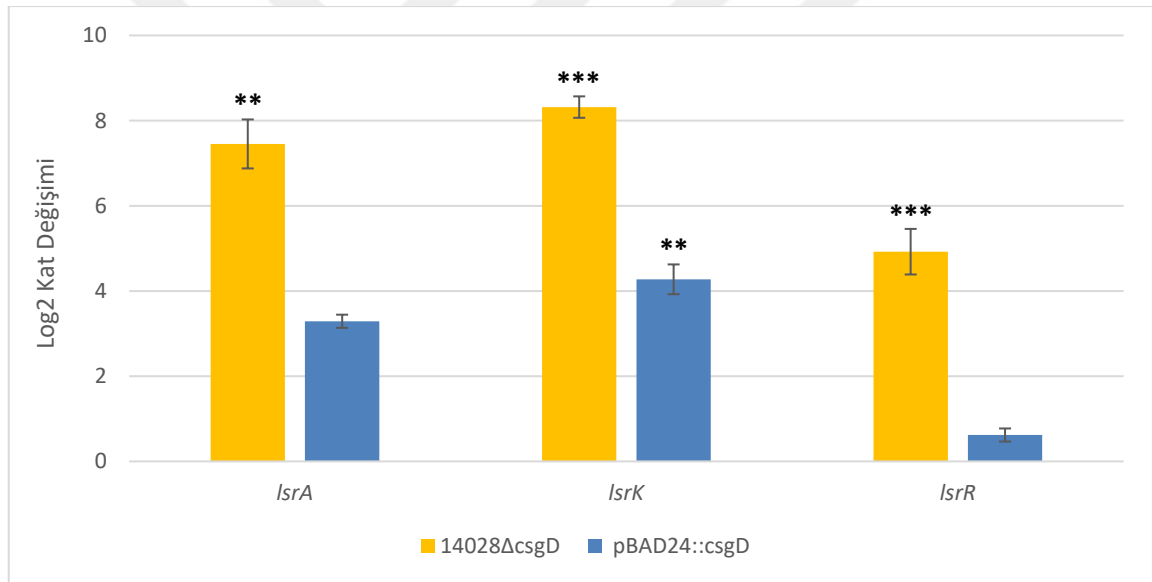
csgD gen ifadesinin QS ilişkili sRNA'ların ekspresyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesinin ardından QS sinyalizasyonunu sağlayan AI-2 moleküllerinin hücre içine alımında görevli

lsrA, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. Test grupları arasında yukarı veya aşağı regüle edilen genleri belirlemek amacıyla normalize edilmiş kat farkı verileri kullanılarak log2 tabanına göre kat değişimleri belirlenmiştir (Çizelge 6.5.).

Çizelge 6.5. *Salmonella* suşlarında araştırılan AI-2 moleküllerinin hücre içine alımında görevli genlerin normalize edilmiş ifade seviyelerinin log2 tabanındaki değerleri

	<i>lsrA</i>	<i>lsrK</i>	<i>lsrR</i>
WT 14028	0	0	0
14028Δ<i>csgD</i>	7,453	8,318	4,923
pBAD24::<i>csgD</i>	3,290	4,275	0,620

Gen ifadelerindeki kat değişimi, doğal tip suşa kıyasla belirlenmiş olup Şekil 6.16.'da grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 6.16. *Salmonella* suşlarında araştırılan Lsr taşıma sisteminde görevli genlerin ifade düzeylerinin doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. Önemli ölçüde farklı olan $\Delta\Delta$ Ct değerlerini belirtmek üzere ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ sembolleri kullanılmıştır.

Doğal tip suşa kıyasla, *csgD* geninin aşırı ifade edilmesi, AI-2 moleküllerinin hücre içine alımında görevli genlerden yalnızca *lsrK* ifadesi üzerinde istatistiki olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. *csgD* geni yokluğunda ise, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* gen ifade seviyelerinin tamamında önemli derecede artış belirlenmiştir.

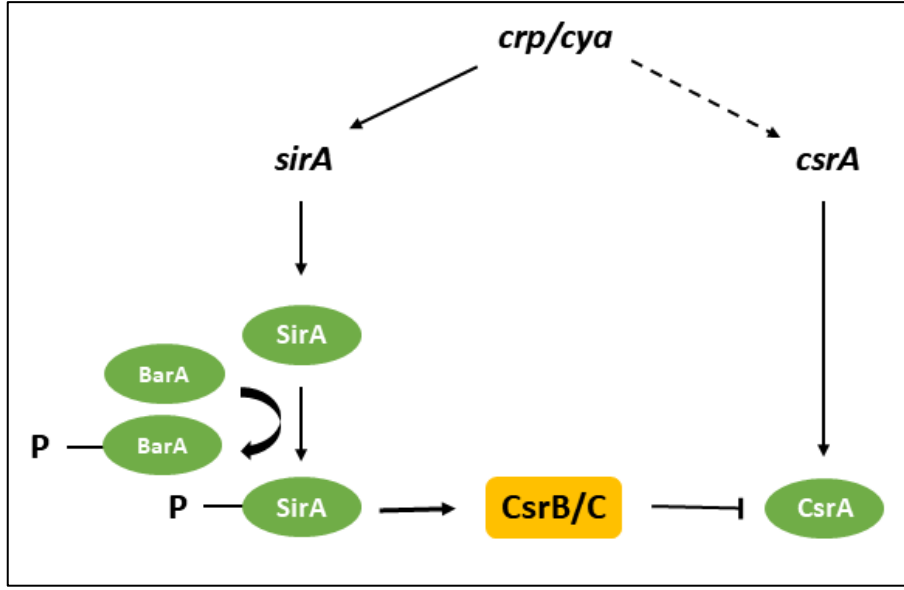
7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakteriler, değişen çevresel koşullara hızlı tepki verme ve uyum sağlama amacıyla belirli gen gruplarının ifadesini koordine etme yeteneğine ihtiyaç duyarlar (139). Gen ifadesinin kontrolü, transkripsiyon faktörlerinin ve düzenleyici RNA'ların etkileşimini içeren çok katmanlı bir süreçtir. Özellikle hücrelerin hızlı bir tepki vermesi gerektiğinde, bu süreç transkripsiyon sonrası düzenleyici moleküller olan sRNA'lar katılır. Başlangıçta ağırlıklı olarak stres tepkilerini koordine etmeyle ilişkilendirilen sRNA'ların, bakterilerde gelişimsel süreçlerin yanı sıra, çok hücreli davranışın kontrolünde de anahtar unsurlar olarak yer aldığı bilinmektedir (143).

sRNA'ların dahil olduğu riboregülasyon üzerindeki ilk araştırmalarda, model organizma olarak patojenik olmayan *E. coli* suşları kullanılmıştır. *E. coli*'de tanımlanan aday genlerin, genom çapında korunmasının incelendiği çalışmalar ise, *Salmonella*'daki sRNA'ların büyük bölümünün tanımlanmasını beraberinde getirmiştir. Genellikle sRNA'ların korunması durumu, sadece genomik konumu ile değil, aynı zamanda hem *Salmonella* hem de *E. coli*'de paralel olarak yürütülen birkaç çalışmanın gösterdiği üzere, fizyolojik işlevleri ile de bağlantılıdır (115,144,145). *E. coli*'den sonra Gram-negatif bakterilerde sRNA aracılı düzenlemenin en iyi karakterize edilmiş modeli, *Salmonella*'dır. *S. Typhimurium*, transkripsiyon faktörleri ve sRNA'lar aracılığıyla karmaşık çevresel sinyallerin entegrasyonunu kolaylaştırarak transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunun koordinasyonunu sağlar (146). sRNA'ların *Salmonella*'da QS düzenlemesindeki rolü hala bilinmemekle birlikte, diğer bakteri gruplarında yapılan çalışmalar, bu transkripsiyon sonrası mekanizmanın önemi hakkında bize fikir vermektedir (19). Örneğin, daha önce de bahsedildiği üzere, Hfq şaperonu ve çok sayıda sRNA'nın *V. cholerae*'da QS sistemini kontrol ettiği bilinmektedir. Hfq, sRNA'lar ile QS sisteminin ana düzenleyicisi olan *hapR* mRNA'sı arasındaki etkileşimlere aracılık eden şaperon görevi üstlenmektedir (26,147). *V. cholerae*'da, QS sinyal iletim yolunu düzenleyen dört sRNA (Qrr1-4) vardır ve bunların ekspresyonu, hücre popülasyonunun yoğunluğu ile sıkı bir ilişki içerisindedir (148). *V. harveyi*'de ise, QS sisteminin ana düzenleyicisi olan *luxR* mRNA'sını etkileyen beş sRNA (Qrr1-5) bulunur ve bunların *V. cholerae*'daki sRNA'lara benzer bir etki gösterdikleri bilinmektedir (26,149). Ayrıca Lenz ve ark. (2005), *V. cholerae*'nin QS sisteminde sRNA'ların ek bir düzenleyici olarak görev aldığını saptamıştır. *V. cholerae*'nin

VarS/VarA sensör sisteminin (*S. Typhimurium*'da BarA/SirA olarak adlandırılmaktadır) QS sinyal iletim yolunu, CsrA ve CsrA'yı inhibe eden üç sRNA aracılığıyla dolaylı olarak düzenlediği kanıtlanmıştır. Bu üç sRNA, *E. coli*'nin CsrB/C adlı sRNA'larına benzemekte olup CsrB/C/D olarak adlandırılmıştır. VarS/VarA-CsrA/CsrBCD sistemi, QS sistemi ile Qrr sRNA'ların ifadesini ve dolayısıyla tüm QS regülönunu düzenlemek için birlikte hareket etmektedir (135).

