

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**c-di-GMP BAĞLANMA PROTEİNİ BcsE REGÜLASYONUNUN FARKLI
SALMONELLA BİYOFİLM MORFOTİPLERİ ÜZERİNDEKİ VİRULANSLIK
ROLÜ**

Caner ÖZDEMİR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

c-di-GMP BAĞLANMA PROTEİNİ BcsE REGÜLASYONUNUN FARKLI SALMONELLA BİYOFİLM MORFOTİPLERİ ÜZERİNDEKİ VİRULANSLIK ROLÜ

Caner ÖZDEMİR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu tez çalışmasında *Salmonella* Typhimurium DMC4 ve *Salmonella* Group C1 (DMC2) suşlarında *bcsE* geninin ve bu genin kodladığı BcsE proteininin bakteri fizyolojisi ve patojenitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Doğal suşların *bcsE* geni bozulmuş mutantlarında polistiren yüzeylerde biyofilm ve sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumunun gerçekleşmediği saptanmıştır. Ayrıca doğal suşlardaki “rdar” biyofilm morfortipinin mutantlarda belirgin bir şekilde kaybolduğu gözlenmiştir. *bcsE* geni bakımından mutant suşlarda “swimming” ve “swarming” hareket, agar besiyeri yüzeylerinde, doğal suşlara oranla çok yüksek bir artış gösterirken, selüloz polisakkariti ve selüloz enzimi üretimi aynı oranlarda düşüş göstermiştir. *Salmonella bcsE* geni pET28 plazmid vektörü kullanılarak *Escherichia coli* BL21 suşuna klonlanmış ve bu suшта üretilen his-tag işaretli protein saflaştırılarak BALB/c farelerde poliklonal antikorlar elde edilmiştir. Söz konusu antikorlar BscE proteinine belirgin bir antijen spesifitesi gösterdiği Western blot yöntemi ile tanımlanmıştır. BALB/c farelerle yürütülen immünizasyon ve sistemik kalıcılık testleri sonucunda; BscE proteininin hümmoral (IgG1 ve IgG2a) yanıtları ve hüccresel tepkiyi yüksek düzeyde (Th1 sitokin üretimi, IgG2a/IgG1>1) tetiklediği ve *bcsE* geni bakımından mutant suşlarda karaciğer ve dalak örneklerindeki sistemik kalıcılığın sırasıyla % 99,99 ve % 100 oranında düştüğü tespit edilmiştir. HT-29 epitel hüccreleri ile yürütülen invazyon denemelerinde de doğal suşlarda % 24,6 ile % 26,2 oranında gerçekleşen invazyonun, bu suşların *bcsE* geni bakımından mutant suşlarında invazyon yeteneğinin tamamen ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu bulgular *bcsE* geninin *Salmonella* fizyolojisi, çevresel adaptasyonu ve patojenitesinde önemli bir rol üstlendiğine dair literatürdeki ilk bulgulardır.

Temmuz 2020, 114 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, *bcsE*, hareket, biyofilm, selüloz, invazyon, kalıcılık, patojenite

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE ROLE OF c-di-GMP BINDING PROTEIN BcsE REGULATION VIRULENCE ON DIFFERENT *SALMONELLA* BIOFILM MORPHOTYPES

Caner ÖZDEMİR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this thesis, the effects of *bcsE* gene and BcsE protein encoded by this gene on bacterial physiology and pathogenicity in *Salmonella* Typhimurium DMC4 and *Salmonella* Group C1 (DMC2) strains were investigated. It was found that biofilm formation on the polystyrene surfaces and pellicle formation in the liquid-air intermediate phase did not occur in the *bcsE* gene mutants of wild type strains. In addition, it was observed that the "rdr" biofilm morphotype in wild type strains disappeared significantly in the mutants. In terms of the *bcsE* gene, the "swimming" and "swarming" movement in the agar medium surfaces in mutant strains showed a very high increase compared to the natural strains, while cellulose polysaccharide and cellulase enzyme production decreased at the same rates. The *Salmonella bcsE* gene was cloned into *Escherichia coli* BL21 strain using the pET28 plasmid vector, and the his-tagged protein produced in this strain was purified to obtain polyclonal antibodies in BALB/c mice. The antibodies in question were identified by the Western blot method, in which it showed marked antigen specificity to the BscE protein. As a result of immunization and systemic persistence tests carried out with BALB/c mice; BscE protein was found to trigger high levels of humoral (IgG1 and IgG2a) responses and cellular response (Th1 cytokine production, IgG2a / IgG1 > 1), and systemic persistence in the liver and spleen samples decreased by 99,99% and 100% in mutant strains in terms of *bcsE* gene, respectively. In the invasion trials conducted with HT-29 epithelial cells, it was determined that the invasion that occurred in wild type strains between 24,6% and 26,2%, the invasion ability of their mutant strains in terms of *bcsE* gene completely disappeared. These findings are the first data in the literature that *bcsE* gene plays an important role in *Salmonella* physiology, environmental adaptation and pathogenicity.

July 2020, 114 pages

Key Words: *Salmonella*, *bcsE*, motion, biofilm, cellulose, invasion, persistence, pathogenicity

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, çalışmaların yürütülmesinde yardımını ve katkısını esirgemeyen, her zaman bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); araştırmalarım boyunca desteğini gördüğüm, fikirlerini aldığım Sayın Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü); çalışmalarım benden yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Erkan YILMAZ (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) ve ekibine; çalışmalarım için bana laboratuvarını açan, bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. İhsan GÜRSEL (Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı) ve ekibine; tezin başarıyla tamamlanabilmesi için görüş ve düşünceleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Sayın Prof. Dr. Emine Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); laboratuvar ortamında bana yardımcı ve destek olan arkadaşlarım Neslihan TAŞKALE KARATUĞ, Zeynep ERAN ve eşim Fatma Neslihan ÖZDEMİR'e; bu günlere gelmemde ellerinden gelen maddi ve manevi yardımı esirgemeyen babam Hür ÖZDEMİR, annem Semra ÖZDEMİR ve kardeşim Can ÖZDEMİR'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Caner ÖZDEMİR
Ankara, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
2.2 <i>Salmonella</i> Patojenezi	4
2.3 <i>Salmonella</i> Virulanslığının Moleküler Mekanizması ve Konakçı Direnci.....	5
2.4 Salmonelloz	6
2.5 Hayvan Modelleri ve Hastalığa Genel Bakış	6
2.5.1 Tifoid model.....	6
2.6 <i>S. Typhimurium</i> Virulans Determinatları.....	8
2.6.1 <i>Salmonella</i> patojenite adası 1 (SPI-1).....	8
2.6.2 <i>Salmonella</i> patojenite adası 2 (SPI-2).....	9
2.7 Biyofilmlerin Genel Özellikleri	10
2.7.1 Biyofilm oluşum aşamaları.....	11
2.7.2 <i>Salmonella</i> biyofilmleri	14
2.7.2.1 Kıvrımlı fimbriya	15
2.7.2.2 Selüloz	15
2.7.3 <i>Salmonella</i> 'da biyofilm oluşumu ile ilgili genlerin tanımlanması.....	17
2.7.4 <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin genetik regülasyonu	19
2.7.4.1 CsgD	19
2.7.4.2 RpoS ve Crl.....	20
2.7.4.3 c-di-GMP.....	22
2.7.4.4 BarA/SirA ve Csr sistemi	25
2.7.4.5 PhoPQ-RstA	26

2.7.4.6 Rcs sistemi.....	27
2.8 <i>Salmonella</i> Biyofilm Oluşumunun Genetik Regülasyonu ve Hareketlilik Arasındaki İlişki.....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal	30
3.1.1 Bakteriler	30
3.2 Yöntem	35
3.2.1 Kloramfenikol gen kaseti insersiyonu ile <i>bcsE</i> mutasyonlarının oluşturulması.....	35
3.2.1.1 <i>S. Typhimurium</i> DMC4 ve <i>S. Grup C1</i> DMC2 suşlarına pKD46 plazmidinin transformasyonu.....	37
3.2.1.2 Plazmid izolasyonu.....	37
3.2.1.3 Kompetent hücrelerin hazırlanması ve plazmid transformasyonu.....	38
3.2.1.4 Homolog bölgeleri içeren fonksiyonel kloramfenikol kasetinin eldesi.....	39
3.2.1.5 Homolog bölgeleri içeren fonksiyonel kloramfenikol kasetinin pKD46 plazmidi içeren <i>Salmonella</i> suşlarına transformasyonu	41
3.2.1.6 Koloni PZR ile gen mutasyonunun doğrulanması	41
3.2.2 <i>bcsE</i> mutantlarının fenotipik değerlendirilmesi.....	43
3.2.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde <i>bcsE</i> mutant suşlarının biyofilm morfolojilerinin belirlenmesi	43
3.2.2.2 Kalkoflor bağlanma uygulaması.....	44
3.2.2.3 Polistren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi	44
3.2.2.4 Pelikül oluşturma özelliklerinin belirlenmesi.....	45
3.2.2.5 Selüloz aktivitesinin belirlenmesi	46
3.2.2.6 Bakteriyel ‘Swimming’ (dağılma) ve ‘Swarming’ (toplanma) hareketlerinin belirlenmesi.....	46
3.2.3 BcsE proteinin klonlanması ve saflaştırılması.....	47
3.2.3.1 <i>bcsE</i> gen bölgesini içeren rekombinant plazmid eldesi.....	47
3.2.3.1.1 Genomik DNA izolasyonu	47
3.2.3.1.2 <i>bcsE</i> geninin PZR ile çoğaltılması.....	47
3.2.3.1.3 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi	49
3.2.3.1.4 DNA bağlanma reaksiyonu (Ligasyon).....	50
3.2.3.1.5 <i>E. coli</i> BL21 suşuna rekombinant plazmid transformasyonu.....	51
3.2.3.2 BcsE proteininin saflaştırılması	51
3.2.3.3 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	52
3.2.3.4 Western blot analizi	53

3.2.3.5 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	54
3.2.4 Poliklonal antikor eldesi	54
3.2.4.1 Anti BcsE IgG ELISA.....	55
3.2.4.2 Poliklonal antikor- antijen spesifitesinin incelenmesi.....	55
3.2.4.3 Akış sitometresi ile poliklonal antikor-bakteri spesifitesinin belirlenmesi..	56
3.2.5 BALB/c enfeksiyon modeli	56
3.2.6 İnsan Epitel Hücreleri İnvazyon Deneyi	57
3.3 İstatistiki Analizler.....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	58
4.1 Kloramfenikol Gen Kaseti İnsersiyonu ile <i>bcsE</i> Mutasyonlarının Oluşturulması.....	58
4.2 <i>bcsE</i> Mutantlarının Fenotipik Değerlendirilmesi	61
4.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde <i>bcsE</i> mutant suşlarının biyofilm morfolojilerinin belirlenmesi.....	61
4.2.2 Kalkoflor bağlanma uygulaması.....	61
4.2.3 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi	62
4.2.4 Pelikül oluşturma özelliklerinin değerlendirilmesi	63
4.2.5 Selüloz aktivitesinin değerlendirilmesi.....	65
4.2.6 Bakteriyel “Swimming” ve “Swarming” hareketlerinin belirlenmesi	66
4.3 BcsE Proteinin Saflaştırılması	67
4.3.1 <i>bcsE</i> gen bölgesini içeren rekombinant plazmid eldesi.....	67
4.4 Poliklonal antikor eldesi	73
4.4.1 Anti BcsE IgG ELISA yöntemi ile immunizasyonun tespiti	74
4.4.2 Poliklonal antikor-antijen spesifitesinin belirlenmesi	75
4.4.3 Akış sitometresi ile poliklonal antikor-bakteri spesifitesinin belirlenmesi.....	76
4.5 BALB/c Enfeksiyon Modeli.....	78
4.6 İnsan Epitel Hücre İnvazyonu	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ.....	113

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
bç	Baz çifti
g	Gram
kb	Kilobaz
kDA	kilodalton
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
V	Volt
α	Alfa
β	Beta
σ	Sigma

Kısaltmalar

Amp	Ampisilin
bdar	Kahverengi, kuru ve pürüzlü
BSA	Sığır serum albumin
CHL	Kloramfenikol
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DGCs	Diglukan siklaz
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent
FBS	Fetal sığır serumu
FLP	Flippaz

GMP	Guanozin monofosfat
GTP	Guanozin trifosfat
IgG	İmmunoglobulin
IL-8	İnterlökin-8
IMAC	Hareketsiz metal afinite kromotografisi
IPTG	İzopropil- β -D-tiogalaktopranozoid
iNTS	İnvazif tifoidal olmayan <i>Salmonella</i>
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen Fosfat
kob	Koloni Oluşturan Birim
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisakkarit
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
OD	Optik dansite
ODN	Oligodeoksinükleotid
PBS	Fosfatlanmış Tuz Tamponu
pdar	Pembe, kuru ve pürüzlü
PDEs	Fosfodiesteraz
pGpG	Fosfoguanil-guanozin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	Restiriksiyon endonükleaz
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
saw	Düz ve ıslak
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Th1	Yardımcı T Hücresi Tip 1
Trp	Triptofan
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Kloramfenikol gen kasetini barındıran pKD3 kalıp plazmidinin genetik haritası.....	36
Şekil 3.2 Red ifade vektörü pKD46 genetik haritası	37
Şekil 4.1 pKD3 ve pKD46 plazmidlerinin jel görüntüsü.....	58
Şekil 4.2 <i>Salmonella</i> suşlarında pKD46 plazmidinin varlığının tanısı	59
Şekil 4.3 <i>bcsE</i> mutasyon primeri kullanılarak elde edilen kloramfenikol kaseti.....	59
Şekil 4.4 <i>Salmonella</i> GrupC1 Δ DMC2 ve <i>Salmonella</i> Typhimurium Δ DMC4 hücreleri	60
Şekil 4.5 <i>bcsE</i> geninde mutasyon oluşturmak amacı ile tasarlanan kloramfenikol gen kaseti primerleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PZR sonrası elde edilen jel görüntüsü	60
Şekil 4.6 <i>S. Group C1</i> DMC2 ve <i>S. Typhimurium</i> DMC4 doğal tip suşlarının ve <i>bcsE</i> mutantlarının biyofilm yapılarının stereo mikroskop görüntüleri.....	61
Şekil 4.7 Doğal tip ve mutant DMC2 ve DMC4 suşlarının kalkoflor bağlanma denemeleri.....	62
Şekil 4.8 Doğal tip ve mutant <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm üretim kapasiteleri	63
Şekil 4.9 <i>S. Group C1</i> DMC2 doğal tip ve DMC2 Δ <i>bcsE</i> suşlarının 20 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı.....	64
Şekil 4.10 <i>S. Typhimurium</i> DMC4 doğal tip ve DMC4 Δ <i>bcsE</i> suşlarının 20 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı.....	64
Şekil 4.11 <i>S. Group C1</i> DMC2 doğal tip ve DMC2 Δ <i>bcsE</i> suşlarının 37 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı.....	64
Şekil 4.12 <i>S. Typhimurium</i> DMC4 doğal tip ve DMC4 Δ <i>bcsE</i> suşlarının 37 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı.....	65
Şekil 4.13 Doğal suş ve mutantların selülaz aktiviteleri.....	65
Şekil 4.14 Denemede kullanılan doğal suş ve mutantlarda “Swimming” hareketi.....	66
Şekil 4.15 Denemede kullanılan doğal suş ve mutantlarda “Swarming” hareketi.....	66
Şekil 4.16 <i>bcsE</i> genine özgü primerler ile gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	68
Şekil 4.17 pET28a plazmid vektörü ve <i>bcsE</i> geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ortamlarında elde edilen DNA örneklerinin agaroz gel görüntüsü.....	68

Şekil 4.18 <i>E. coli</i> BL21 ^{Rc} suşlarından izole edilen rekombinant plazmid jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.19 Rekombinant plazmid DNA'dan PZR ile çoğaltılan <i>bcsE</i> geni.....	69
Şekil 4.20 İndüklenen ve indüklenmeyen suşların protein profillerinin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.21 BcsE proteininin saflaştırma işleminden sonraki SDS-PAGE jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.22 Saf BcsE proteininin Western Blot görüntüsü.....	73
Şekil 4.23 BcsE ile aşılanmış farelerde IgG, IgG1, IgG2a titreleri.....	74
Şekil 4.24 IgG2a/IgG1 Oranı	75
Şekil 4.25 Poliklonal antikor spesifitesini gösteren Western blot analizi.....	76
Şekil 4.26 DMC2 ve $\Delta bcsE$ DMC2 bakterilerinin poliklonal antikor spesifitesi floresans yoğunlukları	77
Şekil 4.27 DMC4 ve $\Delta bcsE$ DMC4 bakterilerinin poliklonal antikor spesifitesi floresans yoğunlukları	77
Şekil 4.28 Doğal suş ve mutantların dalakta 1. ve 3. gündeki koloni sayımları	78
Şekil 4.29 Doğal suş ve mutantların karaciğerde 1. ve 3. gündeki koloni sayımları	79
Şekil 4.30 Doğal tip ve mutant suşların HT-29 hücre hattına invazyonu sonrası koloni sayım sonuçları	80
Şekil 4.31 Doğal tip ve mutant suşların HT-29 hücre hattına invazyonu sonrası koloni sayım sonuçları	80
Şekil 4.32 Hücre içi bakterilerin (DMC2) akış sitometresi ile belirlenmesi.....	81
Şekil 4.33 Hücre içi bakterilerin ($\Delta bcsE$ DMC2) akış sitometresi ile belirlenmesi	81
Şekil 4.34 Hücre içi bakterilerin (DMC4) akış sitometresi ile belirlenmesi.....	81
Şekil 4.35 Hücre içi bakterilerin ($\Delta bcsE$ DMC4) akış sitometresi ile belirlenmesi	82
Şekil 4.36 Hücre içi bakterilerin (DMC2 ve $\Delta bcsE$ DMC2) akış sitometresi belirlenen miktarları	82
Şekil 4.37 Hücre içi bakterilerin (DMC4 ve $\Delta bcsE$ DMC4) akış sitometresi belirlenen miktarları	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Red rekombinaz esaslı mutasyon çalışmalarında kullanılan plazmidler	36
Çizelge 3.2 Homolog bölge rekombinasyonu primerleri	39
Çizelge 3.3 “Touchdown” Polimeraz Zincir Reaksiyonu sıcaklık döngüsü	39
Çizelge 3.4 “Touchdown” Polimeraz Zincir Reaksiyonu içeriği	40
Çizelge 3.5 <i>DpnI</i> enzim kesim reaksiyonu içeriği (20 µL)	41
Çizelge 3.6 Primer dizileri	42
Çizelge 3.7 Koloni PZR sıcaklık döngüsü	42
Çizelge 3.8 Koloni PZR içeriği	42
Çizelge 3.9 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri	45
Çizelge 3.10 Primer dizileri	48
Çizelge 3.11 PZR içeriği	48
Çizelge 3.12 PZR koşulları	49
Çizelge 3.13 Reaksiyon karışımı	50
Çizelge 3.14 DNA bağlanma reaksiyonu karışımı	50
Çizelge 3.15 % 5 Yığma jel ve % 10 Ayırıcı jel içerikleri	53
Çizelge 4.1 “Swimming” ve “Swarming” hareket zon çapı ortalamaları	67

1. GİRİŞ

Tifoidal olmayan *Salmonella* serovaryeteleri, tüm dünyada bir yılda yaklaşık 100 milyon gıda kaynaklı vaka ile en yaygın patojen bakteri gruplarından birini teşkil etmektedir (Majowicz vd. 2010, Scallan vd. 2011). Tipik olarak, *Salmonella* kendi kendini sınırlayan (lök) gastroenterite neden olur. Ancak çok genç, yaşlı veya başka şekilde bağışıklığı baskılanmış hastalarda yaygın bir sistemik enfeksiyon, sepsis ve ölüme yol açabilmektedir. İnvazif tifoidal olmayan *Salmonella* (iNTS) olarak adlandırılan bazı *Salmonella* suşlarının, lokal gastroenteride değil sistemik salmonelloza neden olduğu belirlenmiştir. HIV ile enfekte yetişkinlerde ve Sahra altı Afrika'daki HIV veya Sıtma ile enfekte ve yetersiz beslenen çocuklarda bu suşlar ile gerçekleşen enfeksiyonlar çoğunlukla ölümle sonuçlanmaktadır (Feasey ve ark.2012).

Diğer yandan tifoid olmayan *Salmonella* suşları sağlıklı bireylerde sulu diyare, karın ağrısı, kusma, bulantı ve ateş semptomları ile kendi kendini sınırlayan (lök) gastroenterit olarak adlandırılan diyareye neden olur. Diyarenin şiddeti bireyden bireye değişkenlik göstermektedir. Örneğin; bazı hastalarda “kolera benzeri” ishal görülürken, bazı hastalarda kan ve mukus içeriği ile karakterize dışkı ile “dizanteri” benzeri bir durum ortaya çıkabilmektedir. Baş ağrısı, kas ağrısı ve ateş her iki durumda da yaygındır. Enfeksiyon etkeni *Salmonella* suşları genellikle invaziv olmasına rağmen, enfeksiyon genellikle bağırsak ile sınırlıdır (Boyd 1985, Lamps 2007). Bu veriler, tifoid olmayan *Salmonella* enfeksiyonunun, kript epiteline ve lamina propria'da nötrofil infiltrasyonu ile öncelikle koliti indüklediğini düşündürmektedir. Bu nedenle, akut kendi kendini sınırlayan enfeksiyöz kolit, salmonellozu tanımlamak için en doğru terim olarak düşünülmektedir (Lamps 2007).

Salmonella enfeksiyonu, dünya çapında endişe verici bir halk sağlığı sorunudur. Bunun yanında özellikle gıda endüstrisinde çok ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *Salmonella* suşlarının genetik yapısı; insan, hayvan ve hayvan olmayan konakçılar dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda adaptasyonlarına izin verecek bir elastisiteye sahiptir. Söz konusu adaptasyonun ve inatçı enfeksiyon yeteneğinin bu bakterilerdeki en tipik mekanizmalarından biri, biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma

kabiliyetleridir. Buna ilave olarak *Salmonella* patojenitesinin henüz tam anlamı ile çözümlenmemiş oluşu da, söz konusu bakterilerilerin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadeleyi güçleştiren bir diğer husustur.

Salmonella'nın patojenitesinde selüloz, biyofilm matriksinin ana yapısal bileşenlerinden biri olması yanında, birçok insan ve bitki patojeninde virülansın modülasyonunda da anahtar rol oynamaktadır (Spiers vd. 2003, Römling vd. 2013). *Salmonella*'da selüloz biyosentezinde rol alan iki farklı operon tanımlanmıştır (*bcsABZC* ve *bcsEFG*). Bu operonlarda yer alan ve selüloz sintaz enziminin katalitik alt ünitesini oluşturan *bcsA* geninin üzerinde yürütülen çalışmalarda, söz konusu genin inaktive edildiği mutantlarda katı yüzeylerde biyofilm ve sıvı ortamlarda pelikül oluşumunun düştüğü belirlenmiştir (Zogaj vd. 2001, Prigent-Combaret vd. 2012). Bir diğer operonda yer alan ve gen fonksiyonu yanında kodladığı protein üzerinde de çok az bilgi bulunan *bcsE* geni ürününün c-di-GMP bağlanma domaini içeren bir protein olduğunun literatür taraması sonucu belirlenmesi, bu tezin temel hipotezinin oluşturulmasına yol açmıştır. Zira c-di-GMP sinyal yolağının *Salmonella*'da global bir regülasyon ağında görev aldığı bilinmektedir. Bu nedenle bugüne kadar göz ardı edilen *bcsE* geninin *Salmonella* patojenitesinde ciddi roller oynayabileceği öngörülmüş ve bu öngörünün test edilmesi için; *bcsE* geni mutantlarında virülanslık ve patojenite ile ilişkili yapıların incelenmesini esas alan deneme deseni oluşturulmuştur. Özetle çalışmanın temel amacı, *Salmonella* patojenitesinde rol oynayan yeni moleküler elemanların tanımlanması suretiyle bu mekanizmanın çözümüne katkıda bulunmak ve dolayısı ile de *Salmonella* enfeksiyonları ile savaşmada güçlü potansiyele sahip yeni ajanları tanımlamak olarak belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella gıdalardan en sık izole edilen patojenlerden biridir. Dünya çapında büyük bir halk sağlığı sorunu oluşturan *Salmonella* özellikle geri kalmış ya da gelişmekte olan ülkelerde ölüm oranı yüksek salmonelloz vakaları ile kendini göstermektedir. *Salmonella* cinsinin 2500'den fazla serotipi tanımlanmıştır ve bunların yarıdan fazlası insanlarda enfeksiyona sebep olan *Salmonella enterica* türüne ait bulunmuştur. İnvazif serotiplerin neden olduğu *Salmonella* enfeksiyonları insan yaşamını tehdit etmekte; çoğu durumda uygun ve etkili antibiyotik tedavisi gerektirmektedir. Çoklu ilaç dirençliliğine (MDR) sahip olan *Salmonella* serotiplerinin prevalansındaki artış, *Salmonella* enfeksiyonlarında mortalitenin yükselmesine yol açmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda, MDR *Salmonella* serotipleri ile enfekte olmuş hastalar, duyarlı suşlarla enfekte olmuş hastalara kıyasla, daha uzun tedavi süreçleri geçirmektedir (Crump vd. 2004). Gastorenterit, en sık görülen *Salmonella* enfeksiyonudur. Bunu bakteriyemi ve enterik ateş izlemektedir (Majowicz vd. 2010).

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına dahil çubuk şeklinde, Gram negatif, fakültatif anaerob bir bakteridir (Barlow ve Hall 2002). İnsanlar dahil olmak üzere, birçok hayvan konağa uyum sağlama yeteneğine sahiptirler (Allerberger vd. 2003). *Salmonella* özellikle kümes hayvanlarında, yumurta ve süt ürünlerinde bulunur (Silva vd. 2011). *Salmonella* bulaşısında rol oynayan diğer gıda kaynakları arasında; taze meyve ve sebzeler de bulunmaktadır (Pui vd. 2011). Domuz, kümes hayvanları ve büyükbaş hayvanlar *Salmonella* enfeksiyonun başlıca kaynaklarıdır. Patojen bakterilerin ana bulaş kaynağı hayvan ticareti ve pişmemiş hayvansal ürünlerdir. Mezbahalardaki organların ve karkasların en önemli kontaminasyon kaynağı *Salmonella* olarak kabul edilmektedir (Gillespie vd. 2005).

Salmonella ilk olarak Theobald Smith tarafından 1855 yılında domuz bağırsağından izole edilmiştir. Bakteriyel suş, Smith ile birlikte çalışan Amerikan patolog Dr. Daniel

Elmer Salmon tarafından isimlendirilmiştir. *Salmonella*'nın isimlendirilmesi halen tartışmalıdır ve yeni öneriler doğrultusunda geliştirilmektedir. Günümüzde hastalık kontrol ve önleme merkezi (CDC) ve dünya sağlık örgütü (WHO) iş birliği ile önerilen isimlendirme sistemi kullanılmaktadır (Popoff vd. 2003). Bu sisteme göre *Salmonella* cinsi 16S rDNA sekans analizi farklılıklarına dayandırılarak *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki türe ayrılmakta ve *Salmonella enterica* genetik ve biyokimyasal özelliklerine göre altı alt tür altında sınıflandırılmaktadır. Bunlar: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* ve *S. indica*'dır. *S. enterica* çoğunlukla memelilerde bulunur ve % 99'u sıcak kanlı hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyona sebep olur. Diğer *Salmonella* alt türleri ve *S. bongori* çevresel sistemlerde, soğuk kanlı hayvanlarda ve nadiren de insanlarda görülür (Brenner vd. 2000).

Kauffman ve White *Salmonella* sınıflandırmasında, üç ana antijene [Somatik (O), Kapsüler (K), Flagellar (H)] dayalı bir şema geliştirmiştir (Brenner vd. 2000). Isıya dayanıklı somatik O antijeni, bakteriyel dış zarda bulunan lipopolisakkaritlere bağlı oligosakkarit bileşenidir. Bazı *Salmonella* serotiplerinin yüzeyinde birden fazla O antijeni ifade edilebilir (Hu ve Kopecko 2003). Isıya dayanıklı H antijenleri bakteriyel flagellada bulunur ve konağın immün yanıtının aktivasyonunda rol oynar. Birçok *Salmonella* serovaryetesi flagellar proteinleri kodlayan iki ayrı gen içerir. Ancak aynı anda sadece bir proteini ifade etme yeteneğine sahiptir ve bu sistemler difazik (Faz I-II) olarak adlandırılır. K yüzey antijenleri ise, kapsüler yüzeyde bulunan ısıya duyarlı polisakkaritlerdir. K antijeninin alt türü olan virulans (Vi) antijenleri, yalnızca Paratyphi C, Dublin ve Typhi serotiplerinde bulunur (McQuiston vd. 2008).

2.2 *Salmonella* Patojenezi

Salmonella enfeksiyonlarının etkinliği serotipe ve konağın sağlık durumuna bağlı olarak değişir. Enfeksiyona beş yaşın altındaki çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi baskılanmış insanlar, sağlıklı bireylere göre daha hassastır. *Salmonella*'nın fagositik olmayan konak hücreleri istila etme yeteneği, bu bakterilerin patojenezinde büyük önem taşır. Bu durumda konak hücreye girmek için fagositozu indükler (Hansen-Wester vd. 2002). *Salmonella* patojenite adaları (SPI), geniş kromozomal DNA bölgesinde yer alan

gen kümeleridir ve invazyon sürecinde rol alan mekanizmaları kodlamaktadır (Grassl ve Finlay 2008). *Salmonella* hücreleri, kontamine su ve gıda ile sindirim sistemine girdiklerinde, bağırsak duvarını kaplayan epitel hücelere penetre olurlar. SPI' de kodlanan Tip III salgı sistemi sitoplazmaya geçiş için çok kanallı protein yapılarını belirler. Bakteriyel efektörler transdüksiyon sinyal yollarını aktive ederek konak hücrelerde bulunan aktin hücre iskeletinin yeniden yapılandırılmasını uyarır. Böylece epitelyal hücre zarını tamamen çevrelerler (Takaya vd. 2003).

Salmonella suşlarının konak hücredeki kalıcılığı, patojenez açısından oldukça önemlidir (Bakowski vd. 2008). *Salmonella*, konak hücreye girmesi ile birlikte vakuol içerisine alınır. Normal koşullar altında bakterinin hücre içine girmesi, konak hücre immün yanıtını aktive eder. Lizozomların füzyonu ve sindirim enzimlerinin salgılanması ile hücre içindeki bakteriler parçalanırlar. Ancak *Salmonella* Tip III salgı sistemi sayesinde efektör proteinlerini vakuol içerisine sokarak, yapısının değişmesine sebep olur. Yenilenen vakuol ile lizozomların füzyonunu bloke eder ve hücrelerin konak içerisinde hayatta kalmasına ve çoğalmasına olanak sağlar (Monack vd. 2004).