Bahsedilen çalışmalar *Salmonella*'yı değerlendirmemiş olsa da, QS düzenlenmesinde sRNA'ların oynadığı rollere dair bize ipuçları vermektedir. Karşılaştırmalı dizi analizlerine göre, *V. cholerae*'da bulunan *csrB* dizisinin bağlanma bölgesi, *E. coli* ve *S. Typhimurium*'da bulunan *csrB*'nin yukarı akışındaki (upstream) sekansla yalnızca bir baz farklılık göstermektedir (135). *Salmonella*'da *csrB* ve *csrC*'nin transkripsiyonu, BarA/SirA sistemi tarafından kontrol edilir. Fosforile SirA, transkripsiyonel seviyede *csrB/C*'yi aktive eder. Artan *csrB/C* seviyesi, CsrA proteininin aktivitesini inhibe eder. CsrA aktivitesinin azalması, FlhDC ve HilA proteinleri gibi biyofilm oluşumunu olumsuz etkileyen faktörlerin ifadelerinde azalmaya neden olarak, biyofilm oluşumunu destekler (74,150). Max ve ark. (2006), *Salmonella*'da *sirA*'nın düzenlenmesini etkileyen genleri belirlemek için bir transpozon mutagenesis stratejisi kullanmışlardır. *cya* veya *crp*'nin *sirA*'yı düzenlediği hipotezini test etmek için *cya* ve *crp* mutasyonlarını içeren *Salmonella* suşlarında, *sirA-lacZY* translasyonel füzyon ifadesinin X-gal içeren agar plakları üzerinde önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, *sirA* geninin, *crp* ve *cya* tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (151) (Şekil 7.1.).



Şekil 7.1. *Salmonella*'da *crp/cya* tarafından aktive edilen *sirA*'nın düzenleyici rolü. cAMP, *sirA* ve *csrA*'nın ifadesini *crp*'ye bağımlı bir şekilde kontrol eder. *crp*, *csrA* ekspresyonunu artırır. *csrB* ve *csrC*, CsrA proteininin aktivitesini inhibe eder. Oklar ve düz başlı oklar sırasıyla pozitif ve negatif etkileşimleri temsil eder. Kesikli oklar ise, etkileşimin doğrudan veya dolaylı olabileceğini gösterir (151).

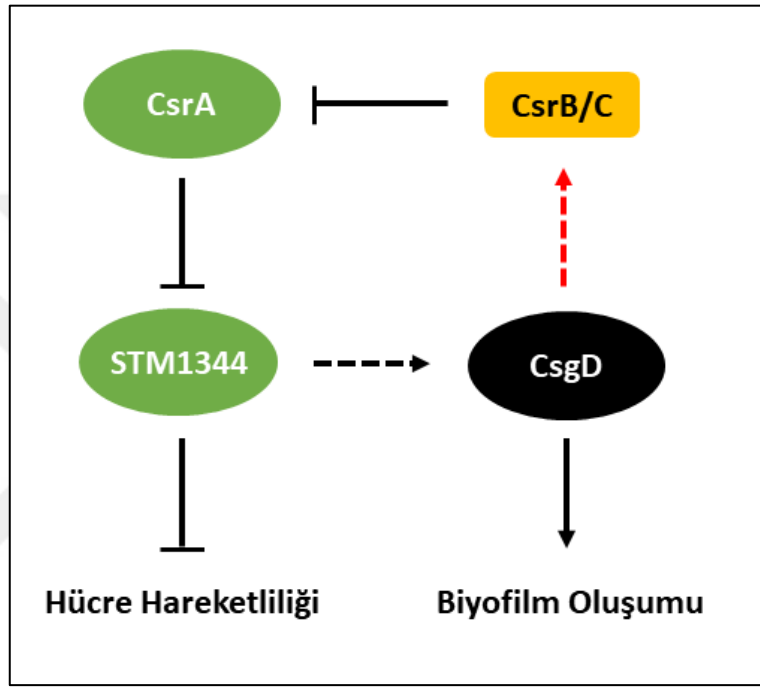
Ayrıca *Salmonella*'da *csrC* ifadesi, üreme koşullarına bağlı olarak CRP-cAMP tarafından düzenlenir. Bu düzenleme, durağan ve logaritmik büyüme fazında farklı sonuçlar doğurur. *csrC*, logaritmik fazda, SirA'dan bağımsız bir yolda baskılanırken, durağan fazda indüklenir (152). CRP, adenilat siklaz CyaA tarafından sentezlenen hücre içi cAMP'nin bağlanması ile metabolik bir sensör görevi gören global bir transkripsiyonel regülatördür. CRP-cAMP, DNA'ya bağlanmak ve RNA polimeraz ile etkileşime girmek suretiyle, genellikle transkripsiyonel aktivatör işlev görmektedir (153). cAMP'nin biyofilm oluşumundaki rolü kapsamlı bir şekilde çalışılmamıştır. Çalışılan tüm mikroorganizmalar için geçerli olmasa da, mevcut veriler biyofilm modülasyonunda genel olarak olumsuz bir rol oynadığına işaret etmektedir. CRP-cAMP'nin, *S. Typhimurium*'da da *csgD*'nin transkripsiyonunu baskıladığı ve biyofilm oluşumunu engellediği bilinmektedir (154). CRP-cAMP'nin aracılık ettiği biyofilm oluşumunun altında yatan mekanizmalar birkaç bakteride iyi araştırılmış olmasına rağmen, c-di-GMP'nin düzenleyici yolları ile karşılaştırıldığında hala yeterince anlaşılmamıştır. Zira, biyofilmlerin üç boyutlu yapısını modüle etmek için *Salmonella*'daki cAMP seviyesini hangi fizyolojik ve/veya çevresel sinyallerin değiştirdiği henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (155,156). cAMP'nin düzenleyici görevinin genellikle

dolaylı bir etkiyle ilişkili olması dikkate alınacak olursa, ilerleyen zamanlarda etkilediği sRNA havuzunun artması kaçınılmaz olacaktır.

CsrB/C'nin biyofilm oluşumundaki rollerinin daha detaylı olarak incelendiği Bak ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *E. coli*'de bulunan 99 ayrı sRNA'yı aşırı ifade eden bir plazmid koleksiyonu oluşturularak biyofilm oluşumu ve ilgili fenotipler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bu hücresel süreçleri önemli ölçüde etkileyen 33 sRNA tanımlanmıştır. Bu sRNA'lar arasında yer alan CsrB'nin aşırı ifadesinin *csgD-lacZ* transkripsiyon füzyonunun ifadesini önemli ölçüde (>1.5 kat) düşürdüğü gözlenmiştir. Ancak aynı çalışmada, CsrB/C'nin hem biyofilm hem de kıvrımlı fimbriya oluşumunu destekledikleri belirtilmiştir (105). Bu durumda, *csgD* ekspresyonunun baskılanmasının, kıvrımlı fimbriya oluşumunu inhibe etmek için yeterli olmadığı ve başka bir düzenleyici katmanın bu süreçte yer aldığı fikri öne sürülmüştür.

Bizim çalışmamız sonucunda, *csgD* regülasyonunun CsrB ve CsrC isimli her iki sRNA'nın ekspresyon seviyelerinde önemli miktarda artışına neden olduğunu belirledik. *csgD* bakımından mutant *Salmonella* suşunda, *csrB*'nin log2 kat değişimi, doğal tip suşa göre 11.4 kat daha yüksek iken, *csrC*'nin ifadesi 11.9 kat daha yüksekti. *csgD*'nin aşırı ifade edildiği suşta ise, *csrB*'nin log2 kat değişimi, doğal tip suşa göre 8.6 kat, *csrC*'nin ifadesi 7 kat daha yüksekti. Yukarıda bahsedilen çalışmalar ile bizim sonuçlarımız birlikte ele alınacak olursa, CsgD regülasyonunun dolaylı olarak CsrA aktivitesinin azalmasına neden olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü CsgD regülasyonuna bağlı olarak hücrede *csrB/C* ifadesinin artması, daha önce bahsedildiği üzere CsrA aktivitesinin azalması ile sonuçlanacaktır. Diğer yandan *csgD* bakımından mutant *Salmonella* suşunda, *csrB/C* adlı sRNA'ların çok daha yüksek seviyede artışının gerçekleştiğini belirledik. Bu durum, çok daha fazla CsrA proteininin etkilerinin antagonize edilmesini sağlayacaktır. CsrA, yalnızca hücre hareketliliğini değil, aynı zamanda *Salmonella*'nın değişen ortamlara uyum sağlaması için önemli olan bir dizi hücresel süreci de kontrol eder (157). Özellikle, kolonizasyon ve biyofilm oluşumu için gerekli fimbriyaların seçici ekspresyonunda rol oynayarak *Salmonella*'nın patogenez sürecini önemli ölçüde düzenler (150). Jonas ve ark. (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, CsrA'nın, flagella fonksiyonunu ve biyofilm matriks bileşenlerinin üretimini kontrol eden c-di-GMP'ye özgü fosfodiesterazları doğrudan düzenlediği bildirilmiştir. Aynı zamanda FlhDC/FliA flagella kaskadının, EAL benzeri bir protein olan STM1344

aracılığıyla CsrA tarafından dolaylı olarak düzenlendiğini göstermişlerdir. CsrA, *STM1344*'ün ekspresyonunu doğrudan aşağı regüle etmektedir (157). Simm ve ark. (2009) ise, *STM1344*'ün CsgD ekspresyonunu pozitif ve hücre hareketliliğini negatif olarak düzenlediğini bildirmişlerdir (158). Bahsedilen çalışmalar, Şekil 7.2.'de gösterildiği üzere CsgD ile CsrA arasındaki ilişkiyi özetlemektedir. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz veriler bu ilişki ağına dahil edilmiş olup, CsgD ile CsrA'nın birbirleri üzerinde bir negatif etkiye sahip oldukları görüşünü destekler nitelikte bir sonuç ortaya çıkmaktadır.



Şekil 7.2. CsgD ile CsrA arasındaki ilişkinin *Salmonella*'daki hücresel süreçlere etkileri. Oklar ve düz başlı oklar sırasıyla pozitif ve negatif etkileşimleri temsil eder. Kesikli oklar ise, etkileşimin doğrudan veya dolaylı olabileceğini gösterir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular, kırmızı ok kullanılarak var olan düzenleyici ağa dahil edilmiştir.

Ek olarak *csrA* bakımından mutant *S. Typhimurium* suşları, beklendiği gibi artan tutunma veya rdar morfolop ifadesi göstermez. Bunun yerine mukoid ve pürüzsüz bir koloni görünümüne sahiptirler (74). Bu veriler, çalışmamız bulgularından hareketle yaptığımız CsgD ile CsrA'nın birbirleri üzerinde bir negatif etkiye sahip olduğu yorumunu doğrular niteliktedir.

Salmonella ile ilişkili olan *E. coli* türünde, QS sisteminde rol oynayan sRNA'lar üzerine bazı ön çalışmalar mevcuttur. Örneğin, AI-2 sentezini sağlayan *luxS* mRNA'nın, CRP-cAMP tarafından aktive edilen RyeE adında bir sRNA tarafından baskılandığı bilinmektedir (28).

cAMP, glikoz gibi hızla metabolize olabilen karbon kaynaklarının yokluğunda birikir ve transkripsiyon faktörü CRP'nin bir indükleyicisi olarak görev yapar. CRP-cAMP, AI-2'nin hücre içine alımında gerekli olan *lsr* operonunu da aktive eder. Bu nedenle, *E. coli*'de hem AI-2 sentezi hem de AI-2 tespiti, karbon kaynağı mevcudiyetine güçlü bir şekilde bağlıdır (128). Ayrıca *E. coli*'de, *ryeE*'nin aşırı ifadesinin kıvrımlı fimbriya sentezini azaltarak biyofilm oluşumunda negatif bir rolü olduğu gözlenmiştir (110). RyeE'nin *E. coli*'de tanımlanmış olan diğer önemli hedefleri arasında, alternatif sigma faktörü *rpoS* ve dış zar porini *ompX* mRNA yer alır. *ryeE*'nin aşırı ifadesinin *rpoS* ekspresyonunu aşağı regüle ettiği, *ompX* mRNA'sının ise degradasyonunu desteklediği bilinmektedir (159,160).

RyeE'ye benzer bir şekilde MicA isimli sRNA'nın da QS ilişkili olduğu bilinmektedir. Kint ve ark.'ları (2010), *luxS* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşları ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, biyofilm oluşumunun MicA'dan önemli ölçüde etkilendiğini göstermişlerdir. *micA*'nın ekspresyon seviyesinde, *luxS* mutant suşlar ile doğal tip suşlar açısından karşılaştırıldığında önemli bir farklılık belirlenmiştir ve biyofilm fenotipinin, LuxS'nin yokluğundan ziyade, hücredeki MicA seviyesine bağlı olduğu belirtilmiştir. Ancak MicA'nın, *Salmonella* biyofilm oluşumundaki rolünü tam olarak aydınlatmak için daha fazla kanıt gereksinim vardır (29). Buna ek olarak MicA'nın önemli hedefleri arasında, dış zar porinleri *ompA/X* ve tip I fimbriyanın regülasyonunda rol oynayan *fimB* mRNA'sı yer alır. MicA'nın tanımlanan tüm bu hedefleri üzerinde negatif bir etkisi olduğu bilinmektedir (155). Udekwu ve ark. (2005) tarafından belirtildiği üzere *micA*'nın bağlanma bölgesi, *luxS*'nin kodlama bölgesi ile örtüşmemektedir (132). Ancak *luxS*'nin kodlama bölgesi, *micA* ifadesine müdahale eden diğer düzenleyici unsurları içerebilir. Her iki genetik lokus arasındaki etkileşim mekanizmasını aydınlatmak için hem *luxS* hem de *micA* promotor bölgeleri ve transkripsiyon ile ilgili daha ileri çalışmalar gereklidir. Ayrıca, *E. coli*'de *micA*'nın aşırı ifadesinin, biyofilm oluşumunu hafif bir şekilde baskıladığı ve tip I fimbriya oluşumunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (105).

Çalışmamız kapsamında, *Salmonella*'da *csgD* regülasyonunun tıpkı *csrB/C* gibi, *micA* ve *ryeE* ifadelerinin de ciddi seviyelerde artışına neden olduğunu belirledik. Doğal tip suşa kıyasla, *csgD* genini aşırı ifade eden *Salmonella* suşunda, *micA* ve *ryeE*'nin ifade düzeyleri yaklaşık 7 kat artarken, *csgD* geni bakımından mutant suşta yaklaşık 12 kat artış gösterdi. Daha önce bahsedildiği üzere, her iki sRNA'nın AI-2 sentezinde görevli *luxS* mRNA'sı

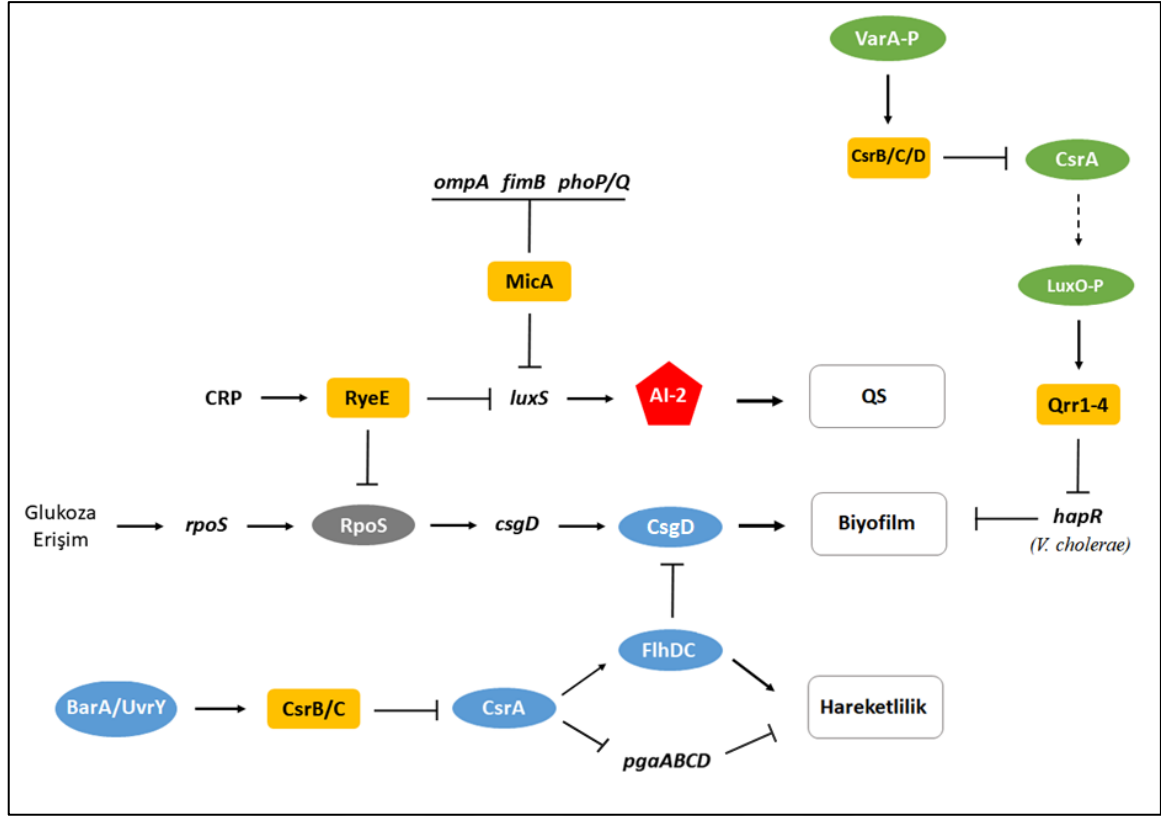
üzerinde negatif bir etkisi olduğu bilinmektedir. Bu sebeple artan *micA* ve *ryeE* ifadesinin, AI-2 sentezini azaltacağını bekleriz. Ancak ilerleyen bölümde bahsedilecek olan *csgD* ifadesinin AI-2 aktivitesine etkilerini belirlediğimiz çalışma verileri, bu sürecin daha karmaşık bir düzenleme içerdiğini düşündürmektedir. Çünkü *csgD*'nin aşırı ifadesinin gerçekleştiği suşta, AI-2 aktivitesinin anlamlı seviyede artış gösterdiğini belirledik. Dolayısıyla *micA* ve *ryeE* ifadelerinin artması, hücrede AI-2 aktivitesini azaltmaya yeterli olmamıştır. Bu süreçte, transkripsiyon faktörleri veya henüz tanımlanmamış QS ilişkili sRNA'lar rol oynuyor olabilir.