2.3 *Salmonella* Virulanslığının Moleküler Mekanizması ve Konakçı Direnci

Salmonella türleri insan sağlığı için küresel bir tehdit olan tifo ve gastroenterite neden olmaktadır. *Salmonella*, enfeksiyon oluşturmak için çeşitli virulans faktörlerini kodlayan çok sayıda gene sahiptir. Sığırlar, kemirgenler, nematodlar dahil olmak üzere, farklı hayvan modellerinde her bir hastalığın altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamak için farklı enfeksiyon modelleri oluşturulmuştur. *Salmonella* patojenite adaları (SPI) 1 ve 2' de kodlanan iki Tip 3 Salgı Sistemi (T3SS) tarafından salgılanan bir dizi bakteriyel virulans faktör tanımlanmıştır. Bu proteinler enfeksiyon sırasında epitelyal hücelere invazyonu kolaylaştırmanın yanı sıra, fagositik hücreler içerisinde hayatta kalmayı ve çoğalmayı sağlayan konak hücre yollarını da teşvik eder (Valdez vd. 2009).

2.4 Salmonelloz

Salmonelloz, *Salmonella* türlerinin neden olduğu hastalıkların genel adıdır. *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* tifo ateşi etkenidir. Ateş, intestinal perforasyon ve kanama, mezenterik lenf nodlarının, dalak ve karaciğerin genişlemesi ile karakterize edilen sistemik bir hastalığa sebep olur (Parry vd. 2002). *S. Typhi* insan patojenidir ve diğer hayvanlarda hastalığa neden olmamaktadır. İnsanlar bu serovaryetenin ana kaynağı olup, içme suları ve gıdalar başlıca bulaş kaynaklarıdır (Monack vd. 2004).

S. Enteritidis ve *S. Typhimurium* gastroenterite veya gıda zehirlenmesine sebep olmaktadır. Hastalık; ishal, karın ağrısı, kusma, mide bulantısı ve ateş ile karakterizedir. Belirtiler tavuk yumurta gibi kontamine hayvan ürünlerinin tüketilmesinden sonra 6-72 saat aralığında ortaya çıkmaktadır (Zhang vd. 2003).

2.5 Hayvan Modelleri ve Hastalığa Genel Bakış

Hayvan modelleri, insanlarda salmonelloza yol açan karmaşık mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır (Santos vd. 2001, Zhang vd. 2003). Bu modeller hastalıkların sürecini ve sonuçlarını anlamakta hem bakteriyel virulans faktörlerini hem de konağın tepkisini tanımlamakta çok önemlidir. İki ana hastalık olan tifo ateşini ve gastroenteritidi incelemek için insan, maymun, inek, dana, tavşan, kemiriciler ve *Caenorhabditis elegans* gibi birçok model kullanılmıştır (Santos vd. 2001, Paulander vd. 2007, Alegado ve Tan 2008).

2.5.1 Tifoid model

İnsan tifo ateşinin patojenezini incelemek için, genetik olarak duyarlı fareler *S. Typhimurium* ile enfekte edilmiştir (Santos vd. 2001). *S. Typhi* kemirgenleri enfekte etmezken, *S. Typhimurium* doğal bir fare patojenidir. Farelerde *S. Typhimurium* enfeksiyonu ile ilgili patoloji insanlarda *S. Typhi* enfeksiyonu ile ilgili patolojiye oldukça benzerdir. Bu benzerlik peyer plaklarının genişlemesi ve ileal mukozanın kalınlaşmasını içerir (Parry vd. 2002). *S. Typhimurium* ile enfekte olmuş fare

makrofajlarının etrafında geniş granülomatoz lezyonlar karaciğer ve dalakta yaygın olarak görülür. *S. Typhi* ve *Typhimurium* farklı konakta farklı belirtilerle enfeksiyon oluşturabilir. Bu durum iki bakteri arasında patojenite genlerinin aynı olmadığını göstermektedir. Örneğin; *S. Typhimurium*'un bir kapsülü yoktur ve Vi antijeni *S. Typhi*'de önemli bir virulans faktördür (Valdez vd. 2009).

Kemirgenlerdeki tifo enfeksiyon modelinde gavaj uygulamasının ardından *S. Typhimurium* 3 mekanizma ile bağırsak bariyerini geçmektedir:

1. Peyer plaklarında bulunan ve bağırsak lümeni antijeni olarak bilinen M- hücrelerinin invazyonu,
2. Enterositlerin aktif invazyonu,
3. Sıkı buluşma (tight junction) proteinlerinin ifade edilmesi sonucu, bakteriyel hücrelerin, epitelyal hücreler arasından uzanan bağırsak dendritik hücreleri tarafından alınması (Vazquez-Torres vd. 1999, Rescigno vd. 2001, Sansonetti 2004, Niess vd. 2005).

Bakteriler, mukozal epitelyumu geçtikten sonra dendritik hücreler (DC), makrofajlar, B ve T hücrelerini içeren “bağırsakla ilişkili lenfoid doku” (GALT) hücreleri ile karşılaşır (Rumbo vd. 2004). *S. Typhimurium*'un bu hücreler ile teması konakta hastalığa sebep olan bir dizi etkileşimi başlatır (Rydstrom ve Wick 2007). *Salmonella* konak dolaşımında CD18 hücreleri içerisine girer (Vazquez-Torres vd. 1999). Ayrıca, makrofajlar, DC'ler veya diğer miyelomonositik hücreler ile karşılaşır. Fagositik hücreler içerisinde mezenterik lenf nodu (MLN), dalak ve karaciğere ulaşan bakteriler bu organlar içerisinde çoğalır. *S. Typhimurium* karaciğer ve dalakta fagositlerin granülomatoz merkezine yerleşir. *S. Typhimurium* fagositik ve fagositik olmayan hücreler içerisinde yaşamını sürdürebilir. Bu durum *in vivo* koşullarda yapılan çalışmalarda enfeksiyonun geç dönemlerinde makrofajlarda (Salcedo vd. 2001, Monack vd. 2004), DC'lerde (Yrlid vd. 2001), nötrofillerde (Cheminay vd. 2004, Geddes vd. 2004), B hücrelerinde, T hücrelerinde ve hepatositlerde (Conlan ve North 1992, Geddes vd. 2007) gözlemlenmiştir.

2.6 S. Typhimurium Virulans Determinatları

S. Typhimurium, konağı başarılı bir şekilde enfekte etmek için gerekli gen sistemlerine sahiptir. *Salmonella*'nın virulans özelliklerinin çoğu, *Salmonella* patojenite adaları (SPI) adı verilen bakteriyel kromozomun geniş bölgelerinde kodlanan genlerle doğrudan ilişkilidir. Patojenite adaları, virulans genleri taşıyan ayrı kromozomal bölgelerdir. Bunlar Gram negatif bakteriyel patojenlerin regülasyon ve sekresyon mekanizmaları ile birlikte virulans faktörlerini kodlar (Gal-Mor vd. 2006). Patojenite adalarının G+C içeriği, bakteriyel genomun geri kalanından oldukça farklıdır. Bu özellik yatay (lateral) evrimin bir göstergesidir. *S. Typhimurium* çok sayıda tanımlanmış SPI-1 ve SPI-2 gibi patojenite adalarına sahiptir. SPI-1 ve SPI-2 patojenite genlerindeki mutasyonlar konakta enfeksiyonunun indüklenme yeteneğini bozmaktadır (Hansen-Wester ve Hensel 2001).

2.6.1 *Salmonella* patojenite adası 1 (SPI-1)

SPI-1, *S. enterica* ve *S. bongori* türlerinin tüm serovaryetelerinde bulunmaktadır ve *Salmonella* enfeksiyonunun intestinal evresinde ya inflamatuvar diyare ya da sistemik enfeksiyona sebep olmaktadır (Darwin ve Miller 1999, Wallis ve Galyov 2000). Bu durum *Salmonella*'nın enterik patojen olduğu hipotezinin temelini oluşturmaktadır (Hensel 2004).

SPI-1; T3SS yapısal, efektör ve düzenleyici proteinleri kodlayan 40 kb'lik bir DNA bölgesinden oluşur (Wester ve Hensel 2001). SPI-1 tarafından kodlanan T3SS; hem SPI-1 ile kodlanmış bölge içinde, hem de bu bölgenin dışında efektör proteinlerin salgılanmasını kontrol etmek için entegre edilmiş çeşitli çevresel ve fizyolojik sinyallere yanıt verir (Altier 2005, Jones 2005, Ellermeier ve Slauch 2007). SPI-1 genlerinin çoğu bağırsak ortamına benzer koşullar altında ifade edilir ve *Salmonella* hücre içinde kolonize olduğunda baskılanır. SPI-1 bölgesinde kodlanan bu genler; HilA, HilC, HilD, InvF ve SprB olarak adlandırılan beş düzenleyici protein tarafından kontrol edilir (Darwin ve Miller 1999, Eichelberg ve Galan 1999, Rakeman vd. 1999, Schechter vd. 1999). Bu regülatörlerden HilA, patojenite adalarının regülasyonunda merkezi bir rol

oyunar. *hilA* delesyonu ile, tüm SPI-1 lokusundaki delesyonun fenotipik olarak benzer olduğu gösterilmiştir (Ellermeier vd. 2005). SPI-1 düzenleyicileri, SPI-2 genlerini de düzenleyebilmektedirler. Örneğin; *HilA*, *ssaH* promotoruna bağlanır ve bu promotorlardan transkripsiyonu baskılar (Thijs vd. 2007). *HilD* ise SPI-2 ana düzenleyicisi olan *ssrAB* operonunun promotoruna bağlanır ve gen ifadesini aktive eder (Bustamante vd. 2008). Katyon konsantrasyonu düşük olduğunda, PhoQ fosforilasyon yolu ile düzenleyici PhoP'ı aktive eder. Makrofajlarda katyon miktarı düşüktür ve hayatta kalmak için PhoP genlerinin aktivasyonu gereklidir (Alpuche Aranda vd. 1992). Ayrıca PhoP invazyon genlerini baskılamaktadır (Behlau ve Miller 1993, Pegues vd. 1995, Bajaj vd. 1996).

2.6.2 *Salmonella* patojenite adası 2 (SPI-2)

S. enterica'da bulunan SPI-2, *S. bongori*'de tanımlanmamıştır. Bu farklılığın, *Salmonella*'nın evrimsel açıdan sistemik ve hücre içi patojen olmasında kilit bir aşama olduğu düşünülmektedir (Hensel 2004). SPI-2 mutantlarında, fare tifoid modelinde virulansın ciddi şekilde düştüğü ve bu mutantların iç organlarda çoğalmadığı saptanmıştır (Hensel 2000). *Salmonella* içeren vakuollerin oluşturulamaması nedeniyle SPI-2 mutantlarının makrofajlar içerisinde hayatta kalma yeteneğinin azaldığı tanımlanmıştır (Hensel vd. 1998). Bu nedenle söz konusu vakuollerin *Salmonella*'nın hayatta kaldığı ve çoğaldığı eşsiz bir hücre içi niş olduğu kanısı neredeyse kesinlik kazanmıştır (Holden 2002). SPI-2, dentirik hücreler tarafından T hücrelerinin aktivasyonunu ve antijen oluşumunu inhibe eder. Böylece SPI-2 *Salmonella*'nın hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemi tarafından hücre içinde öldürülmesini engeller (Bueno vd. 2005, Cheminay vd. 2005, Tobar vd. 2006).

SPI-2 40 kb'lık iki ayrı bölgeden oluşur (Hensel vd. 1999). Büyük bölge T3SS, şaperonlar ve efektörler dahil olmak üzere ana virulans faktörlerini kodlar. *SsrAB*, SPI-2 genlerinin düzenlenmesinden sorumludur ve SPI-2 genlerinin yanında SPI-2 dışında bulunan T3SS efektörlerini kodlayan diğer genlerin ekspresyonunu aktive eden, SPI-2 içinde kodlanan tek transkripsiyonel regülatördür (Shea vd. 1996). PhoP/Q ve OmpR/Z

gibi regülatörler, SPI-2 genlerinin düzenlenmesinde rol oynar (Deiwick vd. 1999, Lee vd 2000).

Diğer SPI'ler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. SPI-3, *Salmonella* içeren vakuolde *Salmonella* sağ kalımı için önemli olduğu düşünülen yüksek afiniteli bir Mg^{+2} alım sistemini kodlanmaktadır (Blanc-Potard ve Groisman 1997). SPI-4, polarize hücrelerin apikal yüzeyine bakteri tutunması için önemli olan nonfimbriyal bir proteini kodlar (Wong vd. 1998, Gerlach vd. 2007). SPI-5; SPI-1 ve SPI-2 T3SS tarafından salgılanan efektör proteinleri kodlar (Hong ve Miller 1998, Wood vd. 1998, Knodler vd. 2002). SPI-6'nın fimbriyal operonları (Folkesson vd. 2002) ve SPI-9'un ise tip I salgı sistemini kodladığı belirlenmiştir (Hensel 2004). Çoklu ilaç dirençli *S. Typhimurium* suşlarında bulunan SGI-1 (*Salmonella* Genomik Ada I) adı verilen diğer bir ada; tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, streptomisin ve sülfonamidler gibi antibiyotik direnç genlerini kodlamaktadır (Boyd vd. 2001).

2.7 Biyofilmlerin Genel Özellikleri

Son yıllarda biyofilmlerle ilgili çalışmalar, çoğunlukla bu formların klinik enfeksiyonlara sebep olmalarından dolayı, büyük ivme kazanmıştır. Patojenik ve patojenik olmayan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve hayatta kalmak için genel bir mekanizma olarak kabul edilen biyofilm yapıları, bir matriks içinde kapsül oluşturan heterojen hücrelerin yüzeylere tutunması ve üremesi ile karakterize edilir. Matriks yapısı, hücre ortaklığının yalnızca lokal mikro-ortam stresinden sağ çıkmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda enfeksiyonların evrimleşmesini ve yayılmasını sağlayan bir topluluk davranışına sahip ekolojik bir niş oluşturur (Kumar vd. 2017).

Mikroorganizmaların birçoğu; üremenin düzenlenmesi, popülasyondaki heterojenite, proteolitik sistemler gibi stres koşullarına adaptasyon için farklı hayatta kalma mekanizmaları geliştirir. Patojen mikroorganizmalar konağın immün yanıtına karşı yaşamını sürdürebilme kabiliyetine sahiptirler. Biyofilmler; esas olarak proteinler, polisakkaritler ve DNA içeren polimerik matriks içerisinde yüzey ilişkili mikroorganizmaların oluşturduğu heterojen yapılardır. Bakteriyel savunma

mekanizması, kolonizasyon için uygun alan ve toplu yaşam sonucu oluşan iş birliği gibi faktörler biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır (Jefferson 2004). Biyofilm matriksi, ilaçlara karşı fiziksel bir bariyer görevi görür ve mikroorganizmaların hayatta kalması için koruyucu ekolojik bir niş sağlar. Biyofilmler tek bir bakteri türü veya birçok bakteri türünün oluşturduğu mikrobiyal bir konsorsiyumdur. *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis* gibi birçok mikroorganizma türü biyofilm ile ilişkili hastalıklara sebep olarak, ciddi sağlık sorunları yaratmaktadır (Kumar vd. 2017).

Hastane enfeksiyonlarının % 80'ine biyofilmler sebep olmaktadır (Davies 2003). *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* gibi hastane enfeksiyonlarında oldukça sık karşılaşılan bakterilerin biyofilm yapıları, planktonik formlarına kıyasla, antibiyotiklere 10-1000 kat daha dirençlidir. Patojenik bakterilerin % 80'i ortodontal protezler, kontak lensler, kardiyovasküler valfler, kalp pilleri, kataterler ve göğüs implantları aracılığı ile ortaya çıkan enfeksiyonlardan sorumludurlar (Scott 2009). Bakteriler, biyofilm oluşumunu kolaylaştırmak ve sürdürülebilirliğini sağlamak amacıyla ortamın pH'sını düzenleyebilmektedir. *Klebsiella* ve *Pseudomonas* cinsleri idrar sondalarında biyofilm oluşturmak için idrarın alkalinitesini arttırmaktadır. Biyofilm yapıları kataterden ayrıldıklarında, idrar kesesinde doku hasarına neden olan ikincil komplikasyonlar oluşturmaktadır (Neethirajan vd. 2014).

2.7.1 Biyofilm oluşum aşamaları

Bakteriyel biyofilmler; biyotik yüzeylerde olduğu gibi abiyotik yüzeylerde de oluşmaktadır. Biyofilm yapısının oluşumunun ilk aşamaları; genel olarak geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz tutunma süreçlerini içermektedir. Bundan sonraki aşamalar; sesil büyüme, kolonizasyon ve dağılma evrelerinden meydana gelir. Polisakkaritler, glikopeptidolipitler, proteinler ve yağ asitlerinden oluşan hücre dışı matriks üretimini mümkün kılan biyofilm oluşumunun her aşamasında, benzersiz gen dizileri ifade edilir. Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında bakteriler yüzeye geri dönüşümlü bir şekilde agregasyon başlar ve bu durumda iken planktonik forma geri dönebilirler. Abiyotik yüzeylerdeki biyofilm oluşumu substrat ve bakteri arasındaki

elektrostatik etkileşimler, yüzey topografyası, bakteriyel pili ve adezinlerin varlığı ile gerçekleşmektedir. Substratla olan elektrostatik etkileşimler, ortamın viskozitesinden ve kemotaktik moleküllerin varlığından veya yokluğundan kaynaklanan hidrodinamik kuvvetlerden etkilenir. Üropatojenik *E. coli*'nin 43 antijeni abiyotik yüzeylere tutunmaya ve aynı tür bakteriler arasındaki iletişime aracılık eder (Ulett vd. 2007). *P. aeruginosa* CheR1 metiltransferaz mutant suşları yüzeye tutunma ve biyofilm olgunlaşması için gerekli kemotaktik amino asitleri sentezleyememektedir (Schmidt vd. 2011). Flagellalı bakteriler; hidrodinamik stres ile karşılaştıklarında biyofilm oluşturma avantajına sahiptir. Biyotik yüzeylerde bakterilerin konağa tutunması büyük ölçüde hücre dışı proteinlerin veya karbonhidratların hücre veya doku yüzeylerindeki etkileşimine bağlıdır. Burada hücre zarının tutunma etkinliği, hidrofobisitesinden önemli miktarda etkilenmektedir. *P. aeruginosa* tip IV pili, bakteriyel harekete ve tutunmaya yardımcı olur (Klausen vd. 2003). *Enterococcus* sp. de Sag adezyon molekülü ökaryotik hücrelerde kollojene bağlanarak biyofilm oluşumuna yol açar (Mohamed vd. 2006). *S. epidermidis* ve *S. aureus*; fibronektin, fibrinojen ve insan matriks proteinlerine kovalent olmayan bir şekilde bağlanarak adezif matriks proteinlerini tanıyan mikrobiyal yüzey moleküllerini ifade eder (Fey ve Olson 2010). Yüzeyle temas sonucu oto-indükleyici sinyaller sesil koloni oluşumu için gerekli faktörlerin pozitif yönde düzenlenmesine yol açan gen ifadesinin değişimini başlatır. PrfA ve SinR gibi ana regülatörler sırasıya *L. monocytogenes* ve *B. subtilis* biyofilmlerinde yeniden programlanan genetik mekanizmalar hakkında fikir vermiştir (Luo vd. 2013, Luo vd. 2013, Newman vd. 2013). *Mycobacterium smegmatis*'in substrata bağlanması, GroEL-1 gibi şaperon proteinlerin aktivitesine bağlı aljinat, glikopeptidolipid ve küçük zincirli mikolik asitlerin sentezini indüklemektedir (Davies vd. 1993, Recht ve Kolter 2001). Hidrofobik olan mikolik asitler, fibronektin, fibrinojen, kollajen IV ve benzeri konakçı hücre proteinleri ile kovalent olmayan bağlanmalara olanak sağlar (Pang vd. 2012). Bakteriyel niş oluşumu besinlerin kullanılabilirliğine, pH, iyon varlığına ve sıcaklığa bağlıdır. Bakteriler yüzeye tutunduğunda, aynı veya farklı türde bakteriler mikrokoloniler oluşturmak için birbirlerine tutunma işlemi başlatır. Bu tutunma işlemi geri dönüşümsüzdür. Kolonizasyonları ve olgunlaşmaları ile birlikte hidrodinamik stres faktörlerinin üstesinden gelebilirler. Bu süreçte bakterilerin hareketliliği azalır ve besinleri

yakalamaya yardımcı olan hücre dışı polisakkaritler salgılanır. Tek bir hücrenin hücre grubuna geçişi, üremeyi koordine etmek ve verimliliği en üst düzeye çıkarmak için, iç iletişim kurma ihtiyacını ortaya çıkarır. Bakterilerin çoğalması “quorum sensing” (yeter sayı algılama) sisteminin elemanlarından olan c-di-GMP gibi sinyal peptit molekülleri tarafından koordine edilir. Örneğin; yeter sayı algılama, *Vibrio cholerae* virulansı için gerekli olan 10^7 hücre/cm² hücre yoğunluğunu korumaya yardımcı olur (Deep vd. 2011). Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde yeter sayı algılama, ağırlıklı olarak küçük peptitler ve asil-homoserin laktonlar aracılığıyla gerçekleşir (Taga ve Bassler 2003).

Üropatojenik *E. coli* ile yapılan çalışmalar selüloz ve kıvrımlı fimbriya ifadesinin pelikül oluşumu için gerekli olduğunu kanıtlamıştır. (Cegelski vd. 2009). *P. aeruginosa*’nın sebep olduğu kistik fibroz hastalarında indüklenen Pel proteini, epitel yüzeylere tutunmada önemli rol oynamaktadır. Koloni oluşumu aşamasında, Psl ve CdrA adezinleri matriks bileşenlerini güçlendiren ve pelikül oluşumunu stabilize eden c-di-GMP, yüksek seviyeli sinyal moleküllerine cevap olarak düzenlenir (Ma vd. 2006, Borlee vd. 2010). Hareketlilik lipopolisakarit sentezi ve hücre yüzeyi ile ilişkili bazı proteinlerin üretimi bakterilerde biyofilm oluşumunda rol oynar (Cucarella vd. 2001, Niba vd. 2007, Geoghegan vd. 2010).

Bakterilerin kolonizasyonu, yalnızca yapısal stabiliteye yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda substrat değişimini ve besinlerin dağılımını da arttıran ekzopolisakaritlerin, proteinlerin, hücre dışı DNA’nın (eDNA) salgılanmasına neden olur. Matriks yapısının bileşenleri, biyofilm oluşumunda yer alan bakteri türlerine göre değişir. Biyofilm proteinlerini kodlayan plazmidlerdeki genler, yatay olarak transfer edilir ve virulans faktörlerinin yayılmasına yardımcı olur. Besin bulunabilirliği, biyofilmin şekli ve boyutunda önemli bir faktördür. Besin ve oksijenin dışardan iç çekirdeğe doğru kademeli azalışı, hücrelerin metabolik aktivitesinde ve biyolojik çeşitlilikte farklılaşmalara neden olur. Dış hücre tabakası, iç çekirdeğe kıyasla daha hızlı büyür. Böyle bir ortamda açlıktan ölmek üzere olan hücreler statik büyüme sağlar ve dolayısıyla sayıları azalır. Bu tür dormant hücreler, antibiyotik toleransı sağlar ve kronik biyofilm enfeksiyonlarında bu durumun tespit edilmesi zordur. İmipenem veya

tobramisin antibiyotiklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK); *P. aeruginosa*'da aljinat üretimini indükleyebilir (Bagge vd. 2004). Biyofilm oluşumunun en önemli özelliği, hücreler arasında daha fazla koordinasyon sağlanmasıdır. *C. albicans* biyofilminin dış katmanındaki hücreler, glikoliz, kolesterol ve hücre duvarı için gereken proteinlerin sentezi ile ilişkili genleri ifade ederken, iç çekirdekteki hücreler, kükürt metabolizması veya hücre duvarının degradasyonu için gerekli enzimler ile bağlantılı genleri ifade eder (Kumar vd. 2017).

Biyofilmin son aşaması, tek veya kümelenmiş hücrelerin yayılması ile karakterize edilen biyofilm yapılarının dağılması aşamasıdır. Bakterinin biyofilmden ayrılması pasif bir işlem değildir, aksine spesifik hücrelerin salınmasına yol açan yüksek oranda düzenlenen bir olaydır. Biyofilmlerin iç çekirdeği boyunca hücreler dağılmalarından önce lize olmaktadır. Bu parçalanmış hücreler, daha sonraki bir aşamada diğer bakterilere besin kaynağı teşkil eder. Dispersiyon geçiren hücreler, ekzopolisakaritleri veya fimbriyaları kodlayan genleri kapatırken, planktonik yaşam tarzı için gereken kemotaktik proteinleri veya flagella'yı kodlayan genleri aynı anda aktive eder (Rollet vd. 2009).

2.7.2 *Salmonella* biyofilmleri

Salmonella, doğal çevrede bitki yüzeylerinde (Barak vd. 2007) biyofilm oluşturmalarının yanı sıra plastik, cam, metal gibi abiyotik yüzeylerde de biyofilm oluşturma kabiliyetine sahiptir (Hood ve Zottola 1997, Momba ve Kaleni 2002, Brandl 2006). *Salmonella* laboratuvar koşullarında safra kesesi taşları yüzeyinde kolonize olabilmekte ve hücre dışı matriks yapısı, konfokal mikroskopla doğrudan görüntülenebilmektedir (Marshall vd. 2014). Ayrıca *Salmonella*, sürekli akış sistemine sahip kültür koşullarında tavuk bağırsak epiteli (Ledeboer ve Jones 2005) ve Hep-2 hücreleri üzerinde biyofilm oluşturma kabiliyetine sahiptir (Boddicker vd. 2002).

Salmonella biyofilmlerinin hücre dışı polimerik matriksi büyük ölçüde kıvrımlı fimbriya, selüloz (Gerstel ve Römling 2003, Römling 2005), biyofilm ilişkili protein

(Bap) (Latasa vd. 2005), O-antijen kapsülü ve hücre dışı DNA'dan (Johnson vd. 2013, Wang vd. 2014) oluşmaktadır.

2.7.2.1 Kıvrımlı fimbriya

Biyofilm ile ilişkili genlerin ifadesi, serovarlara özgü farklanmalar ve temas yüzeyi ile kolerasyon göstermektedir (Römling vd. 1998). Yüzey tutunması, hücre agregasyonu ve biyofilm oluşumunda rol alan kıvrımlı fimbriya, ilk olarak *E. coli* suşlarının sebep olduğu sığır mastitinde 1980'nin sonlarında keşfedilmiştir. Kıvrımlı fimbriya, konak hücre adezyonunda ve invazyonunda rol almaktadır. Ayrıca konağın enflamatuvar yanıtının güçlü bir indükleyicisidir (Barnhart ve Chapman 2006). Kıvrımlı fimbriya divergent olarak transkribe olan *csgBAC* ve *csgDEFG* operonları tarafından kodlanır (Collinson vd. 1996, Römling vd. 1998). *csgBAC* operonu ana yapısal alt ünitesi CsgA, yüzey nükleatör protein CsgB'yi kodlar. Diğer bir gen olan *csgC* transkribe olamamakla birlikte, kıvrımlı fimbriya biyosentezinde rol almaktadır (Collinson vd. 1996). *S. Enteritidis* ile yapılan bir çalışmada CsgC ve CsgE'nin birlikte hücre dışı kıvrımlı fimbriya sentezine olanak sağladığı belirtilmiştir (Gibson vd. 2007). *csgDEFG* operonları kıvrımlı fimbriya üretimi için yardımcı proteinleri kodlamaktadır. *csgD* LuxR ailesine dahil transkripsiyonel düzenleyicilerini kodlar (Gerstel ve Römling 2003). Giaouris vd. (2013) paslanmaz çelik yüzeylerde *S. Enteritidis* planktonik hücreleri ile biyofilm yapılarını karşılaştırmış ve CsgF proteininin biyofilm oluşumunda rol aldığını gözlemlemişlerdir. *Salmonella*'da *csgF* ve *csgG* genlerinin kıvrımlı fimbriya sentezindeki işlevi henüz aydınlatılmamıştır.

2.7.2.2 Selüloz

Selüloz, *Salmonella* biyofilmlerinde sentezlenen ve β (1 $\rightarrow$ 4) bağlı D-glukoz ünitelerinden oluşan önemli bir polisakkarittir. Kıvrımlı fimbriya ve selüloz biyofilm matriksinin hidrofobik ve sıkı paketlenmiş bir yapıda olmasını sağlamaktadır. *bcsABZC* ve *bcsEFG* operonları selüloz biyosentezinde rol almaktadır (Solano vd. 2002).

Selüloz biyosentezinin biyolojik rolü oldukça önemlidir. Bakterilerde selüloz, hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimini sağlayan ve klor uygulamalarından koruyan temel

yapısal bileşenlerden biridir (Solano vd. 2002, Zogaj vd. 2003, Grantcharova vd. 2010). Selüloz *S. Typhimurium*'da “rdar” biyofilm yapısının temel bileşenidir. Ana biyofilm aktivatörü olan CsgD baskın “rdar” morfortipinde amiloid kıvrımlı fimbriya ve selüloz üretimini pozitif yönde düzenler (Simm vd. 2014).

Selüloz biyosentezinin regülasyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Selüloz biyosentez operonunun yapısal olarak transkribe edildiği ortak bir görüştür (Saxena vd. 1995). *Enterobacteriace*'de selüloz biyosentezi *bcsABZC* operonu tarafından düzenlenir. *bcsA*, selüloz sentazın katalitik alt birimi olan ve substrat UDP-glikozu bağlayan sitoplazmik beta-glikozil transferaz 2'yi kodlar (Morgan vd. 2014). Katalitik aktivite için BcsB gereklidir ve *bcsA* ile tutarlı bir şekilde lokalize olur. Bu durum bazı suşlarda BcsAB füzyon proteinini oluşturur (Saxena vd. 1994, Morgan vd. 2013). BcsC'nin dış membran poru oluşturduğu varsayılmaktadır. BcsE optimal selüloz biyosentezi için gereklidir (Fang vd. 2014). BcsZ ise, bakterilerdeki selüloz biyosentezinde biyolojik işlevi aydınlatılmamış, glikozid hidrolaz ailesinin bir selülazını kodlar (Mazur ve Zimmer 2011).

Selüloz biyosentezi, CsgD tarafından pozitif yönde düzenlenir. AdrA, post transkripsiyonel düzeyde selüloz üretimini aktive eder. Bu aktivasyon *bcs* operonları ile doğrudan veya c-di-GMP ile dolaylı etkileşim sonucu sağlanır (Garcia vd. 2004, Römling 2005, Simm vd. 2005).