Özetle, bu çalışmada araştırılan sRNA'ların (MicA, CsrB/C ve RyeE) tümü, *csgD* ifadesine bağlı olarak yukarı doğru düzenlenmiştir. Çalışmayı bilime katkısı ve uygulanabilirliği açısından değerlendirecek olursak; *csgD*, özellikle biyofilm oluşumu ve QS ilişkili olan *Salmonella*'daki 4 ayrı sRNA üzerinde pozitif bir transkripsiyonel düzenleyici role sahiptir. Ayrıca bu sRNA'ların, biyofilm oluşumu ve QS ilişkili olmalarının yanı sıra, birden fazla mRNA hedeflerine sahip olmaları (Çizelge 7.1.) ve diğer birçok yolakta da rol oynadıkları dikkate alındığında (Şekil 7.3.), bakterilerde değişik fenotiplerin in vitro modülasyonunda kullanılabilecekleri ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 7.1. Tez çalışmasında araştırılan sRNA'ların bazı önemli hedefleri.

sRNA	Önemli Hedefleri	Referans
MicA	<i>luxS</i> , <i>fimB</i> , <i>phoP/Q</i> , <i>ompA/X</i>	(29,161–163)
RyeE	<i>luxS</i> , <i>rpoS</i> , <i>ompX</i>	(28,159)
CsrB/C	CsrA	(164)

Araştırılan sRNA'ların önemli hedefleri ile olan etkileşimleri ve hücresel süreçlere etkileri ise Şekil 7.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 7.3. QS ilişkili sRNA'ların hedefleri ve hücredeki fizyolojik etkileri. sRNA'lar, düzenleyici proteinler ve alternatif sigma faktörü sırasıyla turuncu, mavi ve gri renkte gösterilmektedir. Kırmızı figür, AI-2 molekülünü ve italik yazılar mRNA'ları temsil etmektedir. Mavi renkte gösterilen proteinlerin yer aldığı yollar *Salmonella* ve *E. coli* bakterilerine özgü iken yeşil renkte gösterilen düzenleyici proteinlerin yer aldığı yolak yalnızca *V. cholerae* ile ilişkilidir. Oklar ve düz başlı oklar sırasıyla pozitif ve negatif etkileşimleri temsil eder. Kesikli oklar ise, etkileşimin doğrudan veya dolaylı olabileceğini gösterir (121,146,165).

Bu çalışmada, *S. Typhimurium*'da CsgD regülasyonu ile QS ilişkili sRNA'ların ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırarak QS ve biyofilm oluşumu gibi hücresel süreçlere entegrasyonunun nasıl gerçekleştiğinin genel hatları belirlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, burada sunulan çalışma, sRNA'ların *Salmonella*'da CsgD regülasyonuna bağlı olarak QS düzenlemesindeki rolü ile ilgili ilk çalışmadır. Çalışmanın uzun vadeli amacı, burada sunulan verilerin *S. Typhimurium*'daki moleküler biyolojik ağların tam tanımına katkıda bulunmasıdır. Gelecekte bu çalışmanın geliştirilmesi için birçok araştırma gerçekleştirilebilir. CsgD'nin, yer aldığı QS ilişkili sRNA regülasyonunun tam bir resminin elde edilmesi RNA dizileme çalışmaları ile mümkündür. RNA dizileme teknolojilerinin azalan maliyetleri ve erişilebilirliğinin kolay hale gelmesi, hücresel düzenleyici ağlarla ilgili daha büyük ölçekli veri kümelerinin üretilmesiyle sonuçlanacaktır ve bu çalışmada sunulan

veriler arasındaki bağlantıyı tamamlayacaktır. Bizim çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz gibi bakteriyel regülönları araştırmak için mutant suşların kullanımı yaygın bir uygulamadır, ancak gen ekspresyonundaki değişiklikler doğrudan veya dolaylı bir şekilde gerçekleşmektedir. Bir transkripsiyon faktörü tarafından doğrudan gen düzenlemesini doğrulamak için protein-DNA veya protein-mRNA etkileşimlerinin gösterilmesi gereklidir. Dolayısıyla mutagenез temelli çalışmalar ve protein bağlanma bölgelerini tanımlayan global çalışmalar, düzenleyici ağlar içindeki doğrudan yolları belirlemek için birbirini tamamlayıcı olacaktır. Elbette, *S. Typhimurium*'da QS ilişkili sRNA'ların biyofilm oluşumunda oynadığı rolleri aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışma, araştırılan QS ilişkili sRNA'lar üzerinde CsgD tarafından doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenme mekanizmasının varlığını ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, araştırılan sRNA'lar ile hedef genleri arasındaki etkileşimin doğrulanması, *S. Typhimurium*'da QS sinyal ileti yolağındaki veya biyofilm oluşumundaki rollerini anlamamız için gereklidir. Çalışmamızda, CsgD ile QS ilişkili sRNA'lar arasındaki doğrudan bir etkileşimi doğrulayacak deneysel süreç yürütmedik, ancak CsgD regülasyonunun araştırılan sRNA'ların ifadesini önemli seviyede artırdığını kanıtladık. Bu etkileşimin, doğrudan CsgD tarafından veya CsgD'nin dahil olduğu başka bir mekanizma ile meydana gelmesi mümkündür. Bu nedenle, sonuçlar doğrulanmayı beklemektedir.

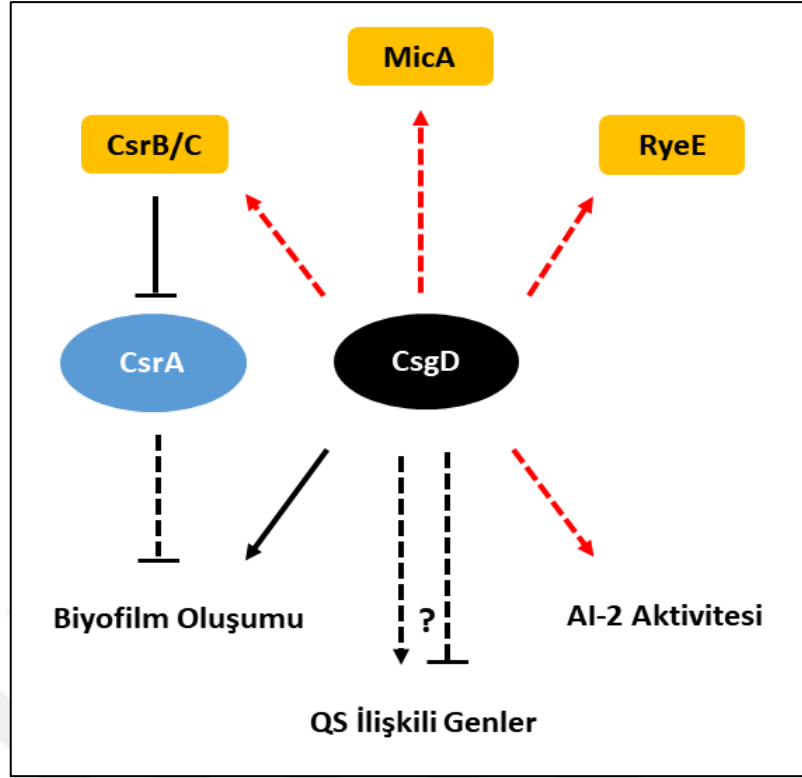
Çalışmamızın diğer bir basamağında, CsgD regülasyonuna bağlı olarak *S. Typhimurium* tarafından üretilen hücre dışı AI-2 sinyal faktörünü saptamak için *V. harveyi* BB170 raportör suşunu kullandık. *V. harveyi* BB170 suşu, hücre dışı ortamda bulunan AI-2 moleküllerinin varlığında biyoluminesans (ışık) sergiler (166). Bu ışık miktarının ölçülmesi yoluyla doğal tip ve mutant *S. Typhimurium* suşlarındaki AI-2 aktivitesini hesapladık. CsgD regülasyonunun AI-2 aktivitesine etkilerinin belirlendiği lüminesans denemelerinin sonuçları bize *csgD*'nin aşırı ifade edildiği suşun, en yüksek bağlı AI-2 aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Dört saatlik inkübasyon sonunda, bu suşun bağlı AI-2 aktivitesinde % 277 artış gerçekleştiğini belirledik. Bu artışın özellikle üçüncü saatten itibaren güçlü bir şekilde çoğaldığını gözlemledik. Diğer yandan doğal tip ve *csgD* bakımından mutant suşun AI-2 aktivitesi birbirlerine oldukça yakındı. Bu yakınlık, 4 saatlik inkübasyon süresinin ardından *csgD* bakımından mutant suşun % 123 artış göstermesi ile değişmiştir. Ancak bu artış istatistikî açıdan anlamlı bir farklılık olarak değerlendirilmedi.