BapA, tip-I protein salgılama sistemi tarafından salgılanan, biyofilm oluşumunda gerekli büyük bir hücre yüzey proteindir. *bapA*, kıvrımlı fimbriya ve selüloz kodlayan genlerle koordineli bir şekilde ifade olur (Latasa vd. 2005, Latasa vd. 2006). *bapA* *Salmonella*'da oldukça korunmuş bir gendir (Biswas 2011).

Salmonella biyofilmlerinin diğer bir önemli hücre dışı matriks bileşeni O-Antijen kapsülüdür. *yihU-yshA* ve *yihVW* operonları, kapsülün translokasyonundan sorumludur ve bu operonlar CsgD tarafından düzenlenir (Anriany vd. 2001). O-Antijen kapsül çok hücreli davranış modelinde çok önemli görülmesine de tutunma ve çevresel streslere dirençte oldukça kritik role sahiptir (Barak vd. 2007). Bu genel kanıya rağmen *S.*

Typhimurium ve S. Typhi'de *csgD*'ye bağı olarak regüle edilen O-Antijen kapsülünün biyofilm oluşumu için zorunlu bir eleman olduğu tespit edilmiştir (Crawford vd. 2008).

2.7.3 *Salmonella*'da biyofilm oluşumu ile ilgili genlerin tanımlanması

Biyofilm oluşumu ile ilgili genlerin en yaygın olanları adhezinlerdir. *Salmonella* biyofilmlerinde en iyi karakterize edilen fimbriya tip-I fimbriyadır. Tip-I fimbriya, *fim* gen kümesi tarafından kodlanır ve şaperonlar tarafından düzenlenir (Hultgren vd. 1991). *fimA* geni büyük yapısal alt üniteyi kodlarken, *fimH* geni fimbriyal yapının ucunda bulunan ve reseptöre bağlanmaya aracılık eden adezin proteinini kodlar. FimH adezini, HEp-2 doku kültürü hücreleri, murin ve tavuk bağırsak epitelı üzerinde biyofilm oluşumunda rol oynar (Boddicker vd. 2002, Ledeböer ve Jones 2005). Uzun polar fimbriya (Lpf) *lpfABCDE* tarafından kodlanır ve murin bağırsak mukozası kolonizasyonunda rol alır (Baumler vd. 1996, Baumler vd. 2011). Plazmid kodlu fimbriyalar (Pef) *pefBCD*, *orf5* ve *orf6* genleri tarafından kodlanır. Lpf ve Pef, biyofilm oluşumunun erken aşamasına katkıda bulunur (Ledeböer vd. 2006). S. Enteritidis SEF14 (SefA), SEF17 (CsgA), SEF18 (SefD) ve SEF21 (tip-I, FimA) olmak üzere adezyonu sağlayan farklı fimbriyalar üretir. Bu fimbriyaların her birinin biyofilm oluşumunda rolü farklıdır. *csgA* tarafından kodlanan SEF17 biyofilm oluşum aşamalarında hücre-hücre etkileşimini stabilize ederken, SEF21 hücre yüzeyine tutunmayı sağlar (Austin vd. 1998). SadA, S. Typhimurium'un trimerik ototransporter adezinidir. SadA ifadesi hücre agregasyonu, biyofilm oluşumu ve insan bağırsak Caco-2 epitel hücrelerine adezyonu sağlar (Raghunathan vd. 2011).

Biyofilmler sıvı-hava, katı-sıvı, hücre-sıvı ara yüzlerde flagella varlığında ve yokluğunda farklı morfolojiler sergileyebilirler. Flagella ve kıvrımlı fimbriyanın çok hücreli morfotipe katkısı baskındır. Kim ve Wei (2009) tarafından yürütölen bir çalışmada *flgK* mutant suşlarının doğal tip suşlara kıyasla cam yüzeyler üzerinde çok düşük miktarda biyofilm oluşturabildiklerini belirlemiştir. Bu çalışma flagella ifadesinin biyofilm oluşumunda ve temas yüzeyine tutunmadaki önemini göstermektedir (Kim ve Wei 2009).

Patojenite adaları, belirli bir virulans fenotipine katkıda bulunan geniş gen kümeleri barındırır. *Salmonella* en az yedi *Salmonella* patojenite adasına sahiptir. Bunlar arasında SPI-1 öncelikle konak hücrede bakteri motilitesi ve invazyonu için gereklidir. SPI-1 klonu içeren *S. Typhimurium* kültürlerinde biyofilm tutunması ve kümelenmesi gözlemlenmiştir. İlk çalışmalarda bu fenotip SPI-1 tip-III sekresyon fonksiyonlarının ifadesi ile ilişkilendirilmiş, ancak daha sonra yürütülen araştırmalarda bu ilişkinin varlığı kanıtlanamamıştır (Jennings vd. 2012). Isıya maruz bırakılmış *Salmonella* biyofilmlerinde flagella ve SPI-1 genlerinin transkripsiyonu azalırken konak hücrede bakteriyel hayatta kalma ve SPI-2 genlerinin transkripsiyonunda artış saptanmıştır (Ban vd. 2015). Buna karşılık *S. Typhimurium* biyofilmleri, planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında, yüksek oranda baskılanan genler SPI-2 üzerindeki genler olmaktadır. Fonksiyonel SPI-2 salgılama sistem regülatörünün (*ssrA*) biyofilm oluşumunda işlev gördüğü belirlenmiştir. Triptofan (Trp) biyosentezi ve taşınmasına dahil olan genler, biyofilm oluşumunda pozitif regülasyona tabi tutulmaktadır. *trpE* delesyonu bakteriyel tutunmayı ve biyofilm oluşumunu azaltmaktadır, bu da aromatik amino asitlerin biyofilm oluşuma önemli bir katkı sağladığını göstermektedir (Hamilton vd. 2009). *Salmonella aro* mutantları evcil hayvanların oral yolla aşılmasında oldukça sık kullanılmaktadır. Bu mutantlar aromatik amino asitlerin sentezinde anahtar ara ürün olan korizmat sentezleme yeteneğine sahip değildirler. *aro* mutantlarında selüloz, N-asetil-D-glukozamin, N-asetil-nöraminik asit üretimi azalır (Malcova vd. 2009).

Salmonella biyofilm oluşumunda lipopolisakkarit (LPS) sentezi bir diğer kritik aşamadır. *ddhC* ve *waaG* genlerindeki Tn5 insersiyon mutasyonu, düz kenarlı koloni oluşumuna yol açmaktadır. Her iki mutantın da düşük ozmolariteye sahip zengin besiyeri ortamında geliştirildiğinde, biyofilm oluşturmadığı belirlenmiştir. Ancak besiyeri ortamına glikoz ve NaCl kombinasyonu ilave edildiğinde, biyofilm üretiminin arttığı gözlemlenmiştir (Anriany vd. 2006). *rfaA* geni LPS biyosentezinde görev almaktadır. *rfaA* mutant suşlarının paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde düşük oranlarda biyofilm oluşturabildiği saptanmıştır (Kim ve Wei 2009). Transpozon mutasyonu ile fonksiyonları araştırılan *metE*, *ompR*, *rpoS*, *rfaG*, *rfaJ*, *rfaK*, *rfaP*, *rfaH*, *rhIE*, *spiA* ve *steB* genlerinin, *S. Enteritidis*'de biyofilm oluşumuyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Dong vd. 2008, Dong vd. 2011).

2.7.4 *Salmonella* biyofilmlerinin genetik regülasyonu

2.7.4.1 CsgD

Salmonella biyofilmlerindeki ana kontrol ünitesi olan CsgD, biyofilm yapılarının matriksinde yer alan özgül bileşenlerin sentezinin transkripsiyonel regülatördür (Gerstel ve Römling 2003). CsgD'nin N-terminal domaininde korunmuş bir aspartat (D59) rezidüsü bulunmaktadır. C-terminal kısmında ise LuxR- benzeri sarmal-dönüş-sarmal (helix-turn-helix) motifi içeren ve FixJ/NarL protein ailesine dâhil DNA bağlanma proteini yer alır. *csgD*; *csgBAC* ve *csgDEFG* operonlarından oluşan divergent bir sistemdir. Fosforile edilmemiş CsgD, doğrudan *csgB*'nin promotor bölgesine bağlanır ve transkripsiyonel olarak kıvrımlı fimbriya sentezini aktive eder (Römling vd. 1998, Zakikhany vd. 2010). CsgD ayrıca, *adrA*'nın üst kısmındaki promotor bölgeye doğrudan bağlanarak, diguanil siklaz AdrA'nın ifadesini pozitif olarak kontrol eder (Römling vd. 2000, Zakikhany vd. 2010). AdrA, selüloz sintaz BcsA'nın bir allosterik aktivatörü olan ikincil haberci sinyal molekülü (3'-5') -siklik diguanozin monofosfatın (c-di-GMP) (Simm vd. 2004) üretilmesiyle selüloz sentezini pozitif olarak düzenler (Ross vd. 1987, Ryjenkov vd. 2006, Morgan vd. 2013).

bapA'nın ifadesi, aynı şekilde yine CsgD tarafından regüle edilmektedir (Latasa vd. 2005). *bapA* promotor bölgesi, *adrA* promotor bölgesine benzer bir bağlanma bölgesi ihtiva etmektedir (Latasa vd. 2006).

Bir hücre dışı polimerik maddeden meydana gelen ve üretimi ve translokasyonu divergent iki operon olan *yihU-yshA* ve *yihVW* tarafından gerçekleştirilen *S. Enteritidis* O-Ag-kapsülünün regülasyonu, CsgD tarafından gerçekleştirilir (White vd. 2003, Gibson vd. 2006). Yih operonlarının diferansiyel regülasyonu, *yihU* geninin aktivasyonuna öncülük eden ve transkripsiyonel bir baskılayıcı olan YihW'nin, CsgD tarafından baskılanmasıyla gerçekleştirilir (Gibson vd. 2006). Ancak kapsül senteziyle ilişkili operondaki *bapA* geninin *S. Typhimurium*'da CsgD tarafından nasıl regüle edildiği henüz netleşmemiştir (Zakikhany vd. 2010). Ayrıca ortamda safra tuzunun bulunması durumunda O-Ag kapsül operonun CsgD'den de bağımsız şekilde regüle

olabildiği gerçeği, bu operonun alternatif bir regülasyon mekanizmasıyla da ilişkili olabileceğini göstermektedir (Crawford vd. 2008).

37°C'de üretilen *S. Typhimurium* suşlarından bu kapsülün izole edilebilmesi; bu sıcaklıkta düşük düzeyde ifade olan CsgD pozitif transkripsiyonel regülatöründen bağımsız olarak kapsül operonunun alternatif bir regülasyon sistemiyle de regüle olabildiğini gösteren bir diğer bulgudur (de Rezende vd. 2005).

CsgD, *Salmonella* biyofilmlerindeki önemli yapısal bileşenlerin ifadelerinin düzenlenmesindeki ana regülatördür ve bu regülatör planktonik ve çok hücreli yaşam modları arasındaki geçişi kontrol eden esas bileşendir (Gerstel ve Römling 2003). CsgD'nin ifadesinin farklı çevresel uyarılarla (sıcaklık, oksijen konsantrasyonu, besinsel bileşenlerin varlığı, besinsel sınırlama, ozmolarite, etanol, demir ve pH), farklı transkripsiyonel regülatörlerle (OmpR, Crl, RpoS, MlrA, CpxR, H-NS ve IHF) ve ikincil bir bakteriyel mesajcı olan c-di-GMP tarafından düzenlenmesi sürpriz bir sonuç değildir. Bu kompleks regülasyon, regülatör ağı iyi bir şekilde ayarlanmasına ve değişen çevresel koşullara hızlı ve iyi kontrol edilen yanıtların oluşturulmasına imkan tanımaktadır (Gerstel ve Römling 2003).

2.7.4.2 RpoS ve Crl

Salmonella'da biyofilm oluşumundaki diğer ana regülatörler olan RpoS ve Crl regülatörleri, oldukça karmaşık süreçlerden etkilenir. Bir haloenzim formu olan RNA polimeraz, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde 7 farklı sigma (σ) faktörü ile ilişkilidir. σ faktörü doğrudan çekirdek enzim kompleksinin promotorlara olan özgüllüğünü belirler. σ^{70} , *rpoD* tarafından kodlanmaktadır ve üreme fazı süresince transkripsiyondan sorumludur. σ^S , *rpoS* tarafından kodlanmaktadır ve gen transkripsiyonun düzenlenmesi, stres yanıtlarının oluşturulması ve durağan yaşam fazının sürekliliği için önemlidir (Hengge-Aronis 2002). *rpoS*'nin birçok *Salmonella* suşunda, biyofilm yaşam modunda ifade edildiği, mikrodizin analizleriyle de gösterilmiştir (Hamilton vd. 2009). *S. Typhimurium*'un doğal tip suşlarındaki *rpoS* transkripsiyonunun, *csgD* mutantlarıyla karşılaştırıldığında üç kat daha fazla olduğu saptanmıştır (White vd. 2010). “rdar”

morfotipi içeren kolonilerin üremesi süresince *rpoS*'nin ifadesinin 3. ve 7. günler arasında arttığı ve ifadesinin uzun inkübasyon sürelerinde de (47 gün) devam ettiği saptanmıştır. Tüm bu literatür verileri, kompleks biyofilm sistemlerinin devamlılığı için RpoS'nin son derece önemli olduğunu göstermektedir (Solano vd. 2002, Poutry ve Gunn 2003, Römling 2003, Hamilton vd. 2009).

“Rdar” morfolipinin regülasyonunda, *csgD*'nin transkripsiyonu büyük oranda *rpoS*'ye bağlıdır. Bu regülatörün transkripsiyonu ise ortam sıcaklığıyla ve durağan fazla yakından ilişkilidir (Römling vd. 1998, Gerstel ve Römling 2001, White vd. 2006). Örneğin; demir eksikliği *csgD* ifadesinin artışına (Römling vd. 1998) ve *csgD*'nin ifadesinin artışı da *adrA* ve *yihU* genlerinin ifadesinin artışına yol açmaktadır (White vd. 2008). Aynı durum fosfat, bikarbonat, sülfat gibi besinsel bileşenlerin yetersizliğinde de görülebilmektedir. Farklı çevresel uyarıcıların varlığında *csgD*'nin transkripsiyonu, fonksiyonel *ompR* genine bağlı olarak gerçekleşebilmektedir. Bu durumda *rpoS* etkisiz olmaktadır (Römling vd. 1998, Gerstel ve Römling 2001).

csgD'nin ifadesine ilave olarak, *csgBAC* ve *adrA*'nın ifadelerinde de bazı basamaklarda RpoS'nin varlığı gereklidir. *rpoS*'de meydana gelebilecek bir mutasyon, *csgD* üzerinde meydana gelebilecek bir mutasyondan, bu bileşenlerin sentezi üzerinde çok daha etkili olabilmektedir (Robbe-Saule vd. 2006). Ancak *csgB*'nin ifadesinde *in vivo* koşullarda RpoS'nin varlığına gereksinim duymamaktadır (Römling vd. 1998). Bunun dışında RpoS aynı zamanda *mlrA*'nın da ifadesini pozitif yönde regüle etmektedir (Brown vd. 2001). Son olarak RpoS'nin hareketlilikle ilişkili genlerin aktivasyonunda da rol oynadığı belirlenmiştir (Adams vd. 2001).

rpoS lokusu yüksek düzeyde mutasyona uğrama potansiyeli içermektedir. Bu nedenden ötürü laboratuvar koşullarına adapte olmuş birçok suş, zamanla “rdar” morfolipini yitirebilmektedir (Davidson vd. 2008).

DNA'ya bağlanan ve transkripsiyonel bir regülatör olan Crl proteini “rdar” morfolipinin gelişimi için bir diğer önemli bileşendir. Crl mutantları, atipik bir “rdar” biyofilm morfolipi sergilemektedir (Robbe-Saule vd. 2006). *rpoS-crl* ikili mutantlarının

kullanıldığı ve çapraz tamamlama deneylerinin gerçekleştirildiği bazı çalışmalarda; Crl'in fonksiyonunu gerçekleştirebilmek için, RpoS'ye gereksinim duyduğu saptanmıştır. Crl'in varlığı, azami düzeyde *csgB*, *bcsA*, *csgD* ve *adrA* ifadeleri için zorunlu bulunmuştur (Zogaj vd. 2001).

2.7.4.3 c-di-GMP

bis-(3'-5') siklik dimerik guanozin monofosfat ya da kısaca c-di-GMP olarak bilinen sinyal molekülünün biyofilm oluşum süreçlerindeki rolü ilk olarak *Gluconacetobacter xylinus*' da selüloz biyosentezinde allosterik kontrol faktörü olarak rol aldığı keşfedilmesiyle anlaşılmıştır (Ross vd. 1987). c-di-GMP yalnızca çok hücreli bir davranış biçimi olan biyofilmlerin oluşumlarının düzenlenmesinde değil, hareketliliğin ve virulanslığın ifadesinde de rol alan son derece önemli bir sinyal molekülüdür (Lamprokostopoulou vd. 2010). Çeşitli hücre dışı sinyallere cevaben GGDEF protein domaini bulunduran c-di-GMP, diglukan siklaz (DGCs) tarafından sentezlenir (Hengge 2009). Sentez süreci iki molekül guanozin trifosfat (GTP) ile başlar ve GTP daha sonra 5' fosfoguanil-guanozin'e (pGpG) özgül olan fosfodiesteraz (PDEs) (EAL veya HD-GYP protein domainleri bulundurur) tarafından degrade edilir. Bu aşamada pGpG, fosfodiesteraz tarafından iki molekül guanozin monofosfata (GMP) dönüştürülür. Birçok diglukan siklaz enziminde RxxD motifi bulunmaktadır. Bu motif c-di-GMP'ye bağlanarak enzimin allosterik kontrol aktivitesini düzenlemektedir. c-di-GMP efektörünün diğer üç sınıfı, PilZ protein domainini bulundurmaktadır. Sinyal molekülünün düzenlenmesiyle ilişkili GGDEF, EAL ve HD-GYP protein domainleri birçok bakteride yer almaktadır. Örneğin; *S. Typhimurium*'da 5 tip GGDEF, 7 tip EAL ve 7 tip GGDEF/EAL proteini bulunur. Hücredeki c-di-GMP oranı, diglukan siklaz ve fosfodiesteraz enzimlerinin aktivitelerine bağlıdır (Galperin vd. 2001).

c-di-GMP'nin nanomolar düzeyde hücre içi konsantrasyonundaki farklanmalarının biyofilm morfolipinde belirgin değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir (Kader vd. 2006, Simm vd. 2007, Simm vd 2009). *S. Typhimurium*, 20 GGDEF ve /veya EAL domain proteinlerinin 10 adeti “rdar” morfolipinin düzenlenmesinden (Solano vd 2009), 7 adeti “rdar” morfolip oluşumu ve *csgD* ifadesinden sorumlu bulunmuş ve 2 proteinin selüloz

sentezini uyardığı (AdrA STM0385 ve STM1987) saptanmıştır. Sadece STM4264'ün hem *csgD* ifadesini hem de selüloz sentezini düzenlediği tespit edilmiştir (Simm vd. 2007).

c-di-GMP; *S. Typhimurium*'da c-di-GMP reseptörü olarak tanımlanan STM1798 ve BcsA'dan bağımsız olarak CsgD ifadesini düzenler. *Vibrio cholerae*'da CsgD'ye homolog olan VpsT ifadesi, c-di-GMP tarafından düzenlenmez (Zakikhany vd. 2010). VpsT, dimerizasyon ve hedef promotor dizisine bağlanmak için c-di-GMP'ye ihtiyaç duyar. VpsT'nin c-di-GMP bağlanma bölgesi CsgD'de korunmamıştır (Krasteva 2010). Her ne kadar GGDEF ve EAL bölgelerinin geleneksel işlevleri sırasıyla c-di-GMP'nin sentezi ve parçalanması olsa da bu proteinlerin bir kısmı enzimatik olarak aktif değildir. Ancak yine de biyofilm fenotiplerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Simm vd. 2009, Ahmad vd. 2013).

Kronik enfeksiyonlarının çoğunluğu, mikroorganizmaların biyofilm oluşumu ve bu nedenle de artan hücrel c-di-GMP konsantrasyonları ile bağlantılıdır (Römling vd. 2013). *S. Typhimurium*'da yüksek c-di-GMP seviyeleri, HT-29 hücre hattına invazyonu ve proenflamatuvar sitokin IL-8 salınması gibi virulans fenotiplerini inhibe eder (Lamprokostopoulou vd. 2010, Ahmad vd. 2011). CsgD, bu iki fenotipin c-di-GMP aracılığı ile inhibisyonunda rol oynar. Konak hücreye invazyona aracılık eden ana bileşen tip III salgılama sistemi I'dir (T3SS-I). Bu sistem, konak hücrelere bakteri girişini teşvik eden en az 25 efektör proteinini yer değiştirir (Galan vd. 2001, Ehrbar vd. 2002, Hanisch vd. 2010). Bir araştırmada T3SS-1 efektörlerini CsgD ile birlikte inhibe ettiği saptanmıştır (Lamprokostopoulou vd. 2010, Ahmad vd. 2011). *S. Typhimurium*'da selüloz, efektör moleküllerin konağa tutunmasını sınırlandırarak TTSS-1 efektör moleküllerinin girişini engeller ve invazyonu önler. Bu da konak hücrede invazyonun c-di-GMP sinyali ile düzenlendiğini göstermektedir. HT-29 konak hücrelerinden IL-8 salgılanması, c-di-GMP aracılığı ile düzenlenen *csgD* ve matriks bileşenlerinin ifadesi ile kontrol edilir (Ahmad vd. 2011). Makrofajlarda IL-8 salınımı, kıvrımlı fimbriyanın TLR1/TLR2 aracılığı ile tanınması ile uyarılır (Tükel vd. 2010). TLR2'yi ifade etmeyen HT-29 hücrelerinde, IL-8 salımı, monomerik flagellinin TLR5 aracılığı ile tanınması yoluyla indüklenir (Wang vd. 2006). IL-8 indüksiyonu kıvrımlı fimbriya ifadesini

arttırır. Bu durum kıvrımlı fimriyanın monomerik flagellini bağlayarak IL-8 salınımını dolaylı yoldan uyarıldığının göstergesidir. Yüksek c-di-GMP seviyesi HT-29 hücrelerinde patojenin tutunmasını arttırsa da monomerik flagella salınımını azaltmaktadır (Lamprokostopoulou vd. 2010, Ahmad vd. 2011). c-di-GMP yüksek miktarda üretilmesi *bcsA* mutantlarında kısmen de olsa HT-29 hücrelerinin IL-8 üretimini onarmıştır. Yüksek selüloz ifadesi, IL-8 salınımını indüklemek için kıvrımlı fimbriya ile ilişkili monomerik flagellinin konak hücre reseptörü ile etkileşime girmesini önlemektedir (Lamprokostopoulou vd. 2010).

S. Typhimurium virulans özelliklerinin c-di-GMP aracılığı ile düzenlenmesi oldukça karmaşık bir süreçtir. GGDEF ve veya EAL bölgesine sahip proteinlerden 10 adeti HT-29 hücrelerine invazyonu kontrol altında tutmaktadır (Ahmad vd. 2011). Bunların 6 tanesi HT-29 hücrelerinden IL-8 salınımını uyarılmasını tetiklemektedir. STM1697 gibi bazı mutantlar, c-di-GMP'den bağımsız düzenleme ile geleneksel olmayan fenotipler sergilemişlerdir (Ahmad vd. 2011, Ahmad vd. 2013, Zheng vd. 2013). Selüloz ekspresyonunun inhibe edici etkisinin yanı sıra, c-di-GMP'nin *csgD*'ye bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla virulans özellikleri nasıl inhibe ettiği tam anlamı ile açıklanamamıştır.

Diğer yandan bir c-di-GMP bağlanma proteini olan BcsE'nin; *E. coli* ve *S. Typhimurium*'da farklı fonksiyonu üzerinde üzerinde yürütülen çalışmalar sonunda; söz konusu proteini kodlayan genin (*bcsE*) insersiyonal inaktivasyonunun bu bakterilerde selüloz biyosentezinin önemli ölçüde düşmesine yol açtığı ileri sürülmüştür (Solano vd. 2002, Serra vd. 2013). Ancak Fang vd. (2014) yaptıkları çalışmada BcsE proteininin selüloz biyosentezi için zorunlu olmadığını, bununla beraber salgılanan selüloz fibrillerinin yoğunluğunun ve düzenlenmesinin gerçekleştirilmesinde rol oynadığı saptanmıştır. 523 amino asit içeren ve 59263 Dalton ağırlıkta olan bu proteinin proteaz aktivitesi içerdiği tahmin edilmektedir. Aynı araştırmacılar BcsE proteininin aktivitesi için, GIL olarak adlandırılan (DUF2813) domaini aracılığı ile c-di-GMP'ye bağlanmasının kritik bir önem taşıdığını ileri sürmüştür. Halen *bcsE* geninin dolayısı ile BcsE proteininin selüloz biyosentezindeki düzenleyici etkisi açıklığa kavuşturulabilmiş değildir. Bu da biyofilm yapıları ile bu proteinin ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceği

konusunu muğlak kılmaktadır. Çalışmamız bu sorunun açıklığa kavuşturulmasını hedeflemektedir.

2.7.4.4 BarA/SirA ve Csr sistemi

BarA/SirA sistemi, gama-proteobakterlerde geniş ölçüde korunmuş bir sistem olup, bu sistem *Salmonella*'nın virulanslığında, hareketliliğinde ve biyofilm oluşumunda oldukça önemli rollere sahiptir (Ahmer vd. 1998, Teplitski vd. 2003, Teplitski vd. 2006, Jonas vd. 2010). SirA, FixJ ailesine dâhil bir yanıt regülatörüdür ve sensör kinaz BarA tarafından (Altier vd. 2000, Pernestig vd. 2001) veya hücrel asetil fosfat tarafından fosforile edilir (Lawhon vd. 2002). Hangi tip çevresel uyarıların bu ikili regülasyon sistemine ne düzeyde etki ettiği henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da; pH, format ve asetat gibi metabolizma ürünlerinin özellikle *E. coli* ile yapılmış bazı çalışmalarda bu sistem üzerinde etkinlikleri belirlenmiştir (Pernestig vd. 2003, Mondragon vd. 2006, Chavez vd. 2010). *Salmonella*'da safra tuzlarının ve kısa zincirli yağ asitlerinin BarA/SirA sistemini etkilediği bilinmektedir (Prouty ve Gunn 2000, Lawhon vd. 2002). SirA, *csrB* ve *csrC* sRNA'larının transkripsiyonel düzeyde aktivasyonundan sorumludur. Her iki sRNA'da *Salmonella* Csr sisteminin bir parçasıdır ve RNA bağlama proteini olan CsrA ile antagonistik etkileşim içerisindedir. *E. coli*'de CsrA, kendi antagonist RNA'ları olan *csrB* ve *csrC*'nin transkripsiyonlarını indirekt bir şekilde, BarA/SirA sistemi aracılığı ile aktive eder (Gudapaty vd. 2001, Suzuki vd. 2002). Bu sistem; hareketlilik, karbon depolanması, virulanslık, ikincil metabolizma ve biyofilm oluşumu gibi fenotipik değişimleri kontrol eder (Teplitski vd. 2006, Lucchetti-Miganeh vd. 2008, Lapouge vd. 2008, Jonas vd. 2010). Bazı çalışmalarda *sirA*, *fimI*, *csrB* ve *csrC* ikili mutantlarının plastik yüzeylerde biyofilm oluşumunu gerçekleştirmediği saptanırken, *flhDC* mutantlarının çok daha fazla biyofilm oluşturabildiği belirlenmiştir. Fosforile edilmiş SirA-P, *csrB* ve *csrC*'yi, *fim* operonunu ve *hila*'yı transkripsiyonel düzeyde aktive ederken, artan *csrB/csrC* düzeyi CsrA aktivitesini inhibe eder. Azalan CsrA aktivitesi, FlhDC ve Hila gibi biyofilm oluşumunu inhibe edebilecek faktörlerin ifadelerinde azalmaya neden olarak biyofilm oluşumunu teşvik eder. CsrA aynı zamanda *fim* ifadesini de azaltır. CsrA'nın aktivitesinin azalması bu bağlamda daha fazla tip I fimbriya biyosentezinin

gerçekleşmesine ve beraberinde daha fazla biyofilm üretiminin gerçekleşmesine olanak tanır (Teplitski vd. 2006).

Csr sistemi ve c-di-GMP sinyalizasyonu arasındaki ilişkinin *E. coli*'de keşfinden sonra (Jonas vd. 2008) benzer bir ilişki *S. Typhimurium*'da da tanımlanmıştır (Jonas vd. 2010). Bu keşiflerle CsrA'nın direkt ve indirekt bir şekilde en az sekiz bileşenin regülasyonunda rol aldığı kanıtlanmıştır (GGDEF domaini içeren proteinler; STM1987 ve STM4451, GGDEF/EAL domaini içeren proteinler; STM1703 ve STM2275, EAL domaini içeren proteinler; STM1687, STM1827 ve STM3611 ve son olarak STM1344 proteini) (Simm vd. 2009). STM3611 proteini Csr sistemi tarafından pozitif yönde regüle edilen tek proteindir. Yukarıda anılan diğer proteinler CsrA tarafından negatif yönde regüle edilmektedir. CsrA çoklu hiyerarşik düzeyde sesil yaşam formu ile hareketlilik arasındaki geçişi kontrol eder. Genellikle hareketliliği aktive ederken, sesil yaşam formuna geçişi baskılar. Bu değişimleri, öncelikle FlhDC regülatörünü doğrudan regüle ederek gerçekleştirir. Bu regülasyon; *fliA*, *fliB* ve *fliC*'nin aktivasyonunu gerçekleştirir. Daha sonrasında ise CsrA, STM1344 proteinin ifadesini baskılar. CsrA, STM3611 mRNA transkripti ile interaksyona girerek bu transkriptin stabilizasyonunu sağlar. CsrA, aynı zamanda STM3375 proteinini (*csrD*) regüle ederek CsrB ve CsrC'nin destabilize olmasına neden olur (Suzuki vd. 2006, Jonas vd. 2008). CsrA, kendi regülasyonunu otoregülatör bir çevrim sistemiyle kontrol edebilmektedir. Son olarak STM1697 ve STM1987'nin direkt ve STM1703, STM1827 ve STM4551'in indirekt inhibisyonlarına neden olur. BarA, LB ortamında sıkı pelikül yapılarının oluşabilmesi için önemli bir bileşendir (Solano vd. 2002).

2.7.4.5 PhoPQ-RstA

Salmonella'nın PhoPQ sistemi, sitoplazmik yanıt regülatörü olan PhoP ve iç membranda lokalize olmuş sensör kinaz PhoQ'dan oluşan ikili bir sistemdir (Kato ve Groisman 2008). Düşük magnezyum konsantrasyonunda sinyal sensör PhoQ'nun periplazmik bölgesinde otofosforilasyon başlar ve PhoQ, PhoP'ye fosfat transfer ederek PhoP'yi aktive eder (Castelli vd. 2000, Chamnongpol vd. 2003, Shin ve Groisman 2005). PhoQ proteini aynı zamanda antimikrobiyal peptidlerin varlığına ve düşük pH'ya da duyarlıdır

(Bader vd. 2005, Prost vd. 2007). PhoPQ sistemi, H-NS (Song vd. 2008), SlyA (Navarre vd. 2005, Song vd. 2008), Rcs (Tierrez ve Garcia-del Portillo 2004), MgrB (Lippa ve Goulian 2009) ve RstB (Nam vd. 2010) gibi birçok hücrel regülatör tarafından transkripsiyonel ve post transkripsiyonel düzeyde regüle edilmektedir. PhoP'nin aktive olması sonucunda LPS modifikasyonu; magnezyum taşınması, epitel hücrelerin invazyonu ve makrofajlar içerisinde hayatta kalma gibi birçok fonksiyonla ilişkili 120'den fazla genin direkt ya da indirekt bir şekilde ifadesi ile kontrol edilmektedir (Kato ve Groisman 2008, Charles vd. 2009).

S. Typhimurium'un *phoP* mutant suşlarının doğal tip suşlara kıyasla daha iyi biyofilm ürettiği bilinmektedir. Bu veriler net bir şekilde PhoPQ sisteminin *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunu baskıladığını göstermektedir (Prouty ve Gunn 2003). Prouty ve Gunn (2003), *prgH*'nin, PhoPQ bağımlı biyofilm regülasyonu ile ilişkili olabileceğini öngörmüştür. Aynı araştırmacılar; *prgH* bakımından mutant *Salmonella* suşlarının safra taşları ve cam slaytlar üzerinde olgun biyofilm oluşturmamalarını saptamıştır (Prouty ve Gunn 2003).

RstA'nın PhoP tarafından aktivasyonu, PhoPQ bağımlı biyofilm regülasyonuna başka alternatifler de sunabilmektedir. RpoS üzerindeki etkilerinden farklı olarak RstA, aynı zamanda *bapA*'nın ifadesini de etkilemektedir (Cabeza vd. 2007). *E. coli*'de RstA'nın yüksek düzeyde ifade edilmesi; fazla RstA'nın *csgD* promotoruna bağlanarak negatif regülatör gibi davranmasına neden olmaktadır (Ogasawara vd. 2007). *Salmonella*'da *csgD* operonunda RstA'nın bağlanma motifinin bulunması, RstA'nın *csgD*'nin ifadesini doğrudan inhibe ettiğini kanıtlar niteliktedir (Cabeza vd. 2007).

2.7.4.6 Rcs sistemi

RcsC-RcsD-RcsB fosforilleyici sistem RcsC kinaz sensörünü içermektedir. Fosfotransfer ara ürünü olan RcsD proteini, transkripsiyonel bir regülatör olan RcsB ve transkripsiyonel co-regülatör olan RcsA; Rcs sisteminin ana bileşenleridir (Clarke 2010). Bu sistem yüksek ozmolaritede regüle olmaktadır. RcsD; *tolB* mutasyonlarında, katyonik antimikrobiyal peptitlerin varlığında, demir eksikliği görülen *pmrA*

mutantlarında ve DjlA gibi bazı proteinlerin aşırı üretiminde ortaya çıkan, hücre zarı stresine ilişkili durumlarda fonksiyon göstermektedir (Mariscotti ve Garcia-del Portillo 2009). *igaA* geninde görülebilen bazı nokta mutasyonları, *igaA1* alel mutasyonunda olduğu gibi, yarı korunumlu R188H pozisyonundaki amino asiti değiştirerek farklı bir IgaA proteinine dönüşmesine sebep olur. Bunun sonucu olarak da *rcs* regülasyonu tarafından yönlendirilen RcsC kinaz aktivasyonunda düşüş meydana gelir (Mariscotti ve Garcia-del Portillo 2009). Rcs sisteminin aktivasyonu; kolanik asit kapsülü sentezinde, flagella sentezinin baskılanmasında ve virulans genlerinin ifadesinde güçlü bir indükleyici etkiye sahiptir (Majdalani ve Gottesman 2005, Wang vd. 2007).

2.8 *Salmonella* Biyofilm Oluşumunun Genetik Regülasyonu ve Hareketlilik Arasındaki İlişki

Biyofilm oluşumunda geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz tutunma; hareketlilik ve başlangıç kolonizasyonu için önemlidir. Ayrıca biyofilm yapısının üç boyutlu mimarisini oluşturmak ve olgun biyofilmden yayılmayı kolaylaştırmak için de gereklidir. Biyofilmden sessiz yaşam ve hareketlilik; c-di-GMP sinyal ağı tarafından PilZ domaini içeren BcsA ve YcgR proteinleri aracılığı ile düzenlenir. Selüloz sentaz BcsA, C-terminal PilZ domainine bağlanan c-di-GMP ile aktive olan, membran bağlı bir glikoziltransferazdır (Zogaj vd. 2001, Omadjela vd. 2013). STM1798 (YcgR) ise YcgR-N domaini ve PilZ domaininden oluşan sitoplazmik bir proteindir. PilZ domainine ligand bağlandığında STM1798 konformasyonu değişir (Ryjenkov vd. 2006, Benach vd. 2007). Konformasyonel değişim STM1798 ile flagellar motor proteinler FliG ve FliM arasında etkileşimin artmasına sebep olur (Paul vd. 2010). Bu sonuçlar agar yüzeyinde hareketliliğin belirgin bir şekilde inhibisyonuna ve flagellar rotasyonun saat yönünün tersine hareket etmesine yol açmaktadır. c-di-GMP, YcgR'nin PilZ domainine BcsA'dan 43 kat daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Pultz 2012). c-di-GMP reseptörlerinin farklı afiniteleri fizyolojik etkenlere de bağlıdır. Flagellar fonksiyonelliğin STM1798 tarafından baskılanmasından sonra, flagella rotasyonunun mekanik inhibisyonu, hareketliliği engeller ve daha sonra biyofilm oluşturmak için selüloz biyosentezi başlatılır (Grantcharova vd. 2010, Zorraquino vd. 2013). Selüloz biyosentezi c-di-GMP bağlama proteini olan, *bcsEFG* operonu tarafından kodlanan

BcsE proteini ile de uyarılır. BcsE'nin, BcsA ile doğrudan etkileşime girip girmediği henüz aydınlatılmamıştır (Fang vd. 2014).

Fosfodiesteraz YhjH delesyonunda, sadece fosfodiesterazın hareketliliği etkilediği üç diglukonat siklazın dağılma ve toplanma hareketlerini düzenlediği gözlemlenmiştir. Genetik analizler diglukonat siklazların, farklı mekanizmalar tarafından hareketliliği etkilediğini kanıtlamaktadır. STM2672, STM1798 doğrudan hareketliliği etkilerken, STM1987 flagella rotasyonunu selüloz aracılığı ile bloke etmektedir. Bu durumda hareketliliğin inhibisyonunu c-di-GMP seviyeleri belirler (Le Guyon vd. 2014).

Sınıf III EAL bölgesine sahip proteinler, STM1344, STM1697 ve STM3375, c-di-GMP'den bağımsız bir şekilde hareketliliği etkiler. STM1344 (YdiV) ve *Salmonella*'ya özgü STM1697, flagella biyosentezinin ana transkripsiyon regülatörü olan FlhDC'nin bir bileşeni olan FlhD'ye bağlanır (Wada vd. 2011, Omadjela vd. 2013). STM1344 ve STM1697 hedef DNA'ya ilişkilene özellikleri ile FlhD'ye bağlanarak, FlhDC'nin işlevselliğine müdahale eder ve STM1344 proteolitik bozunma kompleksini yönlendirir (Hisert vd. 2005, Takaya vd. 2012). STM1344 ve STM1697; c-di-GMP'ye bağlı bir şekilde *csgD* ekspresyonunu baskılayan bir fosfodiesteraz olan STM3611'in regülasyonu ile dolaylı olarak biyofilm oluşumunda rol almaktadır (Simm vd. 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

, % 60 gliserol ihtiva eden LB sıvı ortamında -80 °C'de saklanan *S. Typhimurium* DMC4, *S. Grup C1 DMC2* suşları, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılmış ve sterilizasyon işlemi otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Luria Bertani (LB^{-NaCl}) Broth ve Agar

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Agar	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılmış ve sterilizasyon işlemi otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

Kongo Kırmızısı İçeren (40 µg/mL) Luria Bertani (LB^{-NaCl}) Agar

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

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Çözülen içeriğe 0,04 gram Kongo kırmızısı ilave edilmiştir. pH ayarı yapıp 15 gram agar ilavesinden sonra besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Kalkoflor İçeren (50 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)

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

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Çözülen içeriğe 0,05 kalkoflor (fluorescent brightner) ilave edilmiştir. pH ayarı yapıp 15 gram agar ilavesinden sonra besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Fosfatla Tamponlanmış Su (PBS)

İçerik	g/L
NaCl	80
KCl	2
Na ₂ HPO ₄	14,4
KH ₂ PO ₄	2,4

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.

Tris EDTA Çözeltisi

İçerik	
Tris	0,121 g
EDTA	0,037 g
Distile su	100 mL

CTAB/NaCl Çözeltisi

İçerik	g/L
NaCl	41
CTAB	100

%30 Akrilamid/Bisakrilamid

İçerik	
Akrilamid	29,2g
Bisakrilamid	0,8g
Steril distile su	100 mL

Çözelti 0,45 µm por çapındaki membran filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlanmıştır.

1,5M Tris pH 8,8

Tris-Base	54,5 g
Steril distile su	300 mL

0,5M Tris pH 6,8

Tris-Base	12,1 g
Steril distile su	200 mL

% 10 SDS

Sodyum dodesil sülfat	5 g
Steril distile su	50 mL

% 10 Amonyum Persülfat

Amonyum persülfat	0,1 g
Distile su	1 mL

Fiksasyon Çözeltisi**İçerik**

İsopropanol	200 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
Steril distile su	700 mL

Boya Cözeltisi

İçerik

Commassie Briliant Blue R250	0,3 g
Metanol	45 mL
Glasiyel asetik asit	10 mL
Distile su	45 mL

Boya Giderme Cözeltisi

İçerik

Metanol	100 mL
Glasiyel Asetik asit	50 mL
Distile su	350 mL

SDS Elektroforez Tamponu (5X), pH 8,3

İçerik

Tris-Base	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g
Distile su	1 L

Tris ile Tamponlanmış Tuz Cözeltisi (1X) (TBS-T), pH 7,5

İçerik

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	% 0,05
Distile su	100 mL

Transfer Tamponu

İçerik

10X TBS	10 mL
% 100 Metanol	20 mL
Distile su	70 mL

Faks Tamponu

İçerik

BSA	5 g
Sodyum Azid	250 mg
PBS	500 mL

3.2 Yöntem

3.2.1 Kloramfenikol gen kaseti insersiyonu ile *bcsE* mutasyonlarının oluşturulması

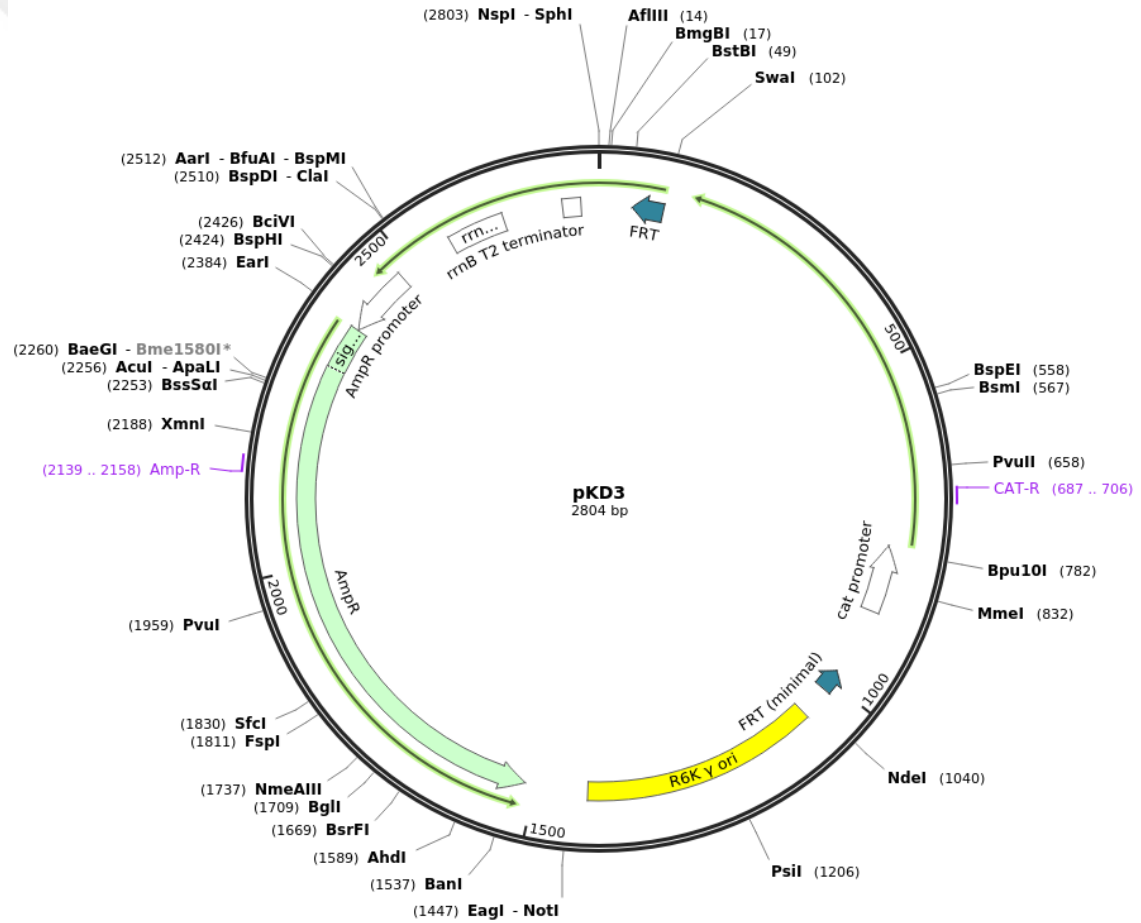
Homolog bölge rekombinasyonu; PZR ürünlerinin ve sentetik oligonukleotitlerin substrat olarak kullanılması yolu ile gerçekleştirilmiştir. Kloramfenikol gen kaseti, ilgili gen içerisine sokulduktan sonra, bu gen kasetini içeren PZR ürününü lamda red rekombinaz enzimini ifade eden alıcı suşa elektroporasyon yöntemi ile transforme edilmiştir. Mutasyon çalışmalarında kullanılan plazmidlerin dirençlilik özellikleri Çizelge 3.1'de genetik haritaları ise Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir.

Red rekombinaz sistemi, hedeflenen gen ile homoloji gösteren kromozomal genlerin bozulmasına dayanan basit ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde rekombinasyon için düşük kopya sayısına sahip; sıcaklık duyarlı bir plazmid üzerinde bulunan indüklenebilir bir promotorun kontrolü altında sentezlenebilen λ fajı red rekombinaz sistemi gereklidir. Gen inaktivasyonu için FRT (FLP tanıma hedefi) bölgeleri ile bağlantılı olan antibiyotik direnç plazmidleri kalıp olarak alınmış ve 50 nükleotit

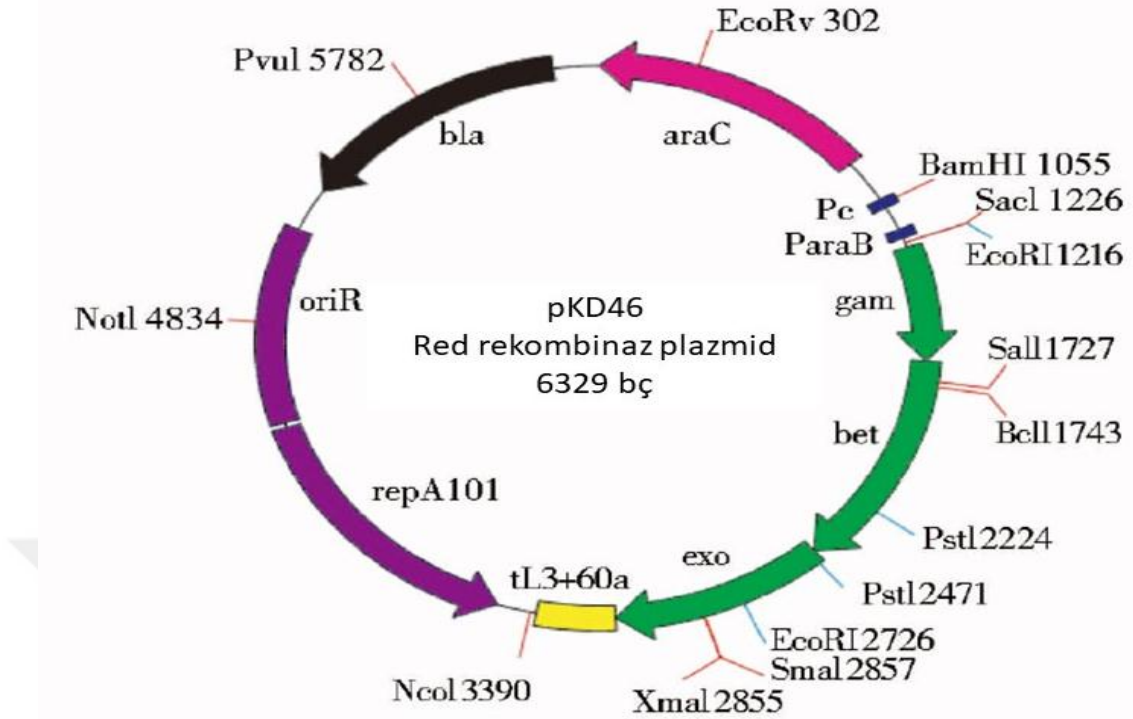
uzunluğunda homolog bölgelere sahip primerler kullanılmıştır. *bcsE* mutantları kloramfenikol dirençlilik özelliklerine göre seçilmiştir (Datsenko ve Wanner 2000).

Çizelge 3.1 Red rekombinaz esaslı mutasyon çalışmalarında kullanılan plazmidler

Plazmid	Özellik	Direnç	Boyut
pkD46	Red ifade vektörü	Amp ^R	6,329 kb
pkD3	Kloramfenikol kalıp plazmidi	Amp ^R , CHL ^R	2,804 kb



Şekil 3.1 Kloramfenikol gen kasetini barındıran pKD3 kalıp plazmidinin genetik haritası



Şekil 3.2 Red ifade vektörü pKD46 genetik haritası

3.2.1.1 *S. Typhimurium* DMC4 ve *S. Grup C1* DMC2 suşlarına pKD46 plazmidinin transformasyonu

pKD46 plazmidi sıcaklık duyarlı bir vektör olup, lambda red rekombinaz enzimi ve ampisilin direnç genleri içermektedir. L-arabinoz ile indüklenen bu plazmid, elektroporasyon yöntemi ile *Salmonella* suşlarına aktarılmıştır.

3.2.1.2 Plazmid izolasyonu

pKD46 plazmidini içeren *E. coli* DH5α hücreleri 100 µg/mL ampisilin içeren LB (Luria Bertani) sıvı besiyerinde 30 °C'de, pKD3 plazmidini içeren *E. coli* MZ2997 hücreleri 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif kültürlerden plazmid izolasyonu Qiagen Spin Miniprep (#27106) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel hücreler 250 µL P1 tamponunu ile mikrosantrifüj tüpünde süspanse edilmiş, 250 µL P2 ve sonrasında 350 µL N3 tamponu ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışımlar 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek,

oluşan üst faz QIAprep spin kolonuna transfer edilmiş ve tekrar 13000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, QIAprep spin kolon üzerine 500 µL PB tampon ilave edilerek tekrar santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin ardından kolona 750 µL PE tamponu eklenerek santrifüj ile süzüntü atılmış ve ve son aşamada kolon üzerine 50 µL EB tampon uygulanarak santrifüjlenmiş ve DNA örnekleri elde edilmiştir. DNA örnekleri, % 0,7 agaroz jelde 80V sabit elektrik akımı ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. “Kodak 1D imaging system” de jel fotoğrafları alınmış ve plazmidlerin molekül büyüklükleri; süper sarmal DNA standardı (Sigma D5292) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.1.3 Kompetent hücrelerin hazırlanması ve plazmid transformasyonu

18 saat süre ile geliştirilen aktif *Salmonella* kültürleri 1/10 oranında dilue edildikten sonra üreme yoğunluğu $OD_{600}=0,4$ olana kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde kültürler 2 mL mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 10000 rpm +4°C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırılarak 1 mL soğuk dH₂O (+4°C) eklenmiş ve 10000 rpm'de (+4°C 20 dk) santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Son aşamada üst faz uzaklaştırılarak ortama 50 µL soğuk dH₂O eklenmiştir. pKD46 plazmidi son konsantrasyonu 100 ng/µL olacak şekilde içerisinde kompetent hücreleri barındıran elektroporasyon küvetine (0,2 cm) (Thermo Electron Corporation, Ohio) aktarılmış ve 1800 Volt sabit zamanlı akım ile elektroporasyon gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminden sonra üzerine 1 mL LB sıvı besiyeri eklenen hücreler 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak, 100 µg/mL ampisilin (AMP) içeren LB agar besiyerine drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yapılmıştır. 30 °C'de 18 saat inkübe edilen transformantlar steril koşullarda alınarak 100 µg/mL Amp içeren sıvı besiyerinde 30 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. Qiagen Spin Miniprep (#27106) kit protokolü (3.2.1.2) kullanılarak seçilen transformantlardaki plazmid varlığı doğrulanmıştır.

3.2.1.4 Homolog bölgeleri içeren fonksiyonel kloramfenikol kasetinin eldesi

bcsE gen bölgesine özgü homolog bölgeler içeren PZR ürünlerinin elde edilmesi amacı ile hedef bölgeler seçilerek bunlara özgü primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). Söz konusu primerler ürettirildikten sonra kloramfenikol gen kasetinin 5' ucuna bağlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Helix Biyotek).

Çizelge 3.2 Homolog bölge rekombinasyonu primerleri

F1	gtggaccccggtattttctctcggtatctcatcattatgggatgaactgcggtgtaggctggagctgcttc
R1	tcatgatgcacgctccgcggtgtcgtcgagcaatgcaggggttcaggaaatgggaattagccatggtcc

bcsE geni ile homolog kollara sahip kloramfenikol gen kasetinin oluşturulması amacıyla Touchdown Polimeraz Zincir Reaksiyonundan yararlanılmıştır (Çizelge 3.3-3.4)

Çizelge 3.3 “Touchdown” Polimeraz Zincir Reaksiyonu sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	20	
Bağlanma	70-60 (-0,5 °C)	45	20
Uzama	72	90	
Denatürasyon	94	20	
Bağlanma	60	45	20
Uzama	72	90	
Uzama	72	300	1

Çizelge 3.4 “Touchdown” Polimeraz Zincir Reaksiyonu içeriği

İçerik	50 µl
dH ₂ O	36,75
10 x NH ₄ SO ₄ Buffer	5
dNTP (10 mM)	1
İleri (F) primer (10 µM)	1
Geri (R) primer (10 µM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	3
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl) (Fermentas, USA)	0,25
Kalıp DNA (100 ng/µl)	2

PZR ürünleri “Roche High Pure PCR Product” pürifikasyon kit protokolü uygulanarak saflaştırılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu tamamlandıktan sonra her PZR tüp (reaksiyon bileşenleri ve DNA ürünü) hacmi 100 µL'ye ayarlanmış ve her 100 µL PZR tüpüne 500 µL bağlanma tamponu eklenmiştir. Solüsyon yüksek saflıkta filtre tüplerine aktarılırlarak en yüksek devirde 60 saniye santrifüj edilmiştir. Filtre tüpleri üzerine sırasıyla 500 ve 200 µL olacak şekilde yıkama tamponu ilave edilerek 60 sn santrifüj edilmiştir. Son aşamada tüpler üzerine 50 µL elüsyon tamponu eklenerek santrifüj edilmiş ve DNA saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, *bcsE* geninde homolog bölge rekombinasyonu yolu ile mutasyon oluşturma yeteneğindeki kloramfenikol gen kaseti elde edilmiştir.

Saflaştırılmış PZR ürünleri *DpnI* enzimi ile 37 °C'de 4 saat enzim kesimine tabi tutulmuştur. Enzim kesimi sonrası tekrar saflaştırma yapılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 *DpnI* enzim kesim reaksiyonu içeriği (20 µL)

Enzim Reaksiyon Karışımı	µL
dH ₂ O	8,8
10X Tango Tampon	2
DpnI	1
1000 ng/µL DNA	8,2

3.2.1.5 Homolog bölgeleri içeren fonksiyonel kloramfenikol kasetinin pKD46 plazmidi içeren *Salmonella* suşlarına transformasyonu

pKD46 plazmidini içeren *Salmonella* aktif kültürleri 1/10 oranında dilue edildikten sonra OD₆₀₀=0,1 olana kadar 30°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon bitiminde 1M L-arabinoz, pKD46 lamda red ifadesini indüklemek için ortama eklenmiştir. Hücre süspansiyonu OD₆₀₀=0,4 olana kadar 30°C' de inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon bitiminde kültürler 2 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu ortam, 10000 rpm'de ve +4°C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde üst faz uzaklaştırılarak 1 mL soğuk dH₂O (+4°C) eklenmiş ve 10000 rpm'de ve +4°C 20 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen çökeltiden üst faz uzaklaştırılarak 50 µL soğuk dH₂O eklenmiştir. Bu şekilde saflaştırılan PZR ürünü 100 ng/µL konsantrasyonunda elektroporasyon kuvetine (0,2 cm) aktarılmıştır. 1800 Volt sabit zamanlı akım ile elektroporasyon işleminden sonra, kültür üzerine 1 mL LB sıvı besiyeri eklenerek 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde 20 µg/mL kloramfenikol (CHL) içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapılmış ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Mutant hücreler inkübasyon bitiminde stoğa alınmıştır.

3.2.1.6 Koloni PZR ile gen mutasyonunun doğrulanması

bcsE geninde mutasyon oluşturmak üzere kloramfenikol gen kaseti aktarılan transformantlardan koloni polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) “Solis Biotek 5X Hot

Firepol Blend Master Mix” kullanılarak mutasyonun doğrulaması gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonunda kullanılan primer sekansı, homolog kollar üzerinden seçilmiştir (Çizelge 3.6-3.8).

Çizelge 3.6 Primer dizileri

F2	5'-tcggcatctcatcattatgg-3'
R2	5'-caatcgaggggttcaggaa-3'

Çizelge 3.7 Koloni PZR sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	15 dk	1
Denatürasyon	95	20 s	30
Bağlanma	58	60 s	
Uzama	72	2 dk	
Uzama	72	10 dk	1

Çizelge 3.8 Koloni PZR içeriği

İçerik	20 µl
dH₂O	10,2 µl
Master Mix	4 µl
İleri (F) primer (10 µM)	0,4 µl
Geri (R) primer (10 µM)	0,4 µl
Kalıp DNA (resüspanse koloni)	5 µl

3.2.2 *bcsE* mutantlarının fenotipik değeriendirilmesi

Tüm biyofilm çalışmalarıda besiyeri olarak NaCl içermeyen LB broth ortamı kullanılmıştır. Suşların bu ortamda geliştirilmesinin nedeni, artan ozmolariteyle *Salmonella*'nın biyofilmin matriksinde önemli yapısal ve fonksiyonel görevleri olan kıvrımlı fimbriya (curli) genlerinin transkripsiyonel düzeyde ifadelerinin engellenmesidir (Olsén vd. 1993).

3.2.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde *bcsE* mutant suşlarının biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi

S. Typhimurium DMC4, *S. Grup C1* DMC2 suşları -20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine ve bu suşların *bcsE* mutantları ise 20 µg/mL CHL içeren LB broth besiyerinde % 1 inokülasyon oranıyla aktarılmış, 18 saat çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar, 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB^{-NaCl}; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarılmış ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra aktif kültürlerden, biyofilm matriksinin bileşenleri için indikatör özellik gösteren Kongo kırmızısı (0,04 g/L) içeren NaCl'siz LB agar besiyerlerine 20 µL olacak şekilde aktarılmıştır. Bu ortamlar, 20 °C'de en az 8 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Römling ve Rohde 1999). İnkübasyon bitiminde tüm Petriler stereo mikroskopunda (Leica, Germany) görsel olarak incelenmiştir. Çalışma 3 paralel ve 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Suşların içediği morfotipler: hücre dışı matriks bileşenleri olarak selüloz ve kıvrımlı fimbriya ifade eden “rdar” (kırmızı, kuru ve pürüzlü), hücre dışı matriks bileşenleri olarak kıvrımlı fimbriya ifade eden “bdar” (kahverengi, kuru ve pürüzlü), hücre dışı matriks bileşeni olarak selüloz ifade eden “pdar” (pembe, kuru ve pürüzlü) (Römling vd. 1998) ve hücre dışı matriksinde selüloz ve kıvrımlı fimbriya bileşenlerinin ifadesi olmayan “saw” (düz ve ıslak) olmak üzere kategorize edilmiştir (Solano vd. 2002).

3.2.2.2 Kalkoflor bağlanma uygulaması

Çalışılan suşlar, selüloz indikatörü olan kalkofloru içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl'siz LB agar besiyerlerinde üretilmiştir. Bu ortamlar, 20 °C'de 8 gün süresince inkübasyona bırakılmış ve suşlar bir hücre dışı matriks bileşeni olan selülozu üretilip üretilmediklerine göre 366 nm UV ışık altında değerlendirmeye tabi tutulup fotoğraflanmıştır (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 366 nm UV ışık altında floresan özellik gösteren örnekler selüloz üretimi bakımından pozitif; göstermeyenler ise selüloz üretimi bakımından negatif olarak değerlendirilmiştir (Vestby vd. 2009).

3.2.2.3 Polistren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi

S. Typhimurium DMC4, *S. Grup C1* DMC2 suşları ve bu suşların *bcsE* mutantlarının biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi için Vestby vd. (2009) ve Stepanovic vd. (2000) tarafından önerilen mikrotitre plaka yöntemi modifiye edilmiştir. Yöntem, mikrotitre plak kuyularının çeperlerine tutunmuş biyofilm yapılarının kristal viyole ile işaretlenmesi, biyofilm matriksine tutunan boyanın ise asetik asit çözeltisiyle çözdürülüp ELISA okuyucusunda ölçülmesini esas almaktadır (Stepanovic vd. 2000, Vestby vd. 2009).