CsgD regülasyonuna bağlı olarak AI-2 aktivitelerini belirlediğimiz tüm *Salmonella* suşlarından üstel fazın ortalarında elde ettiğimiz süpernatantları kullandık. *S. Typhimurium*'da AI-2 üretimi, orta üstel fazda maksimum konsantrasyona ulaşır ve durağan fazın başlangıcında, bu sinyal, glukoz tükenmesi ile birlikte ortamdaki kaybolmaya başlar (167). Bu durum, 1 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleştirilen lüminometrik ölçümün kabaca tüm suşlarda eşdeğer miktarda ve yüksek aktivite göstermesini açıklar.

Sonuçlar, *S. Typhimurium*'da *csgD*'nin aşırı ifadesinin AI-2 üretimini etkileyerek teşvik ettiğini düşünebiliriz. Bu durum anlaşılabilir. Çünkü, artan AI-2 aktivitesi doğrudan veya dolaylı olarak biyofilm miktarını artırmaya yönelik bir regülasyon sağlayabilir. *E. coli* ile gerçekleştirilen çalışmalar bunun mümkün olduğunu göstermiştir. Örneğin, Andrés ve ark. (2006), AI-2'nin biyofilm oluşumunu artırdığını ve hareketliliği uyararak biyofilm mimarisini etkilediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, AI-2'nin EPS üretimini teşvik ederek biyofilm oluşumunu düzenlediği belirtilmiştir (168). Ancak, *csgD*'nin aşırı ifadesinin AI-2 üretimini teşvik ettiğini kesin bir ifadeyle söyleyemeyiz. Öyle ki *csgD*'nin aşırı ifadesinin AI-2'nin hücre içine alınmasını olumsuz etkilediğini ve bunun sonucunda var olan AI-2 moleküllerinin birikmesine neden olduğunu da düşünebiliriz. Bu hipotezin test edilmesi amacıyla, *csgD* regülasyonunun, AI-2 sinyal moleküllerinin hücre tarafından tanınması ve taşınmasında görevli olan Lsr taşıma sistemi üzerindeki etkilerini qRT-PZR denemeleri ile belirledik. Lsr taşıma sisteminde yer alan *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ifadelerinin araştırılan test grupları arasında normalize edilmiş kat farkı verileri kullanılarak log₂ tabanına göre kat değişimlerini belirledik. Sonuçlar, doğal tip suşa kıyasla, *csgD*'nin aşırı ekspresyonunun yalnızca *lsrK* ifadesinin (4.2 kat) artışına neden olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda bu suşta, daha önce belirtildiği üzere, hücre dışı AI-2 miktarının diğer suşlara kıyasla en yüksek seviyede olduğunu gözlemledik. LsrK, AI-2 moleküllerinin hücre içine alındıktan sonra fosforile edilmesinde görevlidir. Normal şartlarda bu fosforilasyon, *lsrA* ifadesinin de artmasına neden olarak daha fazla AI-2 molekülünün hücre içine alınmasını sağlar (169). *csgD*, her ne kadar *lsrK* ifadesinin artmasına neden olsa da, *lsrA* ifadesinin artışının gerçekleşmemesi bu süreçte başka bir düzenleyici mekanizmanın var olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak *csgD*, Lsr taşıma sisteminde yer alan *lsrA* ve *lsrK* genleri üzerinde beklendiği gibi negatif bir etki yaratmamıştır. Dolayısıyla AI-2'nin hücre dışında birikmesine neden olmadığı sonucuna varabiliriz. Bu durum, *csgD*'nin aşırı ekspresyonunun, LuxS tarafından gerçekleştirilen AI-2 sentezi üzerinde pozitif bir

regülasyona sebep olabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Öte yandan *csgD* eksikliğinin *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* gen ifade seviyelerinin tamamının artışına neden olduğunu belirledik. Daha önce bahsedildiği üzere doğal tip suşa kıyasla, *csgD* geni bakımından mutant *Salmonella* suşunun AI-2 aktivitesinde önemli derecede bir değişiklik belirlemedik. Aynı suшта, *lsrA* (7.4 kat), *lsrK* (8.3 kat) ve *lsrR* (4.9 kat) gen ifadelerinin artışı, AI-2'nin hücre içine alımını artırdığına işaret etmektedir. Ancak *lsrR*'nin, AI-2 moleküllerinin taşınması sürecinde negatif rol oynadığı bilinmektedir. Hücre dışındaki AI-2, LsrA'nın dahil olduğu sistem aracılığıyla hücre içine alınarak LsrK tarafından fosforile edilir. LsrR, fosforile edilmiş AI-2'nin yokluğunda *lsr* operonunun ekspresyonunu baskılamaktadır. Fosforile edilmiş AI-2, LsrR proteinine bağlanarak onu inaktive eder ve *lsr* operonu üzerindeki baskıyı hafifletir (169). LsrR'nin bahsedilen baskılayıcı etkisi, *csgD* geni bakımından mutant *Salmonella* suşunda AI-2 moleküllerinin hücre içine alımını azaltmış olabilir. Ancak bu baskılama, *lsrR*'ye kıyasla *lsrA* ve *lsrK* ifadelerinin daha yüksek seviyede artmaları sebebiyle kompanse edilmiş gibi görünmektedir.

Sonuç olarak, *Salmonella*'da *csgD*'nin aşırı ifadesinin AI-2 aktivitesini artırdığı açıktır. Bu nedenle, biyofilm oluşumunun ana regülatörü olan CsgD'nin QS sinyal ileti yolağında da pozitif bir rolü olabileceğini bildiriyoruz. CsgD regülasyonuna bağlı olarak QS ilişkili sRNA'ların (MicA, CsrB/C ve RyeE) ifadelerinin önemli seviyelerde artış göstermesi, bu hipotezimizi desteklemektedir. CsgD'nin biyofilm oluşumu, QS ilişkili sRNA'lar ve AI-2 aktivitesi üzerindeki etkileri, elde ettiğimiz veriler dikkate alınarak Şekil 7.4.'de özetlenmiştir.



Şekil 7.4. *S. Typhimurium*'da CsgD regülasyonunun biyofilm oluşumu, QS ilişkili sRNA'lar ve AI-2 aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkileri. CsgD regülasyonu, araştırdığımız dört sRNA (CsrB/C, MicA, RyeE) ve AI-2 aktivitesi üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir. Oklar ve düz başlı oklar sırasıyla pozitif ve negatif etkileşimleri temsil eder. Kesikli oklar ise, etkileşimin dolaylı olabileceğini gösterir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, kırmızı ok kullanılarak var olan düzenleyici ağa dahil edilmiştir.

Salmonella'da CsgD regülasyonunun önemli derecede etkilediğini belirlediğimiz sRNA'ların, AI-2 üretiminde görevli *luxS* operonunun regülasyonunda da rol aldığını gösteren çalışmaların ortaya çıkması beklentilerimiz arasındadır. Bu çalışmalar, hem QS hem de biyofilm ilişkili sRNA'ların belirlenmesini sağlamakla birlikte her iki süreç arasındaki bağlantının sRNA'lar aracılığıyla gerçekleştiğini gösterebilir. Diğer yandan bu tip düzenleyici mekanizmaların aydınlatılması, bakteriyel enfeksiyonları önlemek veya azaltmak için yeni stratejilerin belirlenmesine ve geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*. 2019;12(4):504–21.
2. Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*. 2018 Jan 1;206:60–73.
3. Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, et al. *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;10:910.
4. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. *J Biol Chem*. 2016 Jun 10;291(24):12538–46.
5. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Feb;2(2):114–22.
6. Maksimova YuG. Microbial biofilms in biotechnological processes. *Appl Biochem Microbiol*. 2014 Dec 1;50(8):750–60.
7. 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 Feb;43(3):793–808.
8. Römling U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *CMLS, Cell Mol Life Sci*. 2005 Jun 1;62(11):1234–46.
9. Gerstel U, Römling U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol*. 2003 Dec;154(10):659–67.