Salmonella suşları NaCl içermeyen 5 mL'lik LB sıvı besiyerlerinde 37 °C'de ve çalkalamalı koşullarda (200 rpm) 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Aktif kültürlerden 30 µL alınarak, 100 µL NaCl'siz LB besiyeri ihtiva eden kuyulara inoküle edilmiştir. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitre plakalar; 24, 48, 72, 96, 210 ve 144 saat süresince ve 20°C'de statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi bitiminde, kuyular 3 defa steril fizyolojik serum (% 0,85 NaCl) (Merck, Almanya) ile yıkanarak biyofilm matriksine tutunmayan planktonik hücreler uzaklaştırılmıştır. Plakalar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra % 95'lik metanol ile 15 dakika süresince matriks yapısı fikse edilmiştir. Daha sonra 130 µL % 0,1'lik kristal viyole kuyulara aktarılmıştır. Boya inkübasyonu için plakalar oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bu aşama bitiminde plakalar, steril distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Biyofilm tabakasına

bağlanan boyaların çözünmesi için kuyulara 130 µL % 33'lük glasiyel asetik asit aktarılmış ve plakalar 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde çözünen kristal viyole, OD₅₉₅ nm'de Elisa okuyucusunda (Biorad, USA) ölçülmüştür. Deneme, tüm suşlar için dört paralel ve iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm ölçümlerinin sonucu her sekiz paralelden alınan OD değerlerinin ortalamasından, kontrol kuyularının (yalnızca NaCl'siz LB sıvı besiyeri içeren kuyular) OD değerlerinin ortalamasının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Suşlar aynı zamanda “cut off” (sınır) değerlerinin dönüşümleri de esas alınmak suretiyle, biyofilm üretimleri açısından “üretici olmayan”, “zayıf üretici”, “orta seviyede üretici” ve “güçlü üretici” olmak üzere değerlendirmeye tabi tutulmuştur (Stepanovic vd. 2000). Sınır değerleri, mikrotitre plaka ölçüm esasına dayalı yöntemlerde negatif test gruplarından gelen ölçüm sonuçlarının istatistiki sapma değerlerini ifade eden bir değerdir. Suşların biyofilm üretim kapasiteleri çizelge 3.9'da belirtilen sınır değerlerin dönüşümleriyle tanımlanmıştır.

Çizelge 3.9 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri

OD ≤ OD_c	Üretici değil
OD_c < OD ≤ 2xOD_c	Zayıf üretici
2xOD_c < OD ≤ 4xOD_c	Orta düzey üretici
4xOD_c < OD	Güçlü üretici

3.2.2.4 Pelikül oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

Doğal tip ve onların *bcsE* mutant suşları LB^{-NaCl} sıvı besiyerinde sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturmalarına göre incelenmesinde, öncelikle bakteriler stok kültürlerden alınarak aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürlerden alınan 0,5 mL porsiyonlar 4,5 mL LB^{-NaCl} sıvı besiyerine inoküle edilerek 20 ve 37 °C'de 8 gün inkübasyona bırakılmıştır. Suşların pelikül oluşumu her gün gözlenerek (Solano vd. 2002) sıvı-hava ara fazında halka oluşumu ve tüp tabanında hücre birikimleri incelenmiştir (Römling vd. 2000).

3.2.2.5 Selülaaz aktivitesinin belirlenmesi

Bakterilerin selülaaz aktivitesinin değerlendirilmesinde agar kuyu difüzyon testi uygulanmıştır. Mutant ve doğal tip suş kültürleri % 5 oranında karboksimetil selüloz içeren ve NaCl içermeyen LB sıvı besiyerinde 18 saat çalkalamalı koşullarda üretilmiştir. Bu süre sonrasında PBS içerisinde OD₆₀₀=5 olacak şekilde kültür süspansiyonları hazırlanmıştır. % 5 karboksimetil selüloz içeren NaCl' siz LB katı besiyerlerinde 5 mm çapında kuyular açılarak, hazırlanan kültür süspansiyonundan 100 µL bu kuyulara aktarılmıştır. 20 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda, % 0,1 oranında Kongo Kırmızısı içeren PBS solüsyonu agar yüzeyine yayılarak 30 dakika inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon bitiminde agar plakları 3 kez PBS ile (15 dakika) yıkanmıştır. Agar Kongo Kırmızısı ile boyandıktan sonra kuyu etrafında oluşan degradasyon zon çapları selülaaz etkinliğinin belirteci olarak değerlendirilmiştir (Ahmad vd. 2016).

3.2.2.6 Bakteriye 'Swimming' (dağılma) ve 'Swarming' (toplanma) hareketlerinin belirlenmesi

Salmonella biyofilmlerinde selüloz biyosentezinde rol alan c-di-GMP, bakteriye fizyolojinin çeşitli yönlerini kontrol eder. Çalışmada *bcsE* mutant suşları ile doğal tip suşların flagellaya bağlı yüzme ve toplanma motiliteleri değerlendirilmiştir. "Swarming" motilite flagellanın rotasyonu ile gerçekleşen çok hücreli yüzey hareketidir. "Swimming" motilite ise flagellanın rotasyonu ile desteklenen sıvı ya da akışkan ortamdaki bireysel harekettir (Henrichsen 1972, Mattick 2002).

"Swimming" hareketinin değerlendirilmesinde *Salmonella* suşları 37 °C'de bir gece LB agar besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde agar yüzeyinden tek koloni alınarak % 0,3 LB agar yüzeyine inoküle edilmiş ve sırasıyla 28 °C'de 5 saat, 37 °C'de 4 saat olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. "Swarming" hareketinin belirlenmesi için; suşlar benzer şekilde 37 °C'de bir gece boyunca LB agar besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde agar yüzeyinden tek koloni alınarak % 0,5 oranında glukoz ihtiva eden % 0,5 LB agar ortamına inoküle edilmiştir. Agar

plakaları sırasıyla 28 °C'de 5 saat ve 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnokülasyon bölgesinden “swimming” ve “swarming” bölgelerinin kenarına kadar oluşan yarıçap ölçülerek değerlendirme yapılmıştır (Ahmad vd. 2016).

3.2.3 BcsE proteinin klonlanması ve saflaştırılması

3.2.3.1 *bcsE* gen bölgesini içeren rekombinant plazmid eldesi

3.2.3.1.1 Genomik DNA izolasyonu

18 saat boyunca 37 °C'de geliştirilen aktif *Salmonella* kültürlerinden 1,5 mL hacim mikrosantrifüj tüplerine alınarak, 12000 rpm'de 2 dk süresince santrifüj edilmiştir. Üst sıvı ortamdan uzaklaştırılmış ve bakteri çökeltisi 567µL Tris-EDTA tamponu içerisinde çözülmüştür. Süspansiyon üzerine 30 µL % 10'luk SDS ve 3 µL proteinaz K (20mg/mL) aktarılıp 37 °C'de 1 saat tutulmuştur. İnkübasyon bitiminde ortama 100 µL 5M NaCl ilave edilmiştir. 80 µL CTAB/NaCl çözeltisinin ilavesinden sonra beyaz partikül yapısı oluşturuncaya kadar iyice karıştırılmış ve 65 °C'de 10 dakika tutulmuştur. Bu ortam üzerine 750 µL kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kesik pipet uçlarıyla yeni mikrosantrifüj tüplerine alınan üst faz üzerine 750 µL fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Burada oluşan üst faz üzerine 350 µL izopropanol eklenerek 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Son aşamada süpernatant atılmış ve pelet üzerine 350 µL % 70'lik etanol ilave edilerek, 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti 50 µL TE içerisinde çözülmüş ve nanodropta (NanoDrop 2000, Thermo, USA) genomik DNA saflığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.3.1.2 *bcsE* geninin PZR ile çoğaltılması

bcsE geni 1,5 kb büyüklüğünde olup 523 amino asitten oluşan BcsE proteinini kodlamaktadır. *bcsE* genine spesifik bölgenin çoğaltılması için tasarlanan primer

dizilerine restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri eklenmiş (Çizelge 3.10) ve PZR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.11, 3.12). PZR sonrasında, elde edilen ürünlerden 5 µL alınarak 1µL 6x yükleme boyası ile karıştırılmış ve % 1 oranında agaroz içeren jelde 100 V elektrik akımı altında koşturulmuştur. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacı ile 1 kb DNA Marker'dan (Fermentas, Finland) yararlanılmıştır. Elektroforez sonrası jeller, 0,2 µg/mL etidyum bromit (BioShop, Canada) çözeltisinde 20 dk süre ile boyama işlemine tabi tutularak ve 366 nm dalga boyunda UV ışık altında translüminatör kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). PZR ürünleri “Roche High Pure PCR Product” pürifikasyon kit protokolü uygulanarak saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.10 Primer dizileri

<i>bcsE</i>-N-ter-klon ileri primer	5'- ctcgaattctcggcatctcatcattatgg -3'
<i>bcsE</i>-N-ter-klon geri primer	5'- gaggtcgaccaatcgagggttcaggaa -3'

Çizelge 3.11 PZR içeriği

Nükleaz içermeyen su	36,75µL
Tampon (10X)	5 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
İleri Primer (10 pmol)	1 µL
Geri Primer (10 pmol)	1 µL
MgCl₂	3 µL
Taq DNA polimeraz	0,25 µL
DNA (40ng/µL)	2 µL

Çizelge 3.12 PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1 dk	30
Bağlanma	62 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	90 sn	
Son Uzama	72 °C	1 dk	1

3.2.3.1.3 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi

bcsE geninin aktarılacağı rekombinant vektörün hazırlanması için pET28a vektörünü içeren *E. coli* Dh5α hücreleri 25 µg/mL kanamisin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif kültürlerden plazmid izolasyonu Qiagen Spin Miniprep (#27106) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmid DNA % 0,7 agaroz jelde 80 V sabit elektrik akımı ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Molekül büyüklükleri, süper sarmal moleküler standartı (Sigma D5292) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve bu enzimlere ait tampon çözeltiler Sigma-Aldrich firmasından sağlanmıştır. Halkasal yapıda pET28a vektörü ve *bcsE* gen ürünlerinde yapışkan uç oluşturmak amacıyla, *SalI* ve *EcoRI* enzim kesimine tabi tutulmuştur. *SalI* ve *EcoRI* enzim kesim bölgeleri arasındaki uzaklık 13 baz çiftidir. PZR ürünü ve pET28a vektörü için restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri için Çizelge 3.13'te belirtilen reaksiyon karışımları kullanılmıştır. Enzim kesim reaksiyonları 37 °C'de 4 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bitiminde 65 °C'de 10 dakika inkübasyonla enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. DNA saflaştırması High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Chem. Co., USA) kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.13 Reaksiyon karışımı

Distile Su	14 µL	Distile Su	6 µL
RE Tamponu	2 µL	RE Tamponu	2 µL
Pürifiye <i>bcsE</i> ürünü	10 µL	pET28a	10 µL
<i>EcoRI</i> RE enzimi	2 µL	<i>EcoRI</i> RE enzimi	1 µL
<i>SalI</i> RE enzimi	2 µL	<i>SalI</i> RE enzimi	1 µL

3.2.3.1.4 DNA bağlanma reaksiyonu (Ligasyon)

Enzim kesimi yapılan PZR ürününün lineer hale getirilen pET28a ile rekombinasyonu ligasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. T4 ligaz enziminin kullanıldığı reaksiyonda toplam tampon çözeltisi 20 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ligasyon reaksiyonunda vektör/insert oranı 3/1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14 DNA bağlanma reaksiyonu karışımı

	DMC2	DMC4	Kontrol Grubu*
Distile Su	14,16 µL	14,21 µL	17 µL
T4 DNA ligaz Tamponu	2 µL	2 µL	2,5 µL
<i>bcsE</i>	0,34 µL	0,29 µL	-
pET28a	3 µL	1 µL	5 µL
T4 DNA Ligaz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL

*Kontrol grubu yalnızca vektör içermektedir.

3.2.3.1.5 *E. coli* BL21 suşuna rekombinant plazmid transformasyonu

Bu aşamada, pET28a vektörüne *bcsE* geni klonlanarak elde edilen rekombinant vektör *E. coli* BL21 suşuna transforme edilmiştir. 18 saat süre ile LB broth ortamında aktifleştirilen *E. coli* BL21 kültürleri 1/10 oranında dilue edildikten sonra $OD_{600}=0,4$ olana kadar inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon bitiminde kültürler 2 mL mikrosantrifüj tüplerine alınarak, 10000 rpm'de ve +4°C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırılarak pelet üzerine 1 mL soğuk dH₂O (+4°C) eklenmiş ve bu ortam 10000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Daha sonra üst faz uzaklaştırılmış ve pelet 50 µL soğuk dH₂O ile çözülerek kompetent hücreler elde edilmiştir. *bcsE* genini içeren rekombinant pET28a vektörü son konsantrasyonu 40 ng/µL olacak şekilde kompetent hücrelerin bulunduğu elektroporasyon küvetine (0,2 cm) aktarılmıştır. Elektroporasyon (1800 V) işleminden sonra bu ortamın üzerine 1 mL LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde 25 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra transformantlar katı besiyeri ortamından rastgele seçilmiş ve “High Pure Plazmid DNA Purification” (Roche Chem. Co., USA) kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle göre plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Seçilen transformantlardaki rekombinant plazmidlerin insert geni içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla PZR analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10-3.12). *bcsE* genini taşıyan plazmidlerin moleküler büyüklükleri % 1 agaroz jel sistemlerinde doğrulanmıştır.

3.2.3.2 BcsE proteininin saflaştırılması

Protein saflaştırma işleminde hareketsiz metal afinite kromatografisi (IMAC) yöntemi uygulanmıştır. Bu sistemde histidin işaretli hedef protein ile kolonda bulunan nikel metalleri arasında güçlü bir bağ oluşur. Bu sayede saflaştırılacak protein kolona tutunur. İmidazol ile muamele sonucunda hedef protein elde edilmiş olur (Cuatrecasas 1970). Saflaştırma işleminde elde edilen protein % 100 saf değildir. Kolon aşamasından sonra imidazolden arındırmak için D-salt kolonundan yararlanılmaktadır. Hedef proteinin

doğrulanmasında poliakrilamid jel elektroforezi ve hedef antijenin doğru antikora bağlanıp bağlanmadığını test etmek için Western blot teknikleri kullanılmaktadır.

Rekombinant BL21 (BL21^{Rc}) suşu izopropil-β-D-tiogalaktopiranozoid (IPTG) ile indüklenerek kültürler üretilmiş ve inkübasyon bitiminde 6500 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet, B-PER bakteriyel protein ekstraksiyon çözeltisi (Thermo Scientific, USA) içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika süresince rotatörde inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra HisPur Ni-NTA purifikasyon kiti (Thermo Scientific, USA) yöntem basamakları izlenerek poli-histidin işaretli proteinler saflaştırılmıştır. His-Tag'lı proteinin saflaştırılmasında, denge tamponu [PBS (20mM sodyum fosfat, 300mM sodyum klorit), 10mM imidazol; pH 7,4], yıkama tamponu [PBS (20mM sodyum fosfat, 300mM sodyum klorit), 25mM imidazol; pH 7,4] ve elüsyon tamponu [PBS (20mM sodyum fosfat, 300mM sodyum klorit), 250mM imidazol; pH 7,4] çözeltileri kullanılarak spin purifikasyon yöntemi uygulanmıştır.

Protokolün tüm aşamaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. B-PER (Thermo Scientific, USA) çözeltisi kullanılarak elde edilen lizat üzerine 1:1 oranda denge tamponu ilave edilmiştir. Karışım kolona aktararak, 1 saat rotatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde 700 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Sırasıyla yıkama tamponu ve elüsyon tamponu santrifüj edilerek kolondan geçirilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı steril tüplerde toplanmıştır. Protein saflaştırma işleminin son basamağında örnekler “Pierce Poliakrilamid Desalting” kolonu (Thermo Scientific, USA) yardımıyla imidazolden arındırılmıştır.

3.2.3.3 Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Rekombinant suşlarda BcsE protein ifadesini gözlemlemek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yönteminden yararlanılmıştır. 25 mg/mL kanamisin içeren 100 mL Terrific sıvı besiyeri içerisine 1/100 oranında seyreltilen aktif *E. coli* BL21^{Rc} suşları 37 °C'de OD₆₀₀=0,3-0,4 olana kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde besiyerine, son konsantrasyon 1mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

SDS-PAGE denemelerinde Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Yığma jel (% 5) ve ayırıcı jel (% 10) polimerizasyonundan sonra, plakalar Bio-Rad jel elektroforez tankında yerleştirilmiştir (Çizelge 3.15). 2X protein sample buffer ile 1:1 oranında iyice karıştırılan örnekler, 10µL olacak şekilde kuyulara aktarılmıştır. Prestain protein marker (Fermentas, SM1811) ise 5 µL olacak şekilde kuyulara aktarılmıştır. Örnekler 100 V akımda jelde yürütülmüştür. Yaklaşık 1,5 saat ayırıcı jelde yürütülen örnekler, jelin son kısmına ulaştığında, akım durdurulmuştur. Sistemden çıkarılan jel, 45 dakika fiksasyon çözeltisinde bekletildikten sonra, 1 gece Commasie Brilliant Blue çözeltisinde tutulmuştur. Boyanan jel, boya giderme çözeltisinde en az 2 saat bekletildikten sonra, beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek jel fotoğrafları alınmıştır.

Çizelge 3.15 % 5 Yığma jel ve % 10 Ayırıcı jel içerikleri

Yığma jel		Ayırıcı jel	
Jel yüzdesi	% 5	Jel Yüzdesi	% 10
% 30 poliakrilamid	850 µL	% 30 poliakrilamid	3,333 µL
1M Tris (pH6,8)	650 µL	1,5 Tris (pH8,8)	2500 µL
% 10 amonyum persülfat	50 µL	% 10 amonyum persülfat	100 µL
% 10 SDS	50 µL	% 10 SDS	100 µL
TEMED	5 µL	TEMED	10 µL
dH ₂ O	3400 µL	dH ₂ O	3947 µL
Toplam Hacim	5000 µL	Toplam Hacim	10000 µL

3.2.3.4 Western blot analizi

E. coli BL21 suşundan saflaştırılan BcsE proteini SDS-PAGE tekniği ile belirlendikten sonra, Western blot tekniği ile doğrulanmıştır. Öncelikle jel boyutunda Immun-Blot PVDF (poliviniliden difluorid) membran kesilmiştir. Membran % 100 metanol içerisinde 5 dakika süresince çalkanarak re-hidrasyonu sağlanmıştır. Transfer tamponu içerisinde kağıtlar, jel ve membran birlikte çalkalanmıştır. Akım yönüne göre (eksiden artıya) transfer kaseti oluşturulmuştur. Transfer için 90 dk süresince 100 V akım

uygulanmıştır. Transfer işlemi gerçekleştikten sonra membran bloklama solüsyonuna [20mM Tris, 150 mM NaCl, % 5 Bovine Serum Albumin (BSA)] alınarak, soğuk odada bir gece boyunca çalkalanmıştır. Bloklanan membran 1:2000 oranında primer antikor (His-Tag Rabbit Ab) çözeltisi ile bir saat süresince muamele edilmiştir. Primer antikor uygulamasını takiben membran yıkama solüsyonunda [20mM Tris, 150 mM NaCl, % 0,05 Tween 20, pH 7,5 (TBS-T)] oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra membran 1:2000 oranında sekonder antikor (Anti-mouse IgG) çözeltisinde 1 saat muamele edilmiştir. Sekonder antikor uygulamasını takiben membran TBS-T yıkama solüsyonunda, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 3 kez yıkanmıştır. Kemilüminesans görüntüleme için reaktifler 1:1 oranında karıştırılarak substrat hazırlanmıştır. LI-COR 2800 (USA) sistemleri kullanılarak görüntüler alınmıştır.

3.2.3.5 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

BALB/c fareleri immunize etmek için saflaştırılan BcsE protein konsantrasyonunun belirlenmesinde Pierce™ BCA Protein Assay Kitinden (Thermo Scientific, USA) yararlanılmıştır. Bu kit; total proteinin kolorimetrik tespiti ve kantitasyonu için bisinkoninik asit bazlı formülasyona sahiptir. Standart olarak bovin serum albümin (BSA) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre 0-2000 µg/mL aralığında BSA konsantrasyonları ve standart çalışma reaktifi hazırlanmıştır (50:1). 96 kuyulu mikrotitre plakalara standart çözeltisi ve ölçülecek protein örnekleri ikişer paralel olacak şekilde 25 µL eklenmiş ve daha sonra 200 µL çalışma reaktifi aktarılmıştır. Mikrotitre plaka 30 saniye çalkalandıktan sonra 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde örneklerin, 562 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda, absorbansı ölçülmüştür. Konsantrasyonu bilinen BSA standartlarından elde edilen standart eğri ile, immünizasyon çalışmasında BALB/c farelere uygulanacak protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.4 Poliklonal antikor eldesi

Poliklonal antikor üretimi amacıyla 6-8 haftalık 2 adet erkek fare kullanılmıştır. Farelerde immunizasyon yanıtını arttırmak için rekombinant BcsE proteini (50µg/mL)

ve immüno stimulant ODN₁₄₆₆ ve ODN₁₅₅₅ adjuvanları ile (40 µg/mL) emülsiyon haline getirilmiştir. Bu emülsiyon 14. ve 28. günlerde farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon öncesi farelerin kuyruk damarından kan alındı ve serum daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Benzer şekilde 2. ve 4. haftalarda enjeksiyon sonrası serum örnekleri toplanmıştır (Xie vd. 2005).

Her kanatmadan sonra toplanan kan örnekleri 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir ve 2000 g'de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen serum örneklerinden total IgG, IgG1 ve IgG2a immunizasyonu ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

3.2.4.1 Anti BcsE IgG ELISA

BcsE protein örnekleri son konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde 50 µL PBS tamponu içerisinde PVC mikrotitre plak kuyulara aktarılmış ve oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bitiminde kuyular 3 kez % 0,1'lik PBS-T ile yıkanmış ve % 5 BSA ilavesi ile bloklanmıştır. Serum örneklerinin, 7X oranında, 50 µL hacmi aşmadan dikey ekseninde 8 kat seri dilüsyonları yapılarak kuyulara aktarılmıştır. Dilüsyon işleminden sonra bu ortamlar oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bitiminde kuyular 3 kez % 0,1'lik PBS-T ile yıkanmıştır. Alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş total IgG, IgG1 ve IgG2a antikorları son konsantrasyonu 1 µg/mL olacak şekilde T-cell tamponunda (% 0,5 FBS, % 0,05 Tween-20, 1X PBS) kuyulara ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bitiminde örnekler ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunarak sonuçlar alınmıştır.

3.2.4.2 Poliklonal antikor- antijen spesifitesinin incelenmesi

Saflaştırılan BcsE proteini, DMC2, DMC4, ΔDMC2, ΔDMC4, *E. coli* BL21, *S. aureus*, *E. faecalis* suşları, 2X laemmli tamponu ile hazırlanmış ve yukarıda açıklanan Western blot tekniği uygulanarak görüntülenmiştir.

3.2.4.3 Akış sitometresi ile poliklonal antikor-bakteri spesifitesinin belirlenmesi

Bakteriyel kültürlerin BcsE aşılamaından sonra elde edilen poliklonal antikorlara bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek için “Lightning-Link PE-Cy5 Tandem konjugasyon Kit” (Innova Bioscience)” kullanılarak poliklonal antikorlar işaretlenmiştir. Kit protokolü izlenerek 10 µL poliklonal antikora 1 µL “Lightning-Link” tamponu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında 3 saat antikor konjugasyonuna bırakılmıştır. Bakteri hücreleri 10^3 kob/mL olacak şekilde seyreltikten sonra 13300 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çökelti Faks tamponu ile 100 µL'ye tamamlanmıştır. İşaretlenen poliklonal antikorlar 1:100 oranında bakteri süspansiyonuna eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Antikorların doğal tip ve *bcsE* mutant bakteri hücrelerine bağlanıp bağlanmadığı akış sitometresi (ACEA, Biosciences NovoCyte 3000, USA) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.5 BALB/c enfeksiyon modeli

Doğal tip (DMC2-DMC4) ve mutant (Δ DMC2- Δ DMC4) bakteriyel suşlar kullanılarak 6-8 haftalık erkek BALB/c farelerde rekabet deneyi gerçekleştirilmiştir. 37 °C' de çalkalamalı koşullarda aktiveleştirilen kültürler 1:1 oranında PBS ile karıştırılarak 10^6 hücre/100µL intraperitoneal olarak farelere uygulanmıştır. Uygulamanın 1. ve 3. günlerinde dalak ve karaciğerler toplanarak PBS içerisinde homojen hale getirilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar agar plak yüzeyine ekilerek rekabetçi indeks hesaplanmıştır (Beuzon ve Holden 2001). Deneylerde;

- Kontrol grubu (n=5): 100 µL PBS
- Enfekte grup (n=5): 10^6 hücre/100 µL doğal tip suş DMC2 ve Δ DMC2
- Enfekte grup (n=5): 10^6 hücre/100 µL doğal tip suş DMC4 ve Δ DMC4, olarak hazırlanmıştır (Beuzon ve Holden 2001).

3.2.6 İnsan Epitel Hücreleri İnvazyon Deneyi

İnsan epitel hücre hattı HT-29 (kolon, kolorektal adenokarsinom) RPMI besiyerine 2mM L-Glutamin, % 1 Penisilin/Streptomisin, % 10 FBS eklenerek % 5 CO₂ ve 37 °C'de 24 kuyulu plaklarda inkübe edildi.

10⁶ kob/mL doğal tip ve mutant hücreler; epitel hücre (10⁵) hattının üzerine ekilmiş ve 1 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Enfeksiyondan 1 saat sonra hücre dışı bakterileri öldürmek için 100 µg/mL gentamisin içeren besiyeri ortama ilave edilmiştir. Hücreler % 1 Triton X-100 içeren PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra hücre içi bakterilerin sayısı agar plaklar üzerinde koloni oluşturan birim olarak belirlenmiştir (Steele-Mortimer 2008).

Bu yönteme ek olarak doğal tip ve mutant suşlar yeşil floresan boya olan SP-DiOC (5µg/mL) ile etiketlenmiştir. Akış sitometresinde propidyum iyodür (2µg/mL) ile canlılık tespiti yapılarak 2x10⁶ kob/mL bakteriyel hücre /epitel hücre (10⁵) hattının üzerine ekilmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. Enfeksiyondan 1 saat sonra hücre dışı bakterileri uzaklaştırmak ve öldürmek için kuyular 3 kez PBS ile yıkanmış ve üzerine 100 µg/mL gentamisin içeren besiyeri ilave edilmiştir. Bu ortam tekrar PBS ile yıkandıktan sonra hücre içerisine invaze olan bakterilerin floresan yoğunluğu akış sitometresi kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür.

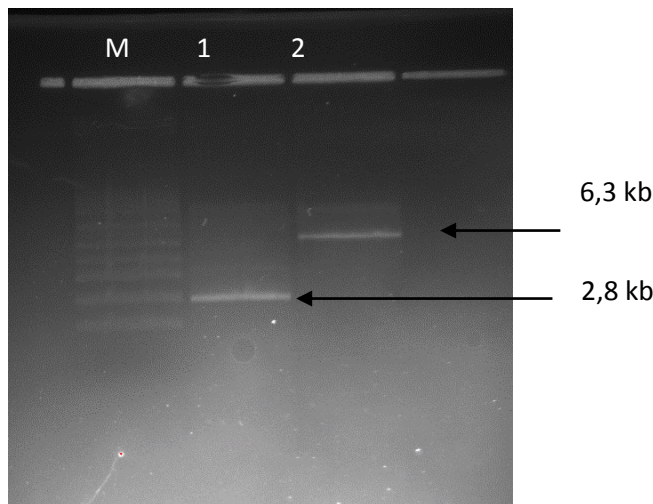
3.3 İstatistikî Analizler

İstatistikî analizler GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerden elde edilen sonuçların “F” değeri esas alınarak, gruplar arası farkların istatistikî açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası varyasyonların değerlendirmesinde Tukey doğruluk testinden yararlanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

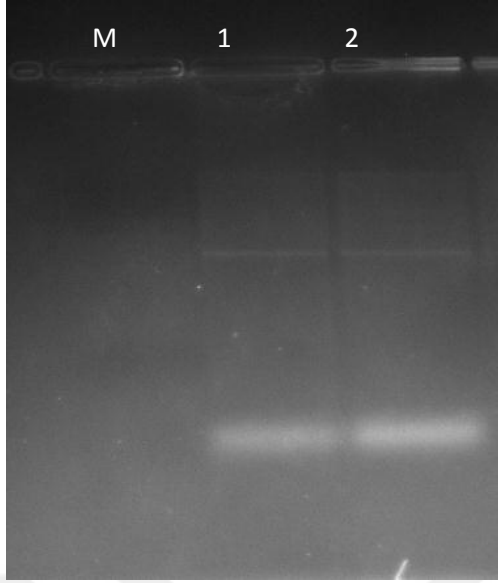
4.1 Kloramfenikol Gen Kaseti İnsersiyonu ile *bcsE* Mutasyonlarının Oluşturulması

Tez çalışmamız kapsamında ilk aşamada *Salmonella* biyofilmlerinde selüloz biyosentezinde rol alan c-di-GMP bağlanma proteini olan *bcsE* geninin Red rekombinaz temelli mutasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedeflenen gen ile homoloji gösteren kromozomal genlerin bozulmasına dayanan bu yöntemde rekombinasyon için düşük kopya sayısına sahip, sıcaklık duyarlı pKD46 plazmidi *E. coli* DH5α hücrelerinden izole edilmiştir (Şekil 4.1). Bu plazmid üzerinde indüklenebilir bir promotorun kontrolü altında sentezlenebilen λ fajı red rekombinaz sistemi bulunmaktadır. İzole edilen pKD46 plazmidi *bcsE* mutasyonunun gerçekleştirileceği *S. Typhimurium* DMC4, *S. Grup C1* DMC2 suşlarına aktarılmış ve suşlarda plazmid varlığı doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Gen inaktivasyonu için FRT (FLP tanıma hedefi) bölgeleri ile bağlantılı olan kloramfenikol direnç plazmidi (pKD3) ise *E. coli* MZ2997 hücrelerinden izole edilmiştir (Şekil 4.1). Homolog bölgeleri içeren fonksiyonel kloramfenikol kasetinin eldesi için pKD3 plazmidi kalıp olarak kullanılmıştır. *bcsE* gen bölgesine homolog 50 nükleotit uzunluğunda primer baz dizileri kloramfenikol kasetinin 5' uçlarına PZR ile eklenmiştir (Şekil 4.3).