10. Römling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol.* 1998 Apr;28(2):249–64.
11. Zakikhany K, Harrington CR, Nimtz M, Hinton JCD, Römling U. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 2010 Aug;77(3):771–86.
12. 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 Apr;36(1):10–23.
13. Fazli M, Almlad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol.* 2014 Jul;16(7):1961–81.
14. Deepika KV, Pallaval Veera Bramhachari. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships: Relevance to Complex Signalling Networks and Prospective Applications. In: Pallaval Veera Bramhachari, editor. *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence* [Internet]. Singapore: Springer; 2018 [cited 2021 Sep 23]. p. 67–79.
15. Khan F, Javaid A, Kim Y-M. Functional Diversity of Quorum Sensing Receptors in Pathogenic Bacteria: Interspecies, Intraspecies and Interkingdom Level. *Curr Drug Targets.* 2019;20(6):655–67.
16. Verbeke F, De Craemer S, Debunne N, Janssens Y, Wynendaele E, Van de Wiele C, et al. Peptides as Quorum Sensing Molecules: Measurement Techniques and Obtained Levels In vitro and In vivo. *Frontiers in Neuroscience.* 2017;11:183.
17. Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2001 Nov;42(3):777–93.
18. Federle MJ. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol.* 2009;16:18–32.

19. Sholpan A, Lamas A, Cepeda A, Franco CM. Salmonella spp. quorum sensing: an overview from environmental persistence to host cell invasion. *AIMS Microbiol.* 2021 Jun 24;7(2):238–56.
20. Boehm A, Vogel J. The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. *Mol Microbiol.* 2012 Apr;84(1):1–5.
21. Monteiro C, Papenfort K, Hentrich K, Ahmad I, Le Guyon S, Reimann R, et al. Hfq and Hfq-dependent small RNAs are major contributors to multicellular development in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *RNA Biol.* 2012 Apr;9(4):489–502.
22. Gottesman S, Storz G. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Dec 1;3(12).
23. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):615–28.
24. Holmqvist E, Reimegård J, Sterk M, Grantcharova N, Römling U, Wagner EGH. Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *EMBO J.* 2010 Jun 2;29(11):1840–50.
25. Repoila F, Darfeuille F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biology of the Cell.* 2009;101(2):117–31.
26. Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. The Small RNA Chaperone Hfq and Multiple Small RNAs Control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2004 Jul 9;118(1):69–82.
27. Tu KC, Bassler BL. Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev.* 2007 Jan 15;21(2):221–33.
28. De Lay N, Gottesman S. The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *J Bacteriol.* 2009 Jan;191(2):461–76.
29. Kint G, De Coster D, Marchal K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. The small regulatory RNA molecule MicA is involved in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2010 Nov 2;10:276.

30. Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella. *BioMed Research International*. 2017 Apr 30;2017:e3782182.
31. Salmonella Tennessee (SEM) | Central Microscopy Research Facility [Internet]. [cited 2021 Aug 22]. Available from: <https://cmrf.research.uiowa.edu/file/564>
32. Eng S-K, Pusparajah P, Mutalib N-SA, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 2015 Jul 3;8(3):284–93.
33. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):53–66.
34. Flemming H-C, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Apr;17(4):247–60.
35. Grimont P, Weill F-X. *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institute Pasteur. 2007 Jan 1;1–166.
36. Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol*. 2014;5:481.
37. Tennant SM, MacLennan CA, Simon R, Martin LB, Khan MI. Nontyphoidal salmonella disease: Current status of vaccine research and development. *Vaccine*. 2016 Jun 3;34(26):2907–10.
38. Moest TP, Méresse S. Salmonella T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Feb;16(1):38–44.
39. Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Nakane A, et al. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic Salmonella enterica serovar typhimurium infection of mice. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):690–6.

40. Gorvel JP, Méresse S. Maturation steps of the Salmonella-containing vacuole. *Microbes Infect.* 2001 Dec;3(14–15):1299–303.
41. White AP, Gibson DL, Grassl GA, Kay WW, Finlay BB, Vallance BA, et al. Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 2008 Mar;76(3):1048–58.
42. González J, Alberts H, Lee J, Doolittle L, Gunn J. Biofilm Formation Protects *Salmonella* from the Antibiotic Ciprofloxacin In Vitro and In Vivo in the Mouse Model of chronic Carriage. *Scientific Reports.* 2018 Jan 9;8.
43. González JF, Alberts H, Lee J, Doolittle L, Gunn JS. Biofilm Formation Protects *Salmonella* from the Antibiotic Ciprofloxacin In Vitro and In Vivo in the Mouse Model of chronic Carriage. *Sci Rep.* 2018 Jan 9;8(1):222.
44. Gonzalez-Escobedo G, Marshall JM, Gunn JS. Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: understanding the carrier state. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jan;9(1):9–14.
45. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol.* 2014 Nov;22(11):648–55.
46. Solano C, Sesma B, Alvarez M, Urdaneta E, Garcia-Ros D, Calvo A, et al. Virulent strains of *Salmonella enteritidis* disrupt the epithelial barrier of Caco-2 and HEp-2 cells. *Arch Microbiol.* 2001 Jan;175(1):46–51.
47. Lu Y, Dong H, Chen S, Yiping C, Peng D, Liu X. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Pullorum strains. *African Journal of Microbiology Research.* 2011 Sep 9;5.
48. Boddicker JD, Ledebor 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 Sep;45(5):1255–65.

49. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005 Jan;13(1):7–10.
50. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology.* 2016 Sep;14(9):563–75.
51. Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Aug;65(8):3710–3.
52. Møretrø T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J Appl Microbiol.* 2009 Mar;106(3):1005–12.
53. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010 Nov;5(11):1663–74.
54. Abebe GM. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology.* 2020 Aug 25;2020:e1705814.
55. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry.* 2019;7:824.
56. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013 May;(136):1–51.
57. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah T-F, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* 2018 Dec;4(12):e01067.
58. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Dec;15(12):740–55.

59. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H*. 2014 Oct;228(10):1083–99.
60. von Eiff C, Jansen B, Kohlen W, Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*. 2005;65(2):179–214.
61. Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, et al. Temporal expression of *agrB*, *cidA*, and *alsS* in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. *Pathog Dis*. 2014 Apr;70(3):414–22.
62. Oppenheimer-Shaanan Y, Steinberg N, Kolodkin-Gal I. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends Microbiol*. 2013 Nov;21(11):594–601.
63. Borges KA, Furian TQ, Souza SN, Menezes R, Tondo EC, Salle CTP, et al. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018 Jan;38(1):71–6.
64. Whitehead KA, Verran J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*. 2015 Apr 1;2:84–91.
65. Collinson SK, Emödy L, Müller KH, Trust TJ, Kay WW. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol*. 1991 Aug;173(15):4773–81.
66. Milanov D, Ljubojević D, Cabarkapa I, Karabasil N, Velhner M. Biofilm as risk factor for *Salmonella* contamination in various stages of poultry production. *Poultry Science*. 2017 Jun 26;81.
67. Reichhardt C, McCrate OA, Zhou X, Lee J, Thongsomboon W, Cegelski L. Influence of the amyloid dye Congo red on curli, cellulose, and the extracellular matrix in *E. coli* during growth and matrix purification. *Anal Bioanal Chem*. 2016 Nov 1;408(27):7709–17.

68. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:131–47.
69. White AP, Gibson DL, Collinson SK, Banser PA, Kay WW. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *J Bacteriol.* 2003 Sep;185(18):5398–407.
70. Zogaj X, Nimtze 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 Mar;39(6):1452–63.
71. 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 Dec;58(5):1322–39.
72. He X, Ahn J. Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters.* 2011 Dec 1;325(2):180–8.
73. Mika F, Hengge R. Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci.* 2013 Feb 26;14(3):4560–79.
74. Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BMM. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading).* 2006 Nov;152(Pt 11):3411–24.
75. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BMM. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol.* 2003 Dec;185(24):7257–65.
76. 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;193(10):2587–97.
77. Liu Z, Niu H, Wu S, Huang R. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerg Microbes Infect.* 2014 Jan;3(1):e1.