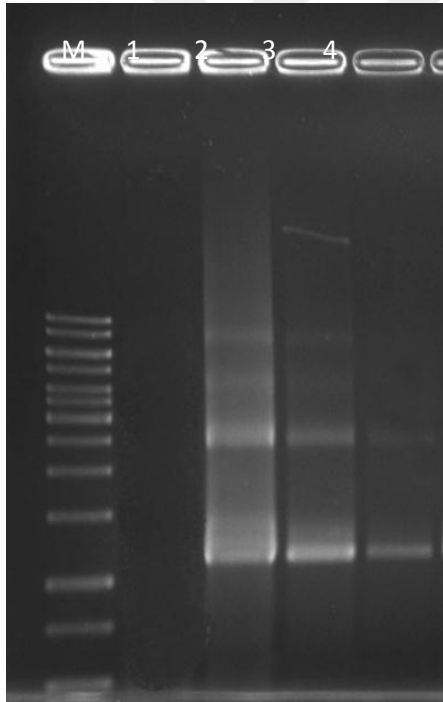
Şekil 4.1 pKD3 ve pKD46 plazmidlerinin jel görüntüsü

M: Süper Sarmal marker, 1: pKD3, 2: pKD46.



Şekil 4.2 *Salmonella* suşlarında pKD46 plazmidinin varlığının tanısı

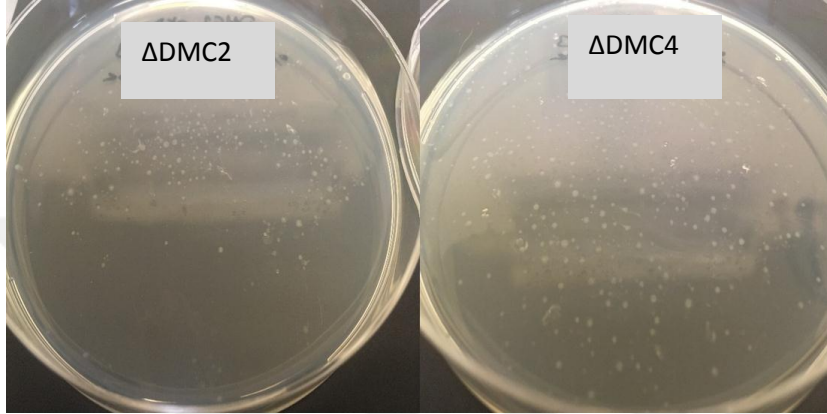
M: Süper Sarmal marker, 1: *S. Grup C1 DMC2*, 2: *S. Typhimurium DMC4*.



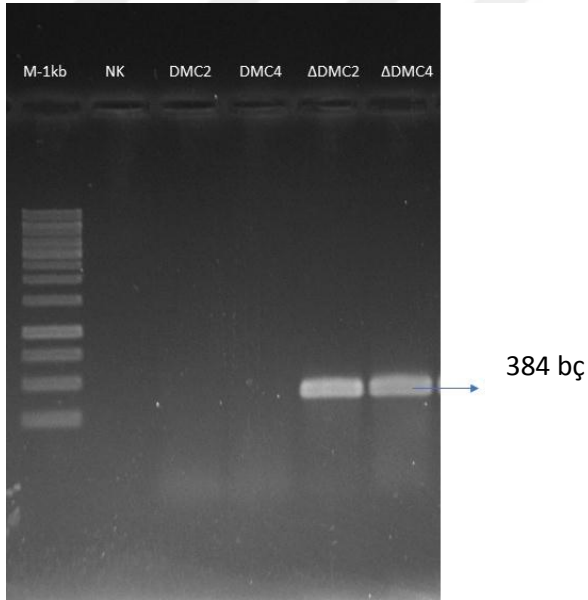
Şekil 4.3 *bcsE* mutasyon primeri kullanılarak elde edilen kloramfenkol kaseti

M: 1 kb Marker; 1: Negatif Kontrol; 2: *bcsE* mutasyon primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünü; 3: *bcsE* mutasyon primeri kullanılarak elde edilen saflaştırılmış PZR ürünü; 4: *bcsE* mutasyon primeri kullanılarak elde edilen saflaştırılmış PZR ürününün DpnI enzim kesimi sonrası jel görüntüsü

Homolog bölgeleri içeren fonksiyonel kloramfenikol kasetinin, bu aşamadan sonra pKD46 plazmidi içeren *Salmonella* suşlarına transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). Kloramfenikol içeren agar ortamında gelişen mutant suşlar ile, kloramfenikol gen kasedini çoğaltan primerler kullanarak koloni PZR gerçekleştirilmiş ve gen kaseti çoğaltılarak mutasyon doğrulanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 *Salmonella* GrupC1 ΔDMC2 ve *Salmonella* Typhimurium ΔDMC4 hücreleri

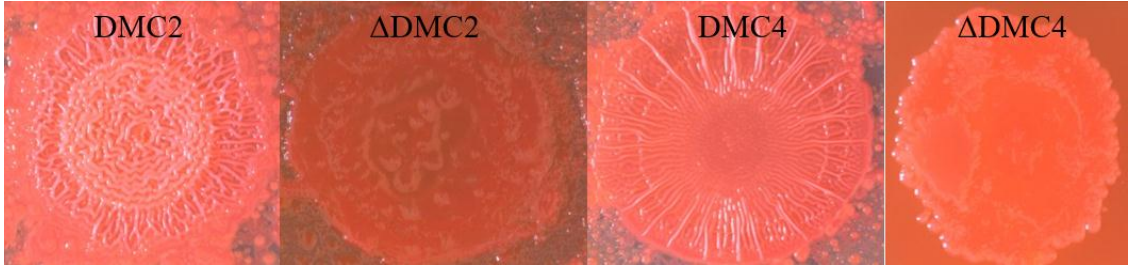


Şekil 4.5 *bcsE* geninde mutasyon oluşturmak amacı ile tasarlanan kloramfenikol gen kaseti primerleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PZR sonrası elde edilen jel görüntüsü

4.2 *bcsE* Mutantlarının Fenotipik Değerlendirilmesi

4.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde *bcsE* mutant suşlarının biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi

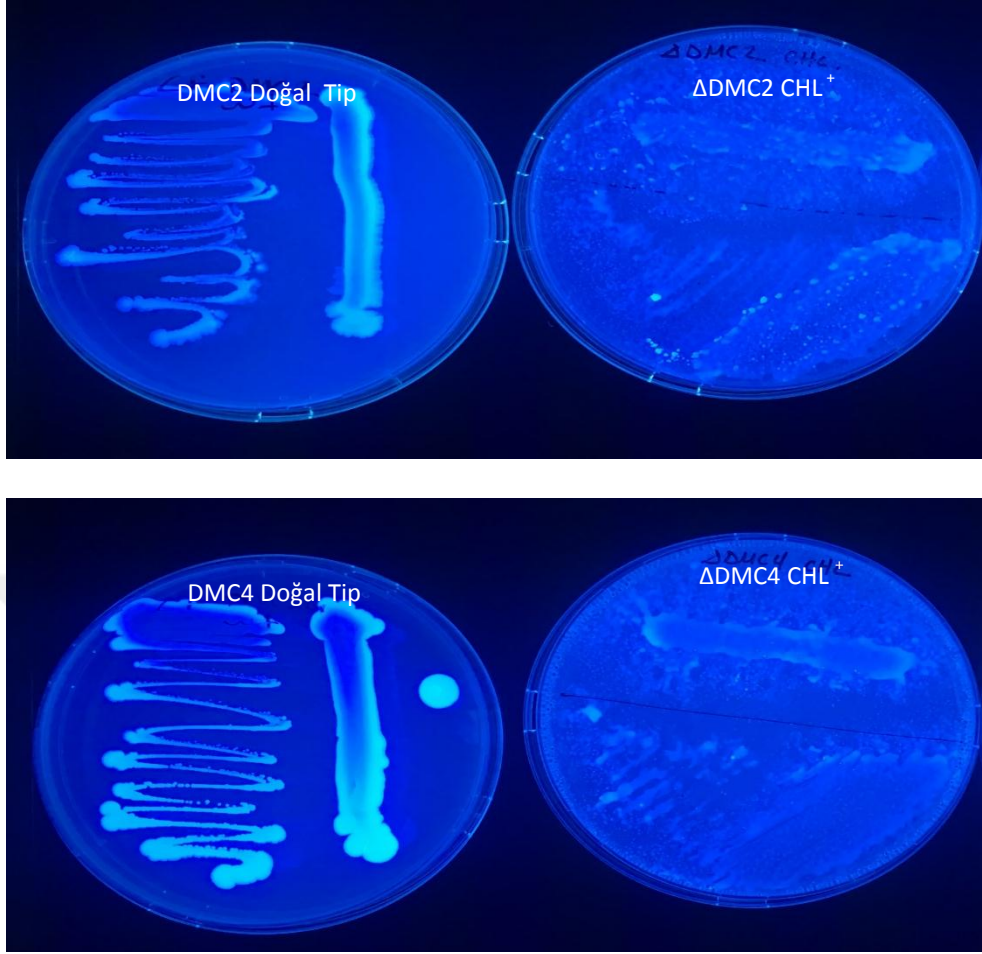
Suşların ürettiği biyofilmlerin morfotipleri; biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz bulunduran “rdar” (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran “bdar” (kahverengi, kuru ve pürüzlü), yalnızca selüloz bulunduran “pdar” (pembe, kuru ve pürüzlü) ve her ikisini de bulundurmeyen “saw” (düz ve ıslak) olmak üzere kategorize edilmiştir. Doğal tip *S. Typhimurium* DMC4, *S. Grup C1* DMC2 suşlarının oluşturduğu biyofilmlerin “rdar” morfotipinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). Denemeden elde edilen sonuçlara göre *bcsE* geni bakımından mutant olan *Salmonella* suşlarının oluşturdukları biyofilm yapılarının dağılma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Bu yapı “bdar” biyofilm morfotipine benzemektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *S. Grup C1* DMC2 ve *S. Typhimurium* DMC4 doğal tip suşlarının ve *bcsE* mutantlarının biyofilm yapılarının stereo mikroskop görüntüleri

4.2.2 Kalkoflor bağlanma uygulaması

Salmonella suşlarının selüloz üretiminin belirlenmesi amacı ile kalkoflor denemesi gerçekleştirilmiştir. 366 nm UV ışık altında incelenen Petri plaklarında üreyen doğal tip *Salmonella* suşları selüloz üretimlerinden dolayı kuvvetli floresan ışımaya vermişlerdir (Şekil 4.7). *bcsE* mutant fenotipini doğrulamak için gerçekleştirilen denemede; β -1,4 glikozidlerine bağlanan floresans boyanın *bcsE* mutantlarında doğal tip suşlara kıyasla büyük ölçüde azaldığı saptanmıştır. Bu durum selüloz üretiminin mutantlarda büyük ölçüde düştüğüne işaret etmektedir (Şekil 4.7).



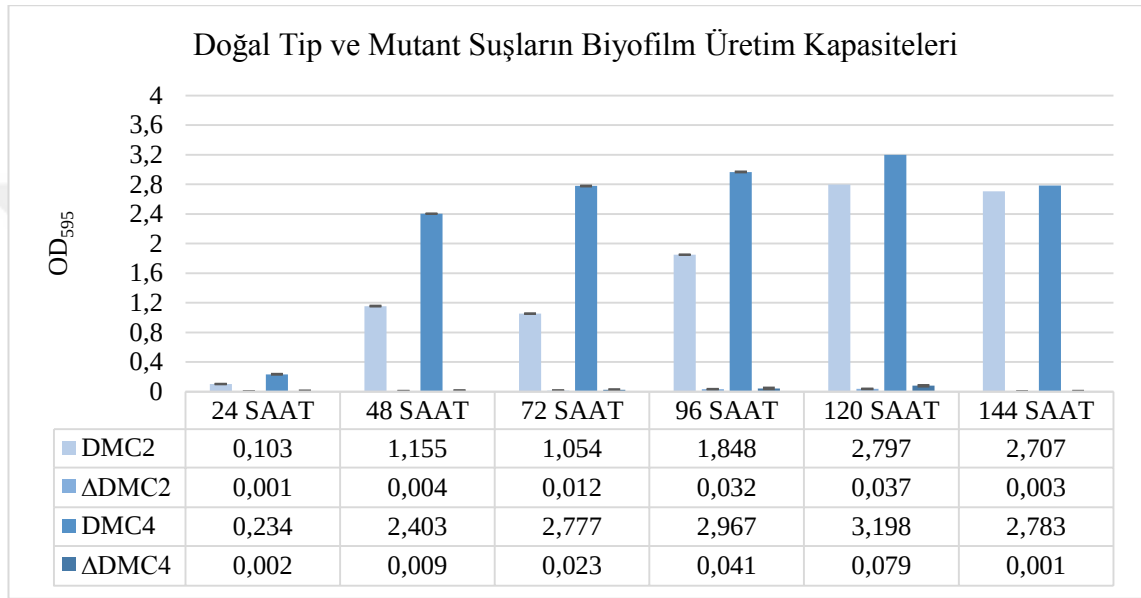
Şekil 4.7 Doğal tip ve mutant DMC2 ve DMC4 suşlarının kalkoflor bağlanma denemeleri

4.2.3 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi

Salmonella izolatlarının polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilmiştir. Yöntemde negatif kontrol üzerinden ‘cut-off OD’ (OD_c) hesaplandıktan sonra, suşlar biyofilm üretimi bakımından değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

S. Grup C1 DMC2 ve *S. Typhimurium DMC4* doğal tip suşlarının ve *bcsE* mutantlarının mikrotitre plaklarda farklı günlerde oluşturdıkları biyofilm miktarları Şekil 4.8’de verilmiştir. Elde edilen verilere ve hesaplanan eşik değerlerine göre; maksimum biyofilm üretimi her iki serotip için de 120 saat olarak belirlenmiştir. 120 saat sonunda *S. Grup C1 DMC2* suşunun $OD_{595}=2,797$ ve *S. Typhimurium DMC4*

suşunun ise $OD_{595}=3,198$ değerleri ile güçlü biyofilm üreticileri oldukları saptanmıştır. İnkübasyon süresi uzadıkça biyofilm üretim miktarlarında azalma meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra, *bcsE* bakımından mutant olan her iki serotipin de denenen tüm inkübasyon periyotlarında biyofilm üretmedikleri belirlenmiştir. Mutant ve doğal tip suşlar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ve Tukey testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. ($P<0,05$).



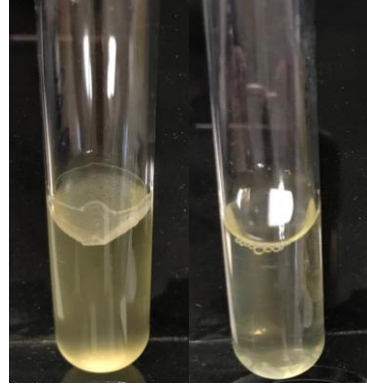
Şekil 4.8 Doğal tip ve mutant *Salmonella* suşlarının biyofilm üretim kapasiteleri

4.2.4 Pelikül oluşturma özelliklerinin değerlendirilmesi

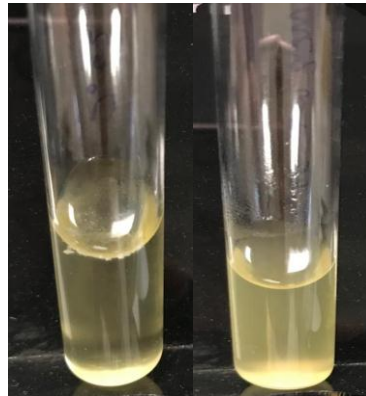
Çalışmamız kapsamında denemeye alınan *Salmonella* suşlarının 37 °C'de sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Ancak 20 °C'de pelikül oluşturma özellikleri incelenen *bcsE* mutant ve doğal tip *Salmonella* suşlarının pelikül oluşturma kabiliyetlerinde farklanmalar meydana gelmiştir. Doğal tip suşlarda 20 °C'de oldukça dayanıklı (rigid) yapıda biyofilm ve halka yapısı tanımlanmıştır. Mutant suşların ise aynı sıcaklıkta pelikül oluşturmadığı saptanmıştır (Şekil 4.9-4.12).



Şekil 4.9 *S. Group C1 DMC2* doğal tip ve *DMC2 $\Delta bcsE$* suşlarının 20 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı



Şekil 4.10 *S. Typhimurium DMC4* doğal tip ve *DMC4 $\Delta bcsE$* suşlarının 20 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı



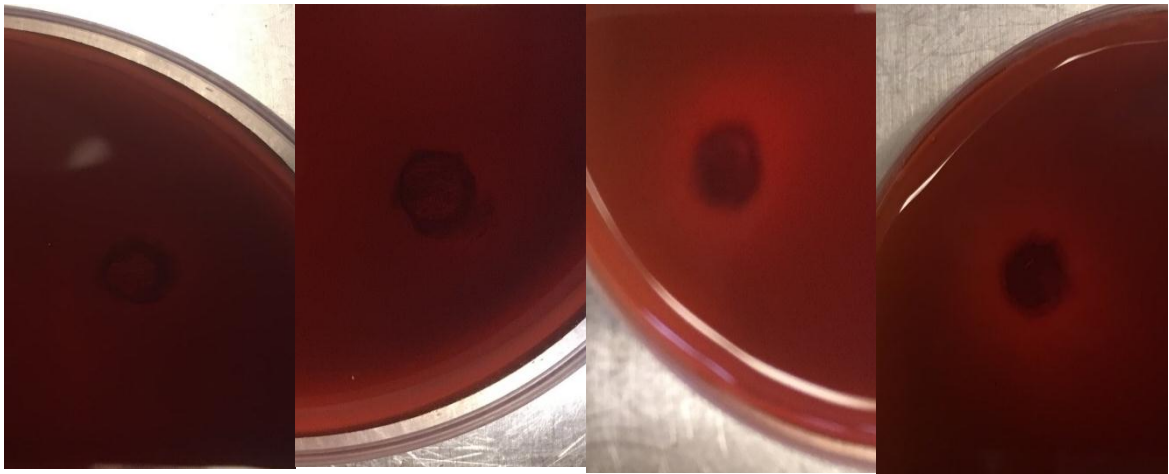
Şekil 4.11 *S. Group C1 DMC2* doğal tip ve *DMC2 $\Delta bcsE$* suşlarının 37 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı



Şekil 4.12 *S. Typhimurium* DMC4 doğal tip ve DMC4 $\Delta bcsE$ suşlarının 37 °C'de oluşturduğu pelikül yapısı

4.2.5 Selülaaz aktivitesinin değerlendirilmesi

Selülaaz aktivitesinin değerlendirilmesinde, mutant ve doğal tip *Salmonella* kültürleri % 5 oranında karboksimetil selüloz içeren besiyerinde inkübe edilerek, agar kuyu difüzyon testi uygulanmıştır. Kongo kırmızısı ile boyanan agar plaklarında kuyu etrafında oluşan halkanın varlığı veya yokluğuna göre selülaaz etkinliği değerlendirilmiştir. DMC2 ve DMC4 doğal tip suşlarının kuyu etrafında oluşturdukları sarı halkalar karboksi metil selülazın parçalanmasının, yani selülaaz aktivitesinin varlığını kanıtlamıştır. Δ DMC2 ve Δ DMC4 suşlarda ise agar yüzeyinde selülaaz aktivitesi tespit edilmemiştir (Şekil 4.13).



Δ DMC2

Δ DMC4

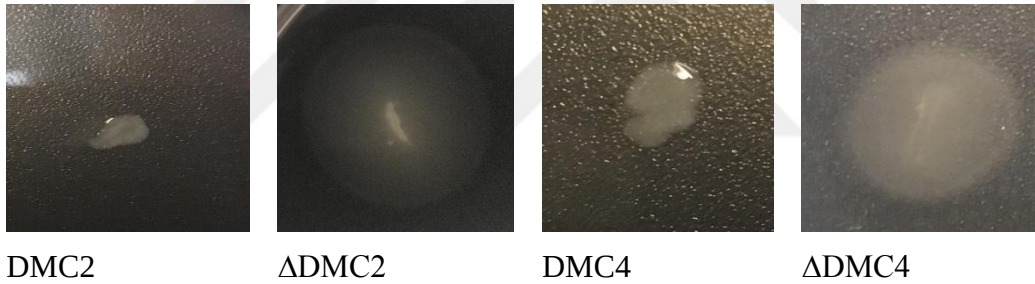
DMC2

DMC4

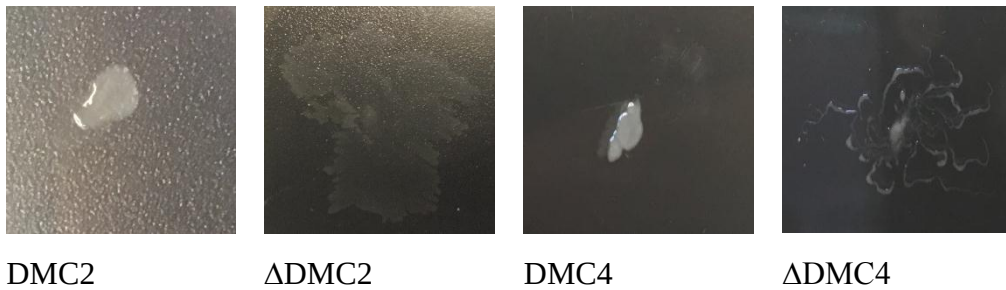
Şekil 4.13 Doğal suş ve mutantların selülaaz aktiviteleri

4.2.6 Bakteriyel “Swimming” ve “Swarming” hareketlerinin belirlenmesi

Flagellaya bağı “Swarming” (bakteriyel popülasyonun katı veya yarı katı ortamlarda koordineli bir şekilde translokasyonu, çok hücreli hareket) ve “Swimming” (sıvı ortamlarda ya da yarı katı yüzeylerde bakterilerin flagella aracılığı ile gerçekleştirdiği ve aynı popülasyonun diğer bireyleri ile koordine edilmemiş hareket, bireysel hareket) motilitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen denemede sonuçlar; agar plakalarındaki inokülasyon bölgesinden yüzme ve toplanma bölgesinin kenarına kadar oluşan yarıçap ölçülerek değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, her iki *bcsE* mutantının da doğal tip suşlara kıyasla “Swimming” ve “Swarming” hareketlerini daha yoğun olarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan her iki doğal suş içinde belirgin bir “swarming” ve “swimming” hareketi tanımlanamamıştır (Şekil 4.14, 4.15) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.14 Denemede kullanılan doğal suş ve mutantlarda “Swimming” hareketi



Şekil 4.15 Denemede kullanılan doğal suş ve mutantlarda “Swarming” hareketi

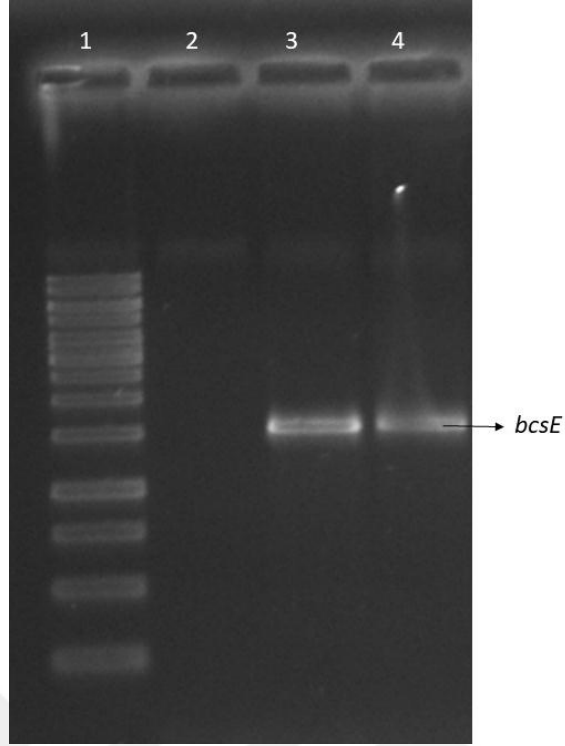
Çizelge 4.1 “Swimming” ve “Swarming” hareket zon çapı ortalamaları

	ADMC2	ADMC4
“Swimming” motilite	17,5 mm	11,75 mm
“Swarming” motilite	19,25 mm	13 mm

4.3 BcsE Proteinin Saflaştırılması

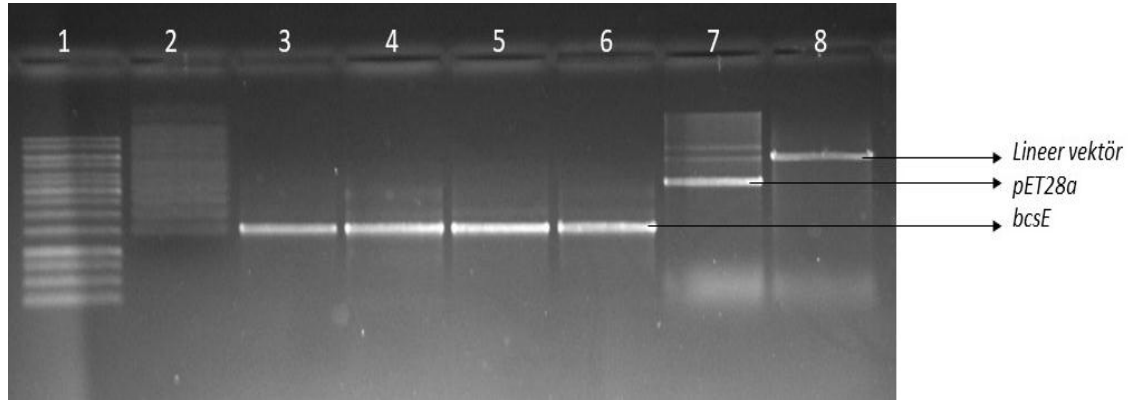
4.3.1 *bcsE* gen bölgesini içeren rekombinant plazmid eldesi

bcsE geni 1,5 kb büyüklüğe sahip 523 amino asitden oluşan BcsE proteinini kodlamaktadır. Çalışmada selüloz biyosentezi yolağında görevli BcsE proteininin saflaştırılması için *bcsE* geni pET28a vektörüne klonlanmıştır. Bu aşamadan sonra restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri içeren *bcsE* genine spesifik primerler kullanılarak PZR gerçekleştirilmiş ve PZR ürünleri saflaştırılarak agaroz jelde koşturulmuştur (Şekil 4.16). Klonlamanın yapılacağı halkasal yapıda olan vektör (pET28a) ve çoğaltılan *bcsE* gen bölgesi yapışkan uç oluşturmak amacı ile restriksiyon enzim kesimine tabi tutulmuş ve saflaştırılmıştır. Restriksiyon enzim kesim sonrası vektör, agaroz jelde yaklaşık 5,4 kb büyüklüğünde lineer DNA olarak görüntülenmiştir. *bcsE* geni ise agaroz jelde 1,5 kb'lık bölgede bant oluşturmuştur (Şekil 4.17, 4.18).



Şekil 4.16 *bcsE* genine özgü primerler ile gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

1: 1kb Marker, 2: PZR negatif kontrol, 3: DMC2 *bcsE* geni, 4: DMC4 *bcsE* geni

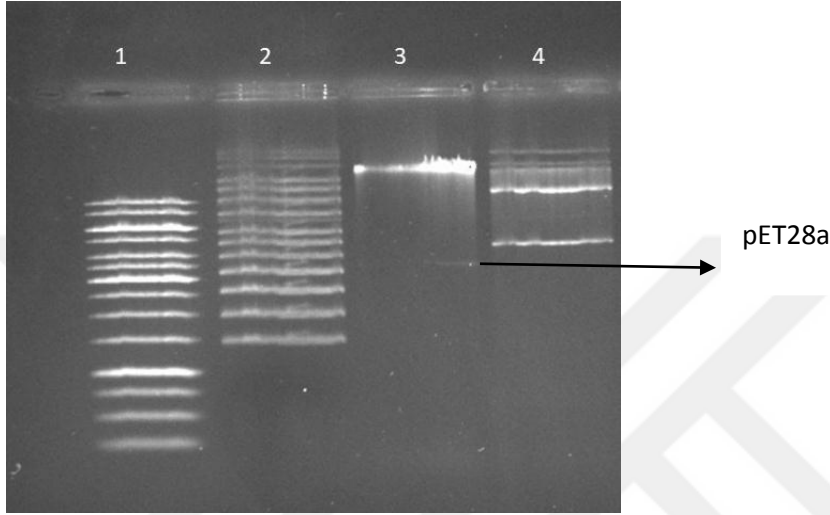


Şekil 4.17 pET28a plazmid vektörü ve *bcsE* geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ortamlarında elde edilen DNA örneklerinin agaroz gel görüntüsü

1: 1kb DNA marker, 2: Super sarmal marker, 3-4: DMC2 *bcsE* geninin *EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesimi, 5-6: DMC4 *bcsE* geninin *EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesimi, 7: pET28a plazmid vektörü, 8: pET28a plazmid vektörünün *EcoRI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile kesimi

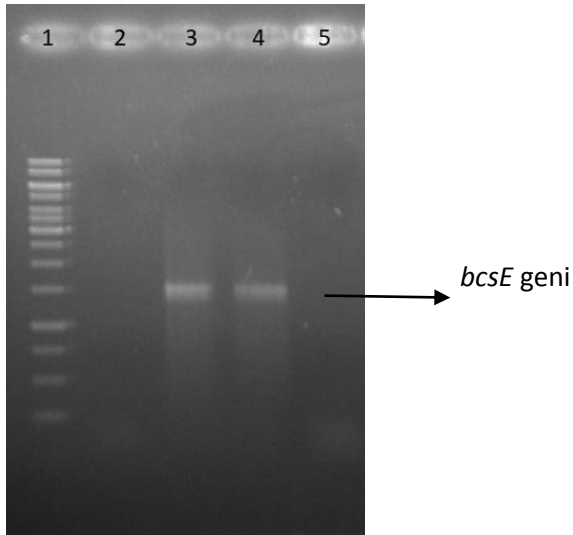
Kesim yapılan PZR ürünü ve lineer hale getirilen vektör, rekombinant plazmid elde edebilmek için ligasyon reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Safılaştırılan ligasyon karışımları

E. coli BL21 suşuna transforme edilmiştir. Seçici besiyeri ortamından seçilen transformantlarda *bcsE* genini içeren 6,9 kb büyüklüğündeki rekombinant plazmidin varlığı; plazmid izolasyonu sonrası, %1 agaroz jel üzerinde elektroforetik hareketlilik kontrol edilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.18). Rekombinant plazmidlerin insert geni içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla PZR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.18 *E. coli* BL21^{Rc} suşlarından izole edilen rekombinant plazmid jel görüntüsü

1: 1kb DNA marker, 2: Supersarmal marker, 3: pET28a plazmid vektörü, 4: BL21^{Rc} suşunun *bcsE* genini içeren pET28a plazmid DNA'sı

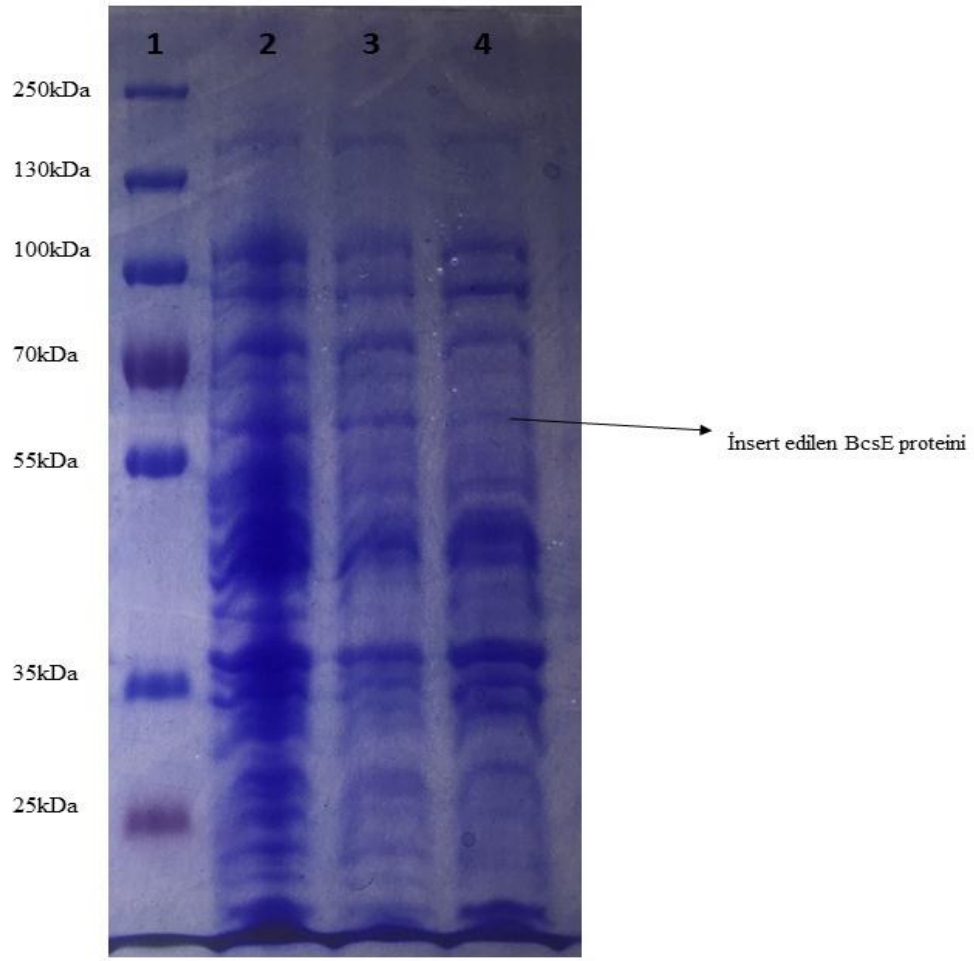


Şekil 4.19 Rekombinant plazmid DNA'dan PZR ile çoğaltılan *bcsE* geni

1: 1 kb DNA Marker, 2: PZR negatif kontrol, 3: BL21^{Rc} suşunun plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan *bcsE* geni, 4: BL21 suşunun genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan *bcsE* geni (pozitif kontrol), 5: BL21 suşunun plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan *bcsE* geni (negatif kontrol)

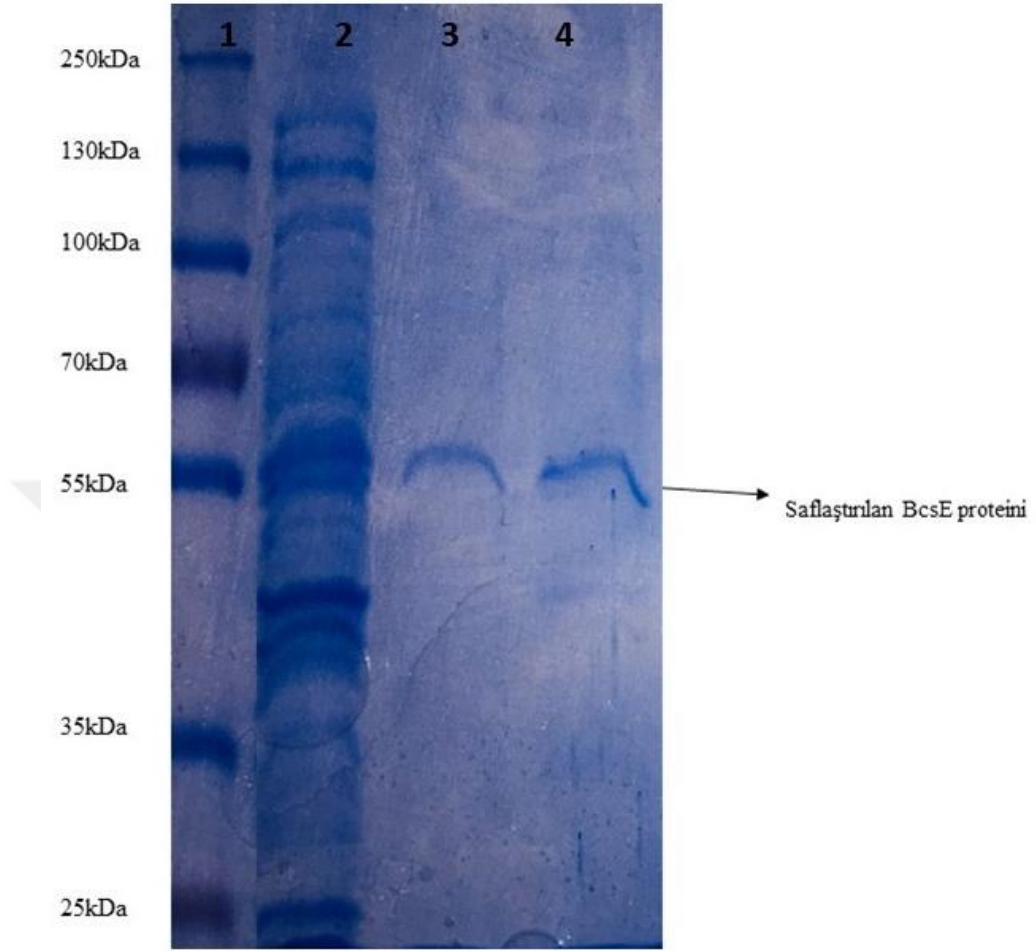
4.3.2 BcsE proteininin saflaştırılması

Rekombinant BL21 (BL21^{Rc}) suşundan BcsE proteininin saflaştırma işleminde, en çok tercih edilen, hareketsiz metal afinite kromotografisi (IMAC) yöntemi uygulanmıştır. Bu sistemde histidin işaretili hedef protein ile kolonda bulunan nikel metalleri arasında güçlü bir baē oluşur. Bu sayede saflaştırılacak protein kolona tutunur. İmidazol ile muamele sonucunda hedef protein elde edilmiş olur (Cuatrecasas 1970). Saflaştırma işleminde elde edilen protein % 100 saf olmadıēından, kolon aşamasından sonra imidazolden arındırmak için D-salt kolonundan yararlanılmıştır. Hedef proteinin doērulanmasında sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (şekil 4.20, 4.21). Ayrıca hedef antijenin doēru antikora baēlanıp baēlanmadıēını test etmek için Western blot tekniēi uygulanmıştır. Elde edilen jel paterni 59 kDA byklēindeki saf BcsE proteinini göstermektedir (şekil 4.22).



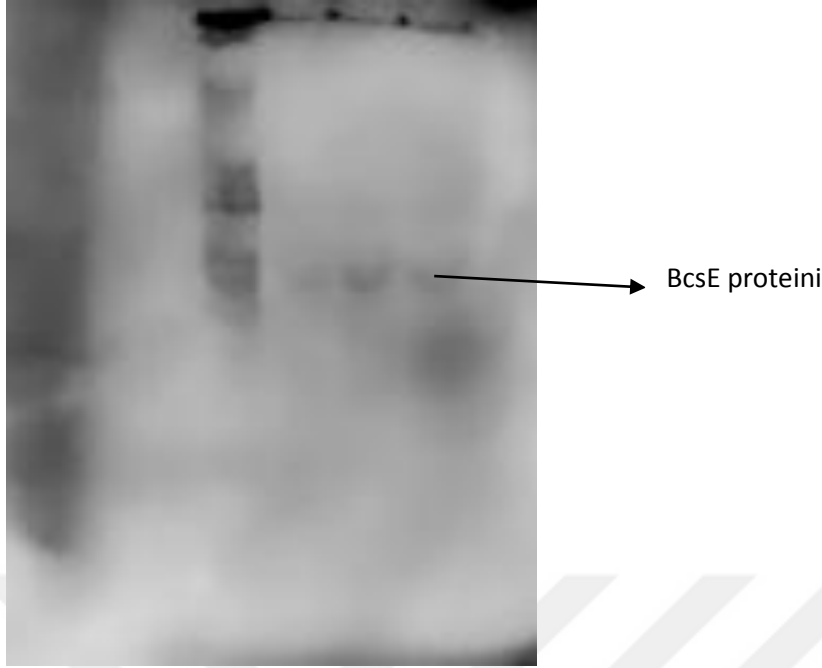
Şekil 4.20 İndüklenen ve indüklenmeyen suşların protein profillerinin SDS-PAGE jel görüntüsü

1: Prestained protein marker, 2: IPTG içeren besiyerinde gelişen BL21^{Rc} suşunun protein profili, 3: IPTG içermeyen besiyerinde gelişen BL21^{Rc} suşunun protein profili, 4: BL21 suşunun protein profili



Şekil 4.21 BcsE proteininin safııştırma işleminden sonraki SDS-PAGE jel görüntüsü

1: Prestained protein marker, 2: Denge tamponu ile muamele edilmiş  rnek, 3: Yıkama tamponu ile muamele edilmiş  rnek, 4: Elüsyon  rneği



Şekil 4.22 Saf BcsE proteininin Western Blot görüntüsü

1: BcsE elüsyon örneği, 2: BcsE elüsyon örneği, 3: Yıkama tamponu ile muamele edilmiş örnek, 4: İndüklenmiş lizat

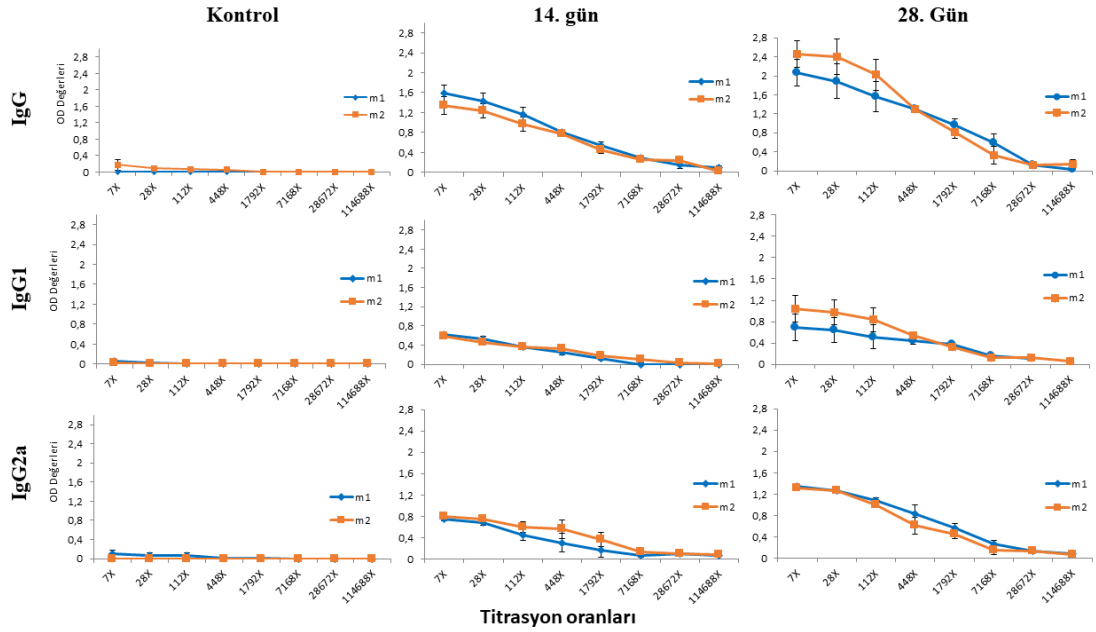
BALB/c fareleri immunize etmek için saflaştırılan BcsE protein konsantrasyonunun belirlenmesinde, Pierce™ BCA Protein Assay Kitinden (Thermo Scientific, USA) yararlanılmıştır. 562 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbansı ölçülmüş ve elüsyon örneklerin konsantrasyonları sırasıyla 1031 ve 1148 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar immünizasyon denemeleri için yeterli olduğu için, poliklonal antikor eldesi çalışmalarına geçilmiştir.

4.4 Poliklonal antikor eldesi

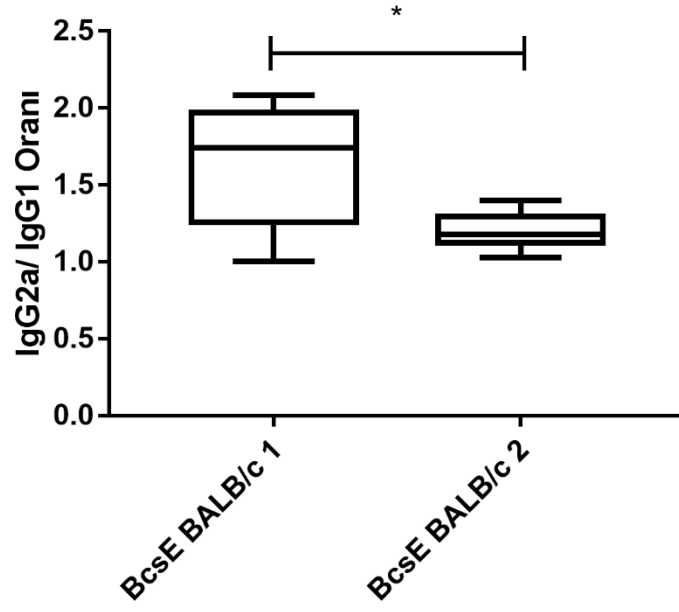
Bu denemede 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler saflaştırılan rekombinant BcsE proteini ile intraperitoneal enjeksiyon ile immünize edilmiş ve immünizasyon antikor titrasyonu ile doğrulanmıştır.

4.4.1 Anti BcsE IgG ELISA yöntemi ile immunizasyonun tespiti

50µg/mL dozda ve 28 günde farelerin BcsE proteinine karşı immunize olduğu, antikor titrasyonu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. ELISA sonucunda poliklonal antikor serumunun 1/114688 dilüsyona kadar çalıştığı belirlenmiştir. IgG1 ve IgG2a immünoglobulin izotipleri oluşan immun yanıtın Th1 veya Th2 olup olmadığını belirlemek için kullanılmaktadır. IgG2a ve IgG1 oranının 1'den büyük olması Th1 immün yanıtının güçlü olduğunu göstermektedir ($IgG2a/IgG1 > 1$). Çalışmamızda her bir dilusyon için çizilen grafikte oranların 1'in üzerinde olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak BscE proteini ile aşılanan farelerden elde edilen poliklonal antikorlar; immunizasyonun IgG1 ve IgG2a humoral yanıtları ve bunlarla birlikte Th1 hücresel bağışıklık tepkisi ile sonuçlandığını kanıtlamıştır (Şekil 4.23, 4.24).



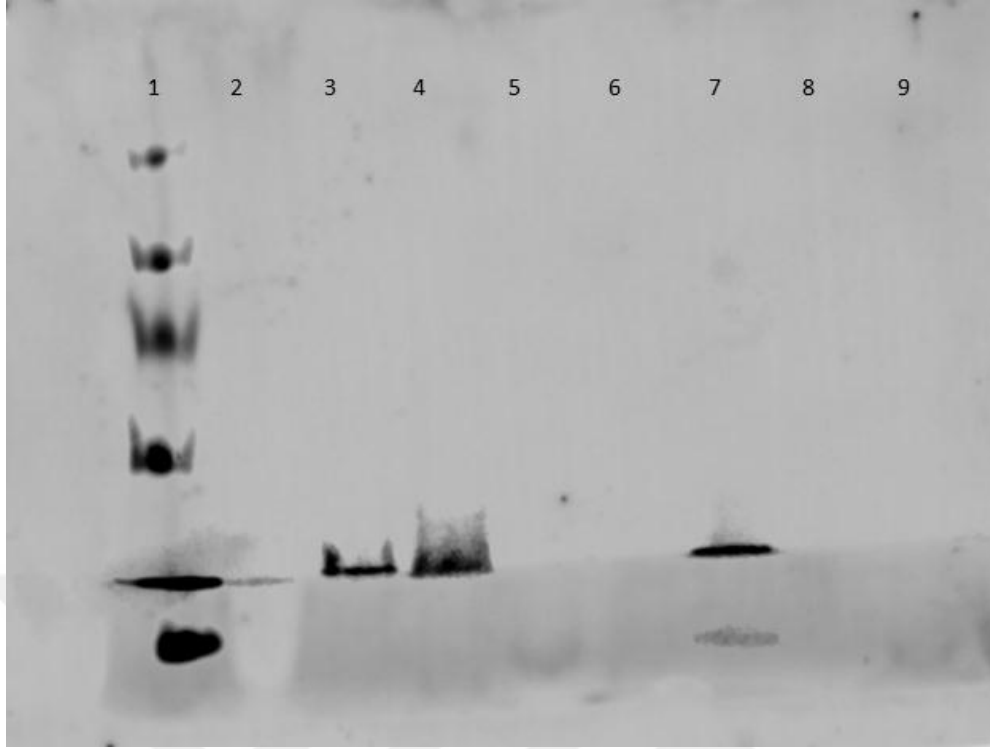
Şekil 4.23 BcsE ile aşılanmış farelerde IgG, IgG1, IgG2a titreleri



Şekil 4.24 IgG2a/IgG1 Oranı

4.4.2 Poliklonal antikor-antijen spesifitesinin belirlenmesi

Antikorum doğru antijene bağlanıp bağlanmadığı; BALB/c farelerin kuyruk veninden alınan serum ile bakteriyel hücre lizatlarının ve rekombinant BcsE proteininin kullanılması suretiyle gerçekleştirilen Western blot analizi sonucu tespit edilmiştir. Antikor doğal tip DMC2 ve DMC4 suşları ve *E. coli* BL21 suşlarında BcsE proteinine bağlanırken; *bcsE* mutant DMC2 ve DMC4 suşlarının yanı sıra, negatif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ve *E. faecalis* suşlarında ise antijen antikor kompleksi oluşmamıştır (Şekil 4.25). Bu durum poliklonal antikorum belirgin bir antijen spesifitesi gösterdiğine işaret etmektedir.

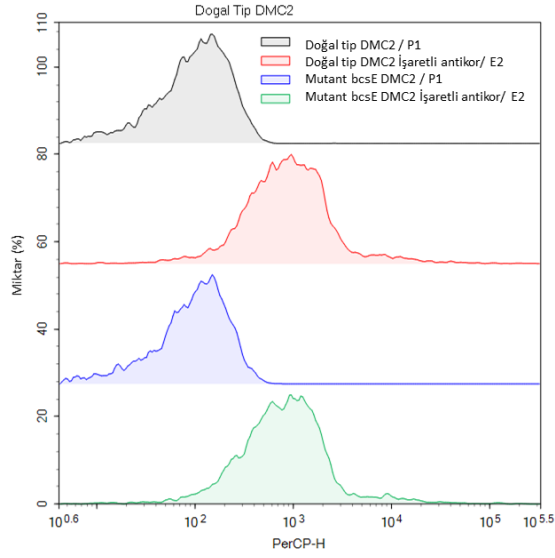


Şekil 4.25 Poliklonal antikor spesifitesini gösteren Western blot analizi

1: Protein marker, 2: BcsE rekombinant protein, 3: DMC2, 4: DMC4, 5: Δ DMC2, 6: Δ DMC4, 7: *E. coli* BL21, 8: *S. aureus*, 9: *E. faecalis*

4.4.3 Akış sitometresi ile poliklonal antikor-bakteri spesifitesinin belirlenmesi

Elde edilen poliklonal antikorun bakteri spesifitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmamızda, doğal tip suşlarda bakteri yüzeyine tutunma, mutant suşlara oranla log10 düzeyinde yüksek bulunmuştur. Bu durum elde ettiğimiz serumda farklı bağlanma özelliklerine sahip heterojenik bir antikor kompleksi bulunduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle mutant suşlarda farklı epitopların tanınarak bağlanması mümkün olmuştur. Bu çalışmada örneklenen antikorun bakteri spesifitesindeki farklanmaları muhtemelen bu nedenden kaynaklanmaktadır (Şekil 4.26, 4.27).

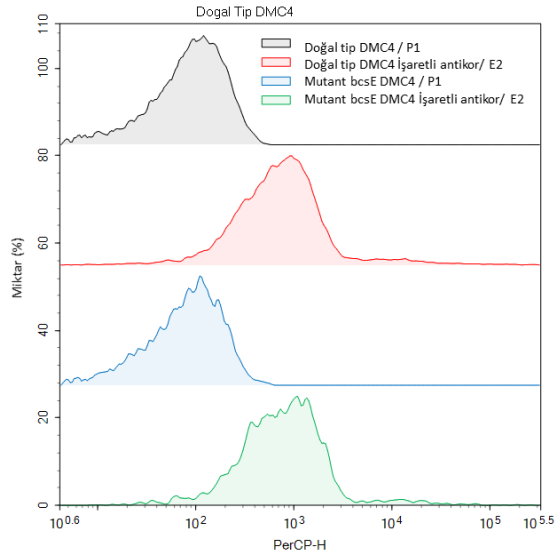


#	Örnek	Aralık	Miktar	%	Ortalama
1	Doğal tip DMC2 / P1	P1	5,129	4.42 %	93
2	Doğal tip DMC2 işaretli antikor/ E2	E2*	5,135	3.15 %	2,046
3	Mutant bcsE DMC2 / P1	P1*	4,173	17.94 %	89
4	Mutant bcsE DMC2 işaretli antikor/ E2	E2*	4,147	3.60 %	1,909

#	Örnek	Aralık	Ortalama
1	Doğal tip DMC2 / P1	P1	93
2	Doğal tip DMC2 işaretli antikor/ E2	E2*	2,046
3	Mutant bcsE DMC2 / P1	P1*	89
4	Mutant bcsE DMC2 işaretli antikor/ E2	E2*	1,909

P1: Bakteriyel Hücreler
E2: İşaretli antikorlar

Şekil 4.26 DMC2 ve $\Delta bcsE$ DMC2 bakterilerinin poliklonal antikor spesifitesi floresans yoğunlukları



#	Örnek	Aralık	Miktar	%	Ortalama
1	Doğal tip DMC4 / P1	P1	11,111	19.91 %	76
2	Doğal tip DMC4 işaretli antikor/ E2	E2*	14,936	2.72 %	2,226
3	Mutant bcsE DMC4 / P1	P1*	3,268	17.92 %	63
4	Mutant bcsE DMC4 işaretli antikor/ E2	E2*	2,836	3.00 %	1,884

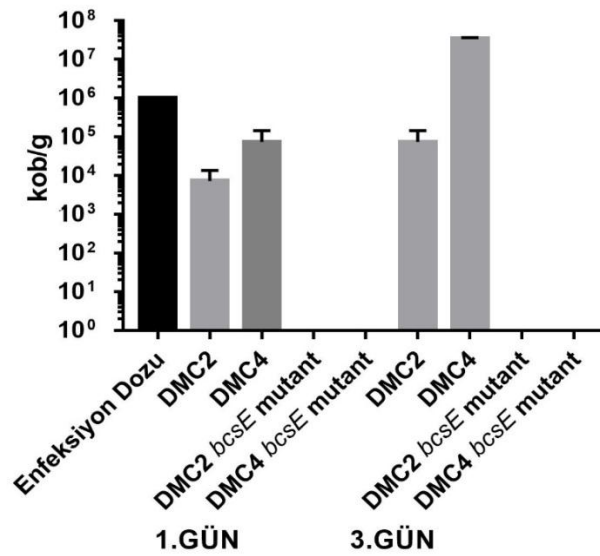
#	Örnek	Aralık	Ortalama
1	Doğal tip DMC4 / P1	P1	76
2	Doğal tip DMC4 işaretli antikor/ E2	E2*	2,226
3	Mutant bcsE DMC4 / P1	P1*	63
4	Mutant bcsE DMC4 işaretli antikor/ E2	E2*	1,884

P1: Bakteriyel Hücreler
E2: İşaretli antikorlar

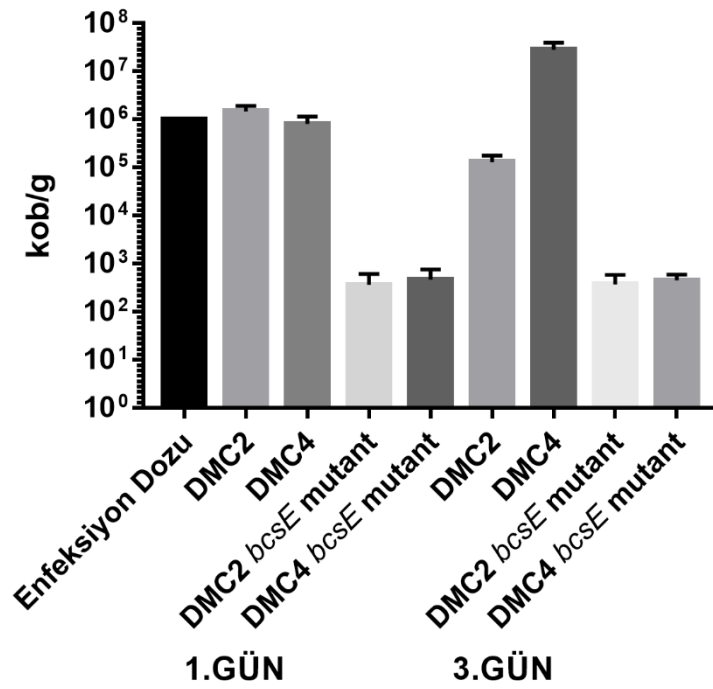
Şekil 4.27 DMC4 ve $\Delta bcsE$ DMC4 bakterilerinin poliklonal antikor spesifitesi floresans yoğunlukları

4.5 BALB/c Enfeksiyon Modeli

Doğal tip ve *bcsE* mutant suşları arasındaki rekabet deneyleri, 6-8 haftalık erkek BALB/c fareler kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Enfeksiyon sonrası 1. ve 3. günde toplanan dalak ve karaciğer örnekleri homojen hale getirilerek kloramfenikol içeren ve içermeyen LB agar yüzeylerine ekimler yapılmış ve inkübasyon süresi sonucunda canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler *Salmonella* virulanslığında *bcsE* mutant suşlarının doğal tip suşlara kıyasla oldukça dezavantajlı olduğunu göstermiştir. 1. günde dalakta, doğal tip DMC2 ve DMC4 suşları sırasıyla $7,3 \times 10^3$ ve $2,2 \times 10^5$ kob/g olarak belirlenmiştir. 3. günde ise doğal tip DMC2 suşu $7,4 \times 10^4$, DMC4 suşu ise $3,41 \times 10^7$ kob/g olarak bulunmuştur. *bcsE* mutantları agar yüzeyinde koloni oluşturmamıştır (Şekil 4.28). Karaciğerde 1. günde doğal tip DMC2 ve DMC4 suşlarında sayılan koloniler sırasıyla $1,47 \times 10^6$ ve $8,1 \times 10^5$ kob/g olarak tespit edilmiştir. 3. günde ise doğal tip DMC2 suşu $1,30 \times 10^5$ kob/g, DMC4 suşu ise $2,83 \times 10^7$ kob/g düzeyinde bulunmuştur. *bcsE* geni bakımından mutant DMC2 ve DMC4 suşları 1. günde sırasıyla $2,5 \times 10^2$ kob/g ve $4,6 \times 10^2$ kob/g olarak belirlenirken, 3. günde ise sırasıyla $3,7 \times 10^2$ kob/g ve $4,5 \times 10^2$ kob/g koloni oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.29).



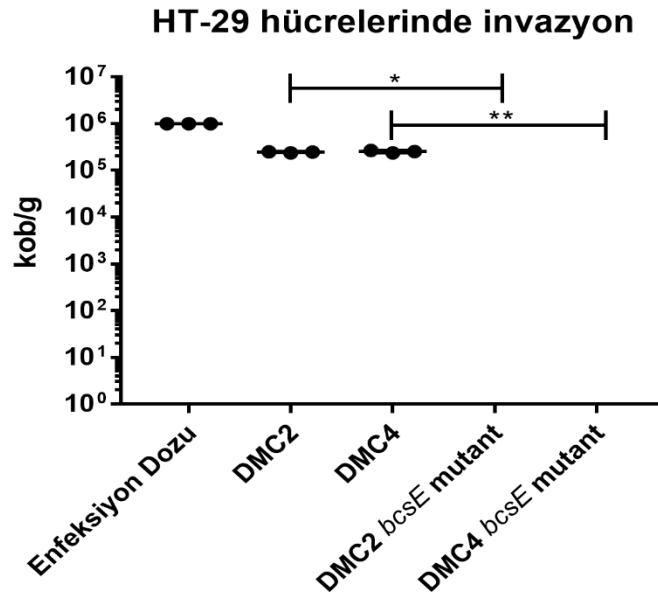
Şekil 4.28 Doğal suş ve mutantların dalakta 1. ve 3. gündeki koloni sayımları



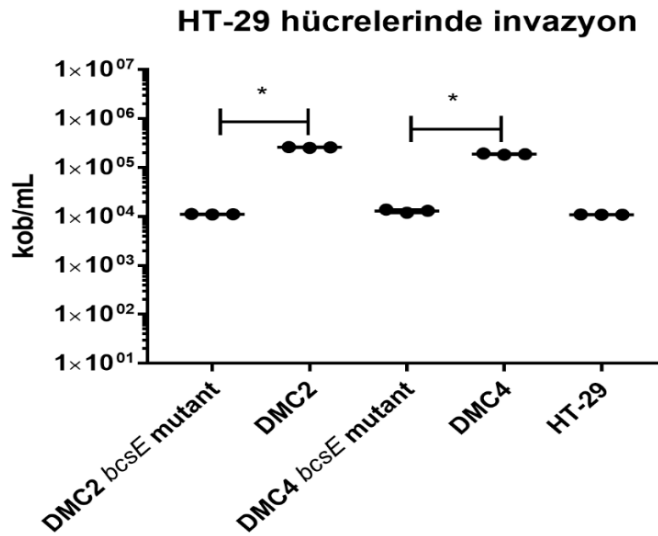
Şekil 4.29 Doğal suş ve mutantların karaciğerde 1. ve 3. gündeki koloni sayımları

4.6 İnsan Epitel Hücre İnvazyonu

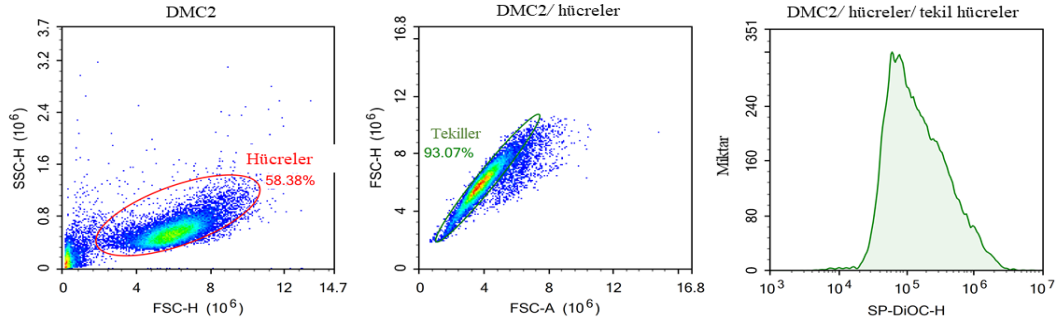
Doğal tip ve *bcsE* mutant suşları arasındaki rekabet deneyleri konak-patojen etkileşimini gözlemlemek amacıyla insan epitel hücre hattı HT-29 ile gerçekleştirilmiştir. *Salmonella* kültürleri kloramfenikol içeren ve içermeyen agar ortamlarına ekilmiş ve koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. Doğal tip ve mutant suşların invazyon oranı; inkübasyon öncesi bakteri sayısı/ inkübasyon sonrası hücre içerisine giren bakteri sayısı X 100, formülü kullanılarak hesaplanmıştır. DMC2 suşunun invazyon oranı % 24,6 iken DMC4 suşunun invazyon oranı % 26,2 olarak saptanmıştır. *bcsE* mutant suşların ise HT-29 hücrelerine invazyonu gözlenmemiştir (Şekil 4.30, 4.31) Bu yöntemden elde edilen sonuçları doğrulamak amacı ile yöntem modifiye edilerek akış sitometresinde hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve *bcsE* mutant suşlarının HT-29 hücrelerine invazyonunun gerçekleşmediği teyit edilmiştir (Şekil 4.32, 4.37) Bu sonuçlar verilerin *bcsE* geninin epitel hücreye invazyonunda oldukça önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. İstatistiki analizleri Prism 7 (GraphPad) yazılımı kullanılarak bağımlı örneklem t-testi ile yapılmıştır ($P < 0,05$).