78. Brombacher E, Baratto A, Dorel C, Landini P. Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of Cellulose Biosynthesis and Control of Negative Determinants for Microbial Adhesion. *J Bacteriol.* 2006 Mar;188(6):2027–37.
79. Gerstel U, Römling U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol.* 2001 Oct;3(10):638–48.
80. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U. Bistable Expression of CsgD in Biofilm Development of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology.* 2010 Jan 15;192(2):456–66.
81. Gerstel U, Park C, Römling U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol.* 2003 Aug;49(3):639–54.
82. Robbe-Saule V, Jaumouillé V, Prévost M-C, Guadagnini S, Talhouarne C, Mathout H, et al. *Crl* activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2006 Jun;188(11):3983–94.
83. Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet.* 2006;40:385–407.
84. Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Apr;7(4):263–73.
85. Srivastava D, Waters CM. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic Di-GMP. *J Bacteriol.* 2012 Sep;194(17):4485–93.
86. Römling U, Amikam D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Apr;9(2):218–28.
87. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol.* 2004 Aug;53(4):1123–34.

88. Kader A, Simm R, Gerstel U, Morr M, Römling U. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 2006 May;60(3):602–16.
89. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 1979 Dec;43(4):496–518.
90. Diggle SP, Gardner A, West SA, Griffin AS. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Jul 29;362(1483):1241–9.
91. Akçelik N, Akçelik M. Characteristics and Regulation of Biofilm Formation In *Salmonella*. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology.* 2021 Jan 1;60:113–9.
92. Ahmer BMM, van Reeuwijk J, Timmers CD, Valentine PJ, Heffron F. *Salmonella typhimurium* Encodes an SdiA Homolog, a Putative Quorum Sensor of the LuxR Family, That Regulates Genes on the Virulence Plasmid. *J Bacteriol.* 1998 Mar;180(5):1185–93.
93. Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BMM. SdiA of *Salmonella enterica* Is a LuxR Homolog That Detects Mixed Microbial Communities. *J Bacteriol.* 2001 Oct;183(19):5733–42.
94. Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1639–44.
95. Xue T, Zhao L, Sun H, Zhou X, Sun B. LsrR-binding site recognition and regulatory characteristics in *Escherichia coli* AI-2 quorum sensing. *Cell Res.* 2009 Nov;19(11):1258–68.
96. Kalia VC, editor. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight* [Internet]. Springer India; 2015 [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://www.springer.com/gp/book/9788132219811>

97. Jesudhasan PR, Cepeda ML, Widmer K, Dowd SE, Soni KA, Hume ME, et al. Transcriptome analysis of genes controlled by luxS/autoinducer-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 2010 Apr;7(4):399–410.
98. Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM, Hardie KR. Making “sense” of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2005 May;3(5):383–96.
99. Merighi M, Carroll-Portillo A, Septer AN, Bhatiya A, Gunn JS. Role of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Two-Component System PreA/PreB in Modulating PmrA-Regulated Gene Transcription. *J Bacteriol.* 2006 Jan;188(1):141–9.
100. Thomason MK, Storz G. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet.* 2010;44:167–88.
101. Ghaz-Jahanian MA, Khodaparastan F, Berenjian A, Jafarizadeh-Malmiri H. Influence of small RNAs on biofilm formation process in bacteria. *Mol Biotechnol.* 2013 Nov;55(3):288–97.
102. Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Aug 15;9(8):578–89.
103. Mika F, Hengge R. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol.* 2014 May 1;11(5):494–507.
104. Chambers JR, Sauer K. Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends Microbiol.* 2013 Jan;21(1):39–49.
105. Bak G, Lee J, Suk S, Kim D, Young Lee J, Kim K-S, et al. Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2015 Oct 15;5:15287.
106. Lease RA, Belfort M. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Aug 29;97(18):9919–24.

107. Parker A, Cureoglu S, De Lay N, Majdalani N, Gottesman S. Alternative pathways for *Escherichia coli* biofilm formation revealed by sRNA overproduction. *Mol Microbiol.* 2017 Jul;105(2):309–25.
108. Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K, Gottesman S. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol.* 2001 Mar;39(5):1382–94.
109. Hu LI, Chi BK, Kuhn ML, Filippova EV, Walker-Peddakotla AJ, Bäsell K, et al. Acetylation of the response regulator RcsB controls transcription from a small RNA promoter. *J Bacteriol.* 2013 Sep;195(18):4174–86.
110. Bak G, Han K, Kim D, Lee Y. Roles of rpoS-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *Microbiologyopen.* 2014 Feb;3(1):15–28.
111. Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(3):813–26.
112. McCullen CA, Benhammou JN, Majdalani N, Gottesman S. Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. *J Bacteriol.* 2010 Nov;192(21):5559–71.
113. Mika F, Busse S, Possling A, Berkholz J, Tschowri N, Sommerfeldt N, et al. Targeting of csgD by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2012 Apr;84(1):51–65.
114. Jørgensen MG, Nielsen JS, Boysen A, Franch T, Møller-Jensen J, Valentin-Hansen P. Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2012 Apr;84(1):36–50.
115. Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, et al. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol.* 2001 Jun 26;11(12):941–50.

116. Urbanowski ML, Stauffer LT, Stauffer GV. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2000 Aug;37(4):856–68.
117. Jin Y, Watt RM, Danchin A, Huang J. Small noncoding RNA *GcvB* is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*. 2009 Apr 20;10:165.
118. Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G. A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell*. 1997 Jul 11;90(1):43–53.
119. Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G. The *OxyS* regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J*. 1998 Oct 15;17(20):6061–8.
120. De Lay N, Gottesman S. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2012 Nov;86(3):524–38.
121. Bejerano-Sagie M, Xavier KB. The role of small RNAs in quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*. 2007 Apr 1;10(2):189–98.
122. Wassarman KM. Small RNAs in Bacteria: Diverse Regulators of Gene Expression in Response to Environmental Changes. *Cell*. 2002 Apr 19;109(2):141–4.
123. Bardill JP, Zhao X, Hammer BK. The *Vibrio cholerae* quorum sensing response is mediated by Hfq-dependent sRNA/mRNA base pairing interactions. *Mol Microbiol*. 2011 Jun;80(5):1381–94.
124. Gupta RKr, Luong TT, Lee CY. RNAlII of the *Staphylococcus aureus* *agr* system activates global regulator *MgrA* by stabilizing mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 10;112(45):14036–41.
125. Shao Y, Feng L, Rutherford ST, Papenfort K, Bassler BL. Functional determinants of the quorum-sensing non-coding RNAs and their roles in target regulation. *EMBO J*. 2013 Jul 31;32(15):2158–71.

126. Rutherford ST, van Kessel JC, Shao Y, Bassler BL. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios. *Genes Dev.* 2011 Feb 15;25(4):397–408.
127. Feng L, Rutherford ST, Papenfort K, Bagert JD, van Kessel JC, Tirrell DA, et al. A qrr noncoding RNA deploys four different regulatory mechanisms to optimize quorum-sensing dynamics. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1–2):228–40.
128. Xavier KB, Bassler BL. Regulation of Uptake and Processing of the Quorum-Sensing Autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005 Jan;187(1):238–48.
129. Van Puyvelde S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Experimental approaches to identify small RNAs and their diverse roles in bacteria – what we have learnt in one decade of MicA research. *Microbiologyopen.* 2015 Oct;4(5):699–711.
130. Urban JH, Vogel J. Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(3):1018–37.
131. Rasmussen AA, Eriksen M, Gilany K, Udesen C, Franch T, Petersen C, et al. Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol Microbiol.* 2005 Dec;58(5):1421–9.
132. Udekwu KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegård J, Holmqvist E, Wagner EGH. Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev.* 2005 Oct 1;19(19):2355–66.
133. Udekwu KI. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of the *Escherichia coli* luxS mRNA; Involvement of the sRNA MicA. *PLOS ONE.* 2010 Oct 18;5(10):e13449.
134. Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G 2008. The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology.* 154(1):16–29.
135. Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology.* 2005;58(4):1186–202.

136. Vakulskas CA, Potts AH, Babitzke P, Ahmer BMM, Romeo T. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015 Jun;79(2):193–224.
137. Salmonella (non-typhoidal) [Internet]. [cited 2021 Nov 15]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
138. MacKenzie KD, Palmer MB, Köster WL, White AP. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species. *Front Vet Sci* [Internet]. 2017 Aug 25 [cited 2019 Jul 17];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581909/>
139. Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:189–213.
140. Addgene: Vector Database - pBAD24 [Internet]. [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://www.addgene.org/vector-database/1845/>
141. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
142. Lu L, Hume ME, Pillai SD. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. *J Food Prot.* 2004 Jul;67(7):1457–62.
143. Beisel CL, Storz G. Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Sep;34(5):866–82.
144. Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR. Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Curr Biol.* 2001 Sep 4;11(17):1369–73.
145. Papenfort K, Said N, Welsink T, Lucchini S, Hinton JCD, Vogel J. Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Molecular Microbiology.* 2009 Oct 1;74(1):139–58.
146. Hébrard M, Kröger C, Srikumar S, Colgan A, Händler K, Hinton J. sRNAs and the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *RNA Biol.* 2012 Apr 1;9(4):437–45.

147. Hammer BK, Bassler BL. Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *PNAS*. 2007 Jul 3;104(27):11145–9.
148. Svenningsen SL, Waters CM, Bassler BL. A negative feedback loop involving small RNAs accelerates *Vibrio cholerae*'s transition out of quorum-sensing mode. *Genes Dev*. 2008 Jan 15;22(2):226–38.
149. Tu KC, Waters CM, Svenningsen SL, Bassler BL. A small-RNA-mediated negative feedback loop controls quorum-sensing dynamics in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*. 2008;70(4):896–907.
150. Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol*. 2011 Jun;80(6):1637–56.
151. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BMM. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*. 2006 Nov;296(7):449–66.
152. El Mouali Y, Esteva-Martínez G, García-Pedemonte D, Balsalobre C. Differential Regulation of CsrC and CsrB by CRP-cAMP in *Salmonella enterica*. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:2498.
153. Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S, Adhya S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:749–95.
154. Paytubi S, Cansado C, Madrid C, Balsalobre C. Nutrient Composition Promotes Switching between Pellicle and Bottom Biofilm in *Salmonella*. *Front Microbiol*. 2017;8:2160.
155. Mouali YE, Gaviria-Cantin T, Sánchez-Romero MA, Gibert M, Westermann AJ, Vogel J, et al. CRP-cAMP mediates silencing of *Salmonella* virulence at the post-transcriptional level. *PLOS Genetics*. 2018 Jun 7;14(6):e1007401.

156. Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol.* 2003 Nov;50(4):1111–24.
157. Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Römling U, Melefors Ö. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environ Microbiol.* 2010 Feb;12(2):524–40.
158. Simm R, Remminghorst U, Ahmad I, Zakikhany K, Römling U. A Role for the EAL-Like Protein STM1344 in Regulation of CsgD Expression and Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ν .
159. Kim W, Lee Y. Mechanism for coordinate regulation of rpoS by sRNA-sRNA interaction in *Escherichia coli*. *RNA Biol.* 2020 Feb;17(2):176–87.
160. Johansen J, Eriksen M, Kallipolitis B, Valentin-Hansen P. Down-regulation of outer membrane proteins by noncoding RNAs: unraveling the cAMP-CRP- and sigmaE-dependent CyaR-ompX regulatory case. *J Mol Biol.* 2008 Oct 31;383(1):1–9.
161. Coornaert A, Lu A, Mandin P, Springer M, Gottesman S, Guillier M. MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol Microbiol.* 2010 Apr;76(2):467–79.
162. Gogol EB, Rhodius VA, Papenfort K, Vogel J, Gross CA. Small RNAs endow a transcriptional activator with essential repressor functions for single-tier control of a global stress regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12875–80.
163. Johansen J, Rasmussen AA, Overgaard M, Valentin-Hansen P. Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol.* 2006 Nov 17;364(1):1–8.
164. Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, et al. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2003 May;48(3):657–70.
165. Arrieta-Ortiz ML, Hafemeister C, Shuster B, Baliga NS, Bonneau R, Eichenberger P. Inference of Bacterial Small RNA Regulatory Networks and Integration with

- Transcription Factor-Driven Regulatory Networks. *mSystems*. 2020 Jun 2;5(3):e00057-20.
166. Taga ME. Methods for Analysis of Bacterial Autoinducer-2 Production. In: Coico R, Kowalik T, Quarles J, Stevenson B, Taylor R, editors. *Current Protocols in Microbiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005 [cited 2020 May 30]. p. mc01c01s00.
167. Taga ME, Bassler BL. Chemical communication among bacteria. *PNAS*. 2003 Nov 25;100(suppl 2):14549–54.
168. González Barrios AF, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK. Autoinducer 2 Controls Biofilm Formation in *Escherichia coli* through a Novel Motility Quorum-Sensing Regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol*. 2006 Jan;188(1):305–16.
169. Choi J, Shin D, Kim M, Park J, Lim S, Ryu S. LsrR-Mediated Quorum Sensing Controls Invasiveness of *Salmonella typhimurium* by Regulating SPI-1 and Flagella Genes. *PLOS ONE*. 2012 May 18;7(5):e37059.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melih Aşan

Eğitim Durumu

Lise: Adana Ceyhan Halil Çiftçi Anadolu Lisesi [2009 – 2013]

Lisans: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü [2013 – 2017]

Yayınlar

- An Overview on the Roles of Bacterial Small RNAs in Regulatory Networks
Current Trends On Biotechnology & Microbiology 1 (5): 78-81.
Asan M., Akcelik N., Akcelik M.

Bildiriler

- 3. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı
Küçük RNA'ların Bakterilerde Biyofilm Oluşum Sürecine Etkileri
[Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum), 19/03/2020 – 20/03/2020]
Asan M., Akcelik N., Akcelik M.
- 3. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı
Bakteriyel Biyofilm Yapıları ile Mücadelede Lantibiyotiklerin Kullanımı
[Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum), 19/03/2020 – 20/03/2020]
Asan M., Akcelik N., Akcelik M.
- Uluslararası Yeşil Biyoteknoloji Kongresi
Genetic Stability Confirmation of Cryopreserved Three Different *Mentha×piperita* L. Cultivars Using ISSR Markers
[İstanbul, Türkiye (Poster Sunumu), 11/09/2017 – 13/09/2017]
Kivrak S., Galatalı S., Asan M., Isik S., Tokgoz H., Kaya Y., Zengin T., Kaya E.

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Asan M., Akcelik N., Akcelik M. “Küçük RNA’ların Bakterilerde Biyofilm Oluşum Sürecine Etkileri“. 3. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı. Mart 19-20, 2020 Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum)





3rd INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON
BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES
19 - 20 March 2020
Ankara / Turkey
(EurasianBioChem 2020)
www.eurasianbiochem.org

PROCEEDING BOOK

EurasianBioChem

ISBN: 978-605-69426-1-7

Küçük RNA'ların bakterilerde biyofilm oluşum sürecine etkileri

Melih Aşan¹, Nefise Akçelik^{1*}, Mustafa Akçelik²

*¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-mail: nakcelik@ankara.edu.tr

Özet

Biyofilm yapısı, canlı veya cansız bir yüzeye tutunan bakterilerin oluşturdukları topluluğun kendi ürettikleri polimerik matriks içerisinde paketlenmesi sonucu oluşan yaşam formu olarak tanımlanmaktadır. Sahip oldukları bu koruyucu tabaka nedeniyle biyofilm bakterileri; çeşitli çevresel stres koşulları ve konak bağışıklık sistemi başta olmak üzere, antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı da daha dirençli olmaktadır. Son kanıtlar, bakterilerin, biyofilm yapısının oluşumunun ya da hücrelerin planktonik formda canlılıklarını sürdürmesinin kodlama yapmayan küçük RNA'lar (sRNA'lar) tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Çevresel sinyallere cevap olarak sRNA'lar regülatör yolaklarda yer alan proteinlerin ifadesini etkileyerek ya da doğrudan biyofilm oluşumunda rol alan proteinleri regüle etmek suretiyle biyofilm oluşumunu kontrol etmektedir. Biyofilm oluşumu çok sayıda genin regülasyonunun gerçekleştiği kompleks bir süreçtir. Bu süreçte hücrenin büyüme koşullarına bağlı olarak aktive olan sRNA'lar da hedef genlerin transkripsiyonlarını regüle ederek hücrenin hayatta kalma olasılığını artırırlar. sRNA'lar, transkripsiyon, translasyon ve mRNA stabilitesini hem pozitif hem de negatif olarak modüle edebilirler. Bu nedenle biyofilm gelişimi sırasında sRNA'ların rolü çok önemlidir ve bu regülasyonun tam bir resmini elde etmek için biyofilm büyümesi, olgunlaşması ve dağılmasına odaklanan çalışmaların ötesine geçilmesi gerekecektir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, sRNA, CsgD, Hfq.

Influence of small RNAs on Biofilm Formation Process in Bacteria

Abstract

The biofilm structure is the life form that occurs when a group of bacteria attached to biotic or abiotic surface is packaged within the polymeric matrix produced by them. Due to this protective layer, biofilm bacteria are also more resistant to antibiotics and disinfectants, particularly various environmental stress conditions and the host immune system. Recent evidences suggest that the formation of biofilm structure or the viability of cells in planktonic form are regulated by non-coding small RNAs (sRNAs). In response to environmental signals, sRNAs control biofilm formation by influencing the expression of proteins in regulatory pathways or directly regulating proteins involved in biofilm formation. Biofilm formation is a complex process in which a large number of genes are regulated. In this process, activated sRNAs, depending on the cell's growth conditions, also regulate transcription of target genes, increasing the likelihood of cell survival. sRNAs can positively and negatively modulate transcription, translation and mRNA stability. Therefore, the role of sRNAs during biofilm development is very important, and to obtain a whole picture of this regulation, studies focusing on biofilm growth, maturation and dispersion will need to be extended

Keywords: Biofilm, sRNA, CsgD, Hfq.