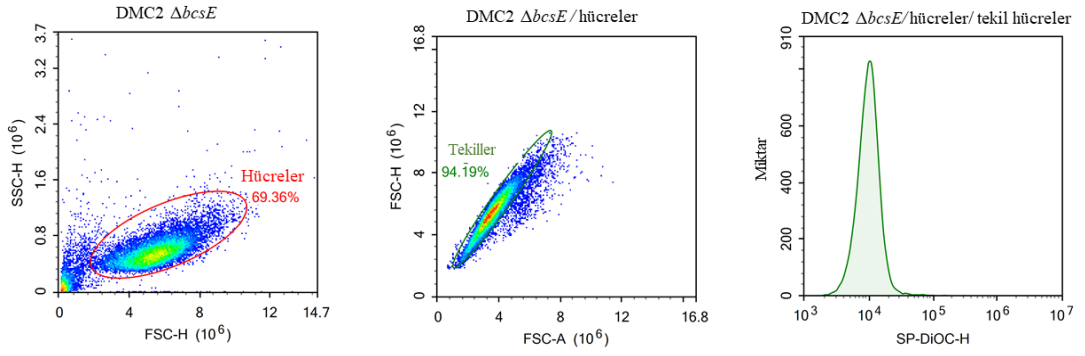
Şekil 4.30 Doğal tip ve mutant suşların HT-29 hücre hattına invazyonu sonrası koloni sayım sonuçları



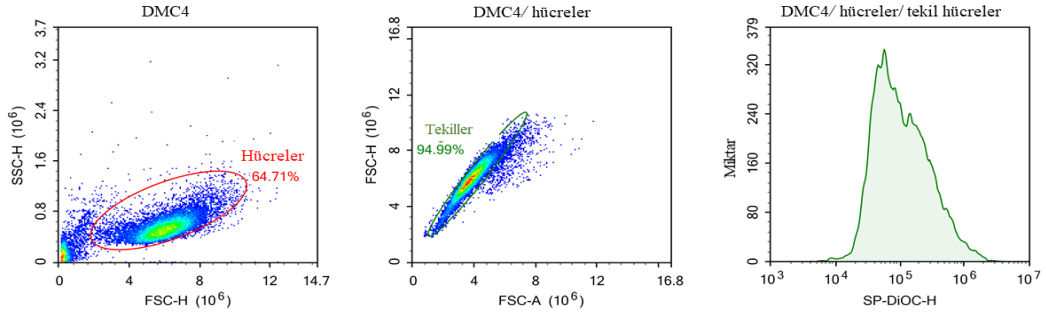
Şekil 4.31 Doğal tip ve mutant suşların HT-29 hücre hattına invazyonu sonrası koloni sayım sonuçları



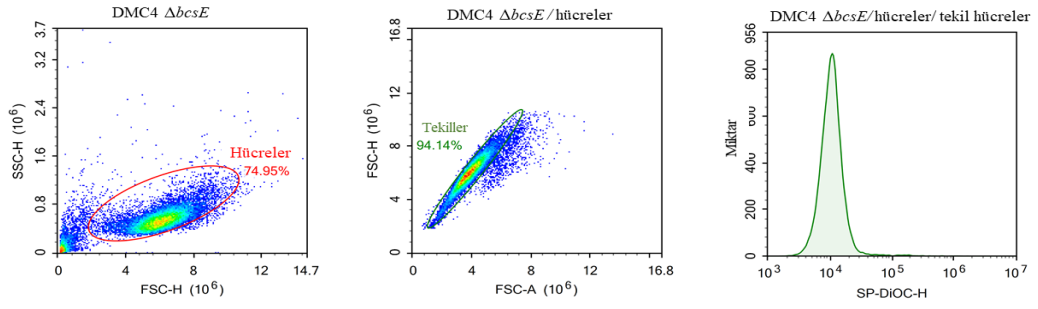
Şekil 4.32 Hücre içi bakterilerin (DMC2) akış sitometresi ile belirlenmesi



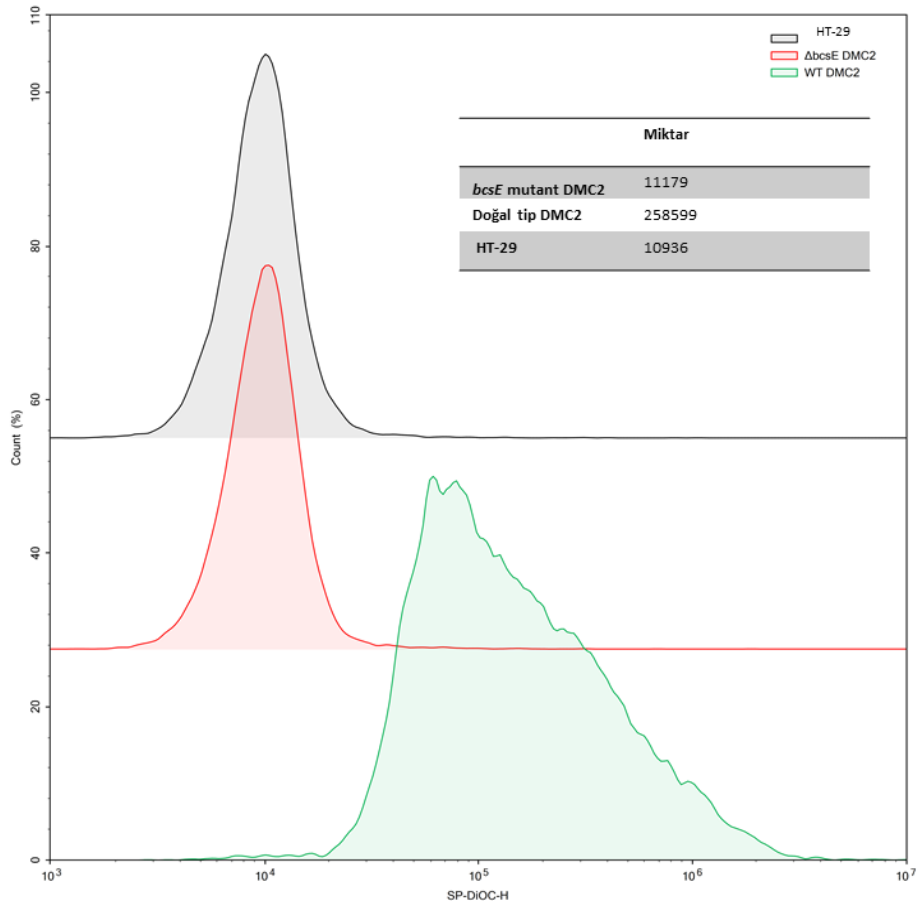
Şekil 4.33 Hücre içi bakterilerin ($\Delta bcsE$ DMC2) akış sitometresi ile belirlenmesi



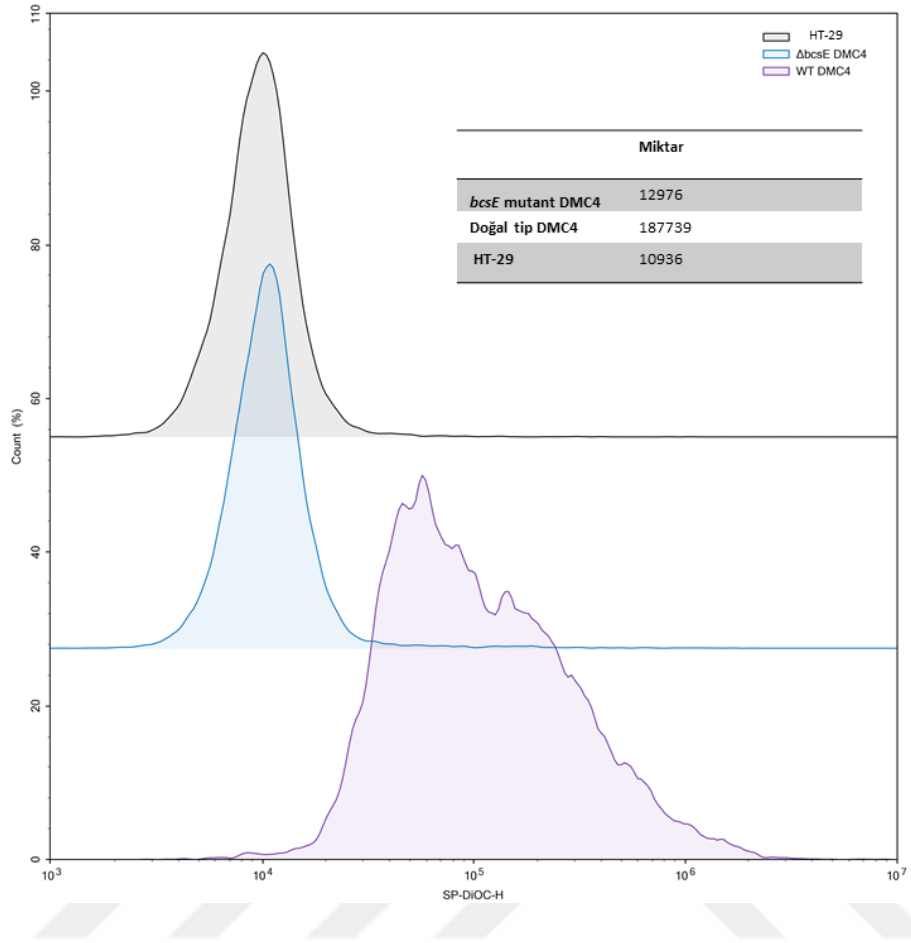
Şekil 4.34 Hücre içi bakterilerin (DMC4) akış sitometresi ile belirlenmesi



Şekil 4.35 Hücre içi bakterilerin ($\Delta bcsE$ DMC4) akış sitometresi ile belirlenmesi



Şekil 4.36 Hücre içi bakterilerin (DMC2 ve $\Delta bcsE$ DMC2) akış sitometresi belirlenen miktarları



Şekil 4.37 Hücre içi bakterilerin (DMC4 ve $\Delta bcsE$ DMC4) akış sitometresi belirlenen miktarları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Salmonella suşlarının biyotik (taze meyve ve sebzelerin yüzeyleri, hayvan epitel hücreleri gibi) ve abiyotik (plastik, cam, paslanmaz çelik gibi) yüzeylerde biyofilm oluşturma özelliği, söz konusu patojenlerin enfekte ettiği sistemlerde kalıcılığına ve virülanslığına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu sayede *Salmonella* suşları mukozal enfeksiyonları gerçekleştirebilmekte ve inatçı enfeksiyonlar geliştirebilmektedir. Yüksek düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği nedeniyle, bu bakteri suşları biyofilm çalışmalarında başlıca model organizmalardan biri haline gelmiştir. Genellikle *Salmonella*'da tanımlanan biyofilm morfortipi, düşük ozmolariteye sahip ve Kongo kırmızısı ilave edilen katı ortamlarda tanımlanan kırmızı, kuru, pürüzlü (rdar, biyofilm matriksi ana bileşenleri selüloz ve kıvrımlı fimbriya) morfortipidir. Bu dominant morfortip dışında “pdar” (pembe kuru pürüzlü ve biyofilm matriksi ana bileşeni selüloz), “bdar” (kahverengi, kuru, pürüzlü ve biyofilm matriksi ana bileşeni kıvrımlı fimbriya) ve “saw” (akışkan, beyaz ve matriks bileşenleri olarak kıvrımlı fimbriya ve selüloz içermeyen) morfortipler de bulunmaktadır (Steenackers vd. 2012). Çalışmamızda kullanılan doğal suşlarda yapılan incelemeler sonucunda *S. Typhimurium* DMC4 ve *S. Group C1* (DMC2) suşlarının her ikisinin de biyofilm morfortipinin “rdar” olduğu belirlenmiştir. Ancak bu suşların *bcsE* geni bozulmuş mutantlarında agar içeren ortamlarda “bdar” biyofilm morfortipine benzeyen, doğal tiplerden oldukça farklı bir morfortip oluşumu gözlenmiştir. Bu durumun açıklığa kavuşturulabilmesi için, bu kez doğal tip suşlar ve mutant suşların biyofilmlerinde selüloz üretimi yarı kantitatif kalkoflor yöntemi ile araştırılmış ve mutantlarda selüloz üretiminin önemli oranda düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca doğal suşların ve onların *bcsE* geni mutantlarının sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma özellikleri de incelenmiş ve doğal suşlarda pelikül oluşumu (sert, halkalı) gözlenirken, mutantlarda bu özelliğin kaybolduğu belirlenmiştir. Pelikül yapılarının oluşumunda en önemli bileşenlerden biri selülozdur. Bazı bakterilerde sadece selülozun oluşturduğu pelikül yapıları dahi tanımlanmıştır (Römling 2005, Grantcharova vd. 2010). Son olarak doğal suşlar ve onların *bcsE* geni bozulmuş mutantlarının polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturma özellikleri kantitatif olarak belirlendiğinde ise; doğal suşlar güçlü biyofilm üreticileri olmalarına rağmen, mutantların tanımlanabilir düzeyde biyofilm üretmedikleri saptanmıştır. Agar

ortamlarında mutantlar “bdar” benzeri bir biyofilm yapısı gösterirken polistiren yüzeylerde biyofilm üretememeleri iki test arasında bir çelişki olarak görülebilir. Ancak katı besin ortamlarında oluşan koloni morfolojisinin biyofilm morfortipleri ile görsel incelemeler sonucu karıştırılması yaygın olarak rastlanılan bir durumdur. Bu nedenle biyofilm üretiminde temel referans polistiren yüzeylerde biyofilm oluşumunun kantitatif tanımıdır. Polistiren yüzeylerde tekrarlanan denemelerde de mutantların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmemesi, söz konusu mutantlarda biyofilm üretme yeteneğinin ortadan kalktığı ya da tanımlanamayacak kadar düştüğü yönünde değerlendirilmiştir. Katı ortamda tanımlanan “rdar” morfortipinin selüloz sentezinin önemli ölçüde engellenmesi nedeniyle “bdar” morfortipine dönüşümü gerçekleşmiş olsa bile, bu durum *bcsE* mutantlarında biyofilm üretiminin yok denecek kadar düşük seviyeye indiği gerçeğini değiştirmemektedir. Tüm bu veriler beraber değerlendirildiğinde, *bcsE* geninin çalışılan *Salmonella* suşlarında katı-hava ve sıvı hava ara fazlarında biyofilm oluşumu için zorunlu bir regülatör proteini kodladığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu veriler *bcsE* geninin biyofilm üretimi ile doğrudan ilişkisinin tanımlandığı ilk verilerdir. Tespitlerimize göre literatürde bu yönde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sonucun ortaya çıkmasındaki ana mekanizma ise muhtemelen *bcsE* geninin kodladığı BcsE proteininin selüloz biyosentezindeki oynadığı roldür. Zira bulgularımızda doğal suş ve mutantlar arasındaki ana farklanma selüloz üretimi bakımından belirlenmiştir. *Salmonella*'da bakteriyel selüloz üretiminden sorumlu operonların *bcsABZC-bcsEFG* olduğu ve söz konusu operonların AdrA tarafından regüle edildiği belirlenmiştir (Zogaj vd. 2003, Gestel ve Römling 2005, Römling 2005).

Bugüne kadar yürütülen sınırlı sayıda çalışmada *bcsE* geninin *S. Typhimurium* ve *E. coli*'de selüloz sentezi için zorunlu olduğu (Solano vd. 2002, Serra vd. 2013) ya da zorunlu olmadığı, ancak maksimum düzeyde selüloz sentezini regüle ettiği (Fang vd. 2014) ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamız verilerine göre *bcsE* geni mutantlarında selüloz biyosentezi tamamen durmamış, ancak büyük oranda azalmıştır. Bu veriler Fang vd. (2014) tarafından ileri sürülen iddiayı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda *S. Typhimurium* DMC4 ve *S. Group C1* (DMC2) doğal suşları ve onların *bcsE* geni mutantlarında incelenen diğer bir özellik, bireysel bakteri hareketi ve çok hücreli koordineli hareket farklanmaları olmuştur. Agar içeren besin ortamlarına ekilen bakteriler, ilk ekim bölgesinde besin maddelerinin tükenmesine paralel olarak besince zengin bölgelere doğru bir hareket gerçekleştirirler. Yukarıda anlatıldığı gibi besin gradyanı yönünde gerçekleşen bu hareket, flagella aracılığı ile kolonide bulunan her bir hücrenin bağımsız hareketi (swimming) ya da çok sayıda hücrenin koordineli bir şekilde beraber hareketi (bağımlı) ile karakterize edilen “swarming” hareketleridir. “Swarming” hareketi bakteriyal çok hücreli hareket olarak da adlandırılmaktadır. “Swimming” hareketi bakteriyal flagellanın rotasyonu aracılığı ile gerçekleştirilirken, “swarming” hareketi daha ziyade bakteri hücrelerinin ürettiği biyosüpfaktantlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (Römling 2005, Hengge 2009, Zorraquino vd. 2013, Le Guyon vd. 2014). Zorraquino vd. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada, selüloz üretimindeki artışın flagellar hareketi engellemede önemli bir etken olduğu ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamız da araştırmacıların söz konusu bulguları ile paralellik göstermektedir. Zira çalışmamızda, selüloz üretiminin büyük ölçüde düştüğü mutantlarda, “swimming” hareketin çok belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Ancak “swarming” hareketin mekanizması bakterilerde büyük ölçüde gizini korumaktadır. Bizim bulgularımız bu anlamda literatüre katkı değeri taşımaktadır. Çünkü selüloz biyosentezinin önemli ölçüde düştüğü *bcsE* geni mutantlarında “swarming” hareketin yüksek oranda artışı, BcsE proteininin “swarming” hareketini negatif yönde regüle ettiğini kanıtlamaktadır. Bu bulgular bakteriyel “swarming” hareketinin mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutacak niteliktedir.

Çalışmamızda doğal suşlarda saptanan selülaz enzimi aktivitesinin, bu suşların *bcsE* geni mutantlarında görülmemesi, *bcsE* geninin selülaz enzim sentezine düzenleyici olarak atıldığına işaret etmektedir. Bu açıdan da bulgularımız orijinalite taşımaktadır. Selülaz aktivitesi diğer birçok hücresel süreç yanında, *Salmonella* virölansı açısından da büyük bir önem taşımaktadır. Daha önce de ifade edildiği gibi, selüloz biyofilm matriksinin iki ana bileşeninden biri olduğundan, *Salmonella* biyofilmleri için büyük bir önem taşımaktadır. Ancak enfeksiyon sürecinin bir sonucu olarak *Salmonella* makrofajların içine girdiğinde selüloz üretiminin devam etmesi bu bakterinin virölansını

büyük ölçüde düşürmektedir (Pontes vd. 2015). Bu nedenle makrofajların içerisinde *Salmonella* suşlarında selüloz üretimi baskılanmakta ya da üretilerek hücre dışına salınan selüloz, selülaz enzimi tarafından parçalanmaktadır. Çalışmamızda tanımlanan *bcsE* geninin inaktivasyonuna bağlı olarak selülaz enzim üretiminin de, selülaz testine yanıt vermeyecek düzeyde düşmesi, selülaz aktivitesi ile *bcsE* geni ürününü protein arasında bir etkileşimin olduğuna işaret etmektedir. *S. Typhimurium*'da periplazmik konuma sahip selülaz BcsZ, selüloz biyosentezinin negatif regülatörüdür. Ayrıca, polar olmayan bir mutant suşta yapılan incelemeler sonucu, BcsZ enziminin, “rdar” biyofilm morfoloji, hücre topaklanması, biyofilm oluşumu, pelikül oluşumu ve flagellaya bağlı hareket gibi selülozla ilişkili fenotipleri etkilediği de saptanmıştır (Ahmad vd. 2016, Ahmad vd. 2017). Bu literatür verileri bizim çalışmamızda elde edilen bulgularla birleştirildiğinde, *bcsE* geninin *Salmonella*'nın konakçı sistemlerde adaptasyon için gerçekleştirdiği faz varyasyonunda anahtar bir rol oynadığı sonucuna varmak olasıdır. *bcsE* geninin selülaz enzim aktivitesini düzenleme mekanizmasının aydınlatılması, *Salmonella* patojenitesinin moleküler mekanizmalarının daha detaylı bir şekilde anlaşılmasına önemli katkılar sunacaktır.

Araştırmamızda *bcsE* gen ürünü proteinin (BcsE proteini) farelerde immün yanıtı güçlü bir şekilde tetiklediği, IgG1 ve IgG2a hümmoral yanıtları yanında Th1 hümmesel tepkisi de örneklerek kanıtlanmıştır. Saf BcsE proteini ile immünize edilen farelerde IgG2a/IgG1 oranlarının 1'den yüksek oluşu T lenfosit tip 1 (Th1) sitokin yanıtının güçlü bir şekilde oluştuğunu göstermiştir. Bu durum BcsE proteininin ve dolayısı ile *bcsE* geninin *Salmonella* patojenitesine ciddi bir şekilde katkıda bulunduğunu gösteren güçlü bir kanıttır. Zira BcsE proteinine karşı hem hümmoral ve hem de güçlü hümmesel yanıtların üretilmesi, patojen işgaline karşı genel konakçı yanıtı olarak değerlendirilmektedir (Cherisse ve Vincent 2018). Fare model sistemlerinde yürütölen çalışmalarda Th1 yanıtlarının *Schistostoma monsoni* enfeksiyonundan korunmada özgül bir göreve sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı durum *Salmonella* enfeksiyonları için farklı patojen ilişkili moleküler elemanlar (PAMPs) için de belirlenmiştir. Bu araştırmalarda, bakteriyal invazyon aşamasında memeli konakçı sistemlerin dominant immün yanıt tipinin Th1 sitokin üretiminin aktivasyonu olduğu saptanmıştır (Cetre vd. 1999, Pashine vd. 1999, Hauge vd. 2007, Firacative vd. 2018). Tüm bu literatür verileri bizim denemelerimizden

elde edilen immün yanıt bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde; BcsE proteininin *Salmonella* enfeksiyonunda önemli bir rol üstlendiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu bulgular da literatürde konu üzerindeki ilk verilerdir.

BscE proteininin farelerde immün yanıtı uyardığının belirlenmesinden sonra ikinci aşamada, söz konusu proteini kodlayan genin farelerde patojenin kalıcılığını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Bu amaçla model sistem olarak BALB/c fareler kullanılmıştır. Doğal suşlar ve onların *bcsE* geni mutanları ile gerçekleştirilen enfeksiyon sonrasında 1. gün ve 3. günde toplanan dalak örneklerinde canlı hücre sayısı 10^3 - 10^7 kob/g gibi yüksek oranlarda seyrederken, *bcsE* mutantları için yapılan sayımlarda canlı bakteri tespit edilememiştir. Karaciğer örneklerinde ise mutantların miktarının aynı süreler için 50-100 kat daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu veriler *bcsE* geninin *Salmonella*'nın memeli sistemlerde kalıcılığında çok önemli bir faktör olduğunu kanıtlamaktadır. Patojenin konak sisteminde kalıcılığının yüksek oluşu, virülansı etkileyen en kritik faktörlerden biri olarak tanımlanmaktadır. *bcsE* geninin ve dolayısı ile BcsE proteininin bu kalıcılık yeteneğini hangi yolla *Salmonella* suşlarına kazandırdığı çalışmamızda irdelenmemiştir. Ancak sinyal yollarının bakterilerin değişen çevresel koşullara (konak dışı ve konak sistemi koşulları değişimi gibi) uyum sağlamada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Sistemik kalıcılık etkisi özellikle sinyal yollarının bakteri virülans faktörlerini aktive etmesi ve konak antivirülans faktörlerini ise baskılaması sonucu gerçekleşmektedir. BscE proteininin c-di-GMP bağlanma domaini içermesi, söz konusu etkinin BscE proteininin c-di-GMP seviyelerini regüle etmesi sonucu ortaya çıkma olasılığını akla getirmektedir. Zira c-di-GMP seviyeleri, özellikle selüloz biyosentezinin regülasyonunda anahtar bir role sahip c-di-GMP sinyal yolağının aktivasyonu ya da inaktivasyonu sonucunu doğurmaktadır. Bu da hareketlilik yanında, patojenin sistemik kalıcılığında kritik bir rol oynamaktadır (Boehm vd. 2010, Paul vd. 2010, Pultz vd. 2012, LeGuyon vd. 2015, Ahmad vd. 2016, Ahmad vd. 2017). Ancak bu öngörü doğrulanmaya muhtaçtır. Özellikle BcsE proteini varlığında ve yokluğunda c-di-GMP seviyelerinin değişimine bağlı olarak patojenin sistemik kalıcılık karakteristiklerinin test edilmesi, söz konusu öngörünün kesinleştirilmesine olanak sağlayacaktır. Akut enfeksiyonları destekleyen bu gibi sistemlerin tanısı, enfeksiyonlardan korunmada büyük önem taşımaktadır (Tamayo vd.

2007, Povolotsky ve Hengge 2012, Römling 2013, Latasa vd. 2016). Bu nedenle etki mekanizması açıklığa kavuşturulmamış olsa da *bcsE* geninin *Salmonella*'nın sistemik kalıcılığında önemli bir role sahip olduğunun belirlenmesi, uygulamada BcsE proteini inhibitörleri kullanılarak *Salmonella* virülanslığının düşürülmesinin mümkün olabileceğine işaret etmektedir.

Bu tez çalışmasının son aşamasında *bcsE* geninin, patojenin epitel hücre invazyonu yeteneğini etkileyip etkilemediği incelenmiştir. Bu amaçla insan bağırsak epiteli hücre hattı olan HT-29 hücreleri kullanılmıştır. Doğal tip *S. Typhimurium* DMC4 ve *S. Group C1* (DMC2) suşların HT-29 hücrelerine invazyon oranları (internalizasyon, işgal) sırasıyla % 26,2 ve % 24, 6 düzeylerinde bulunurken, bu suşların sadece *bcsE* geni inaktive edilmiş mutantlarında HT-29 hücrelerine patojen internalizasyonunun gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu bulgular, *bcsE* geninin aynı zamanda konak hücre invazyonunda (işgalinde) da bir rolü olduğunun kanıtlarıdır. *Salmonella*'nın epitel hücreleri invazyonu, patojenite sürecinin ilk aşamasını teşkil etmektedir (Galan 1996). Selülozun, özellikle yüksek c-di-GMP seviyelerine sahip *Salmonella* suşlarında konak epitel hücre invazyonu yeteneğini düşürdüğü bilinmektedir. Bu durum ilk kez *E coli* ile yürütülen çalışmalarda tanımlanmıştır (Wang vd. 2006). Daha sonra, Lamprokostopoulou vd. (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada da, selüloz sentaz enzimini kodlayan *bcsA* geninin delesyonu yolu ile oluşturulan ve yüksek c-di-GMP seviyelerine sahip olduğu tespit edilen mutantlarda, doğal tip suşlara oranla epitel hücre invazyonunun en az iki kat azaldığı belirlenmiştir. Bu literatür verileri, *bcsE* geni üzerinden yürüttüğümüz invazyon çalışmalarından elde ettiğimiz bulguların açıklanmasına ışık tutmaktadır. Bizim çalışmamızda da *bcsE* geninin selüloz biyosentezini önemli ölçüde düşürdüğü saptanmıştır. Diğer yandan BcsE proteininin bir c-di-GMP bağlama proteini olduğu da bilinmektedir. Dolayısı ile *bcsE* geni inaktivasyonunda BcsE proteini üretilmeyeceği için, selüloz sentezinin büyük ölçüde bloke edilmesi yanında, muhtemelen c-di-GMP düzeyinin regülasyonu da gerçekleşmeyeceğinden, mutantlarda doğal suşlara oranla çok daha yüksek seviyelerde c-di-GMP birikmektedir. Bu da yukarıda özetlenen literatür verilerinde gösterildiği gibi patojenin epitel hücre invazyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak bizim çalışmamızın, söz konusu literatür verileri ile ana farklılığı, *bcsE* geni mutantlarında invazyon yeteneğinin tamamen ortadan kalkmasıdır. Bu durum

da *bcsE* geninin invazyonda bilinen diğer genlerden ve onların ürünlerinden daha etkili olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile ilk kez *bcsE* geninin *Salmonella*'da biyofilm üretimi, biyofilm morfoloji, hareketlilik, selüloz ve selülaz enzim üretimi yanında, konak hücre bağışıklık sistemi tepkilerinin uyarımı, epitel hücre invazyonu ve konak sistemlerde kalıcılıkta (akut enfeksiyon oluşumu) etkin roller üstlendiği istatistikî analizlerle desteklenmiş deneysel verilerle kanıtlanmıştır. Bu açıdan yürütölen tez çalışması bütünüyle evrensel literatüre katkı niteliği taşımaktadır. Diğer yandan, *bcsE* geni ya da BscE proteini inhibitörlerinin tanımlanması suretiyle *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı etkin mücadele ajanlarının geliştirilebileceğine işaret eden bulgularımız, ciddi bir yaygın etki yaratma potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., O'Connor, C.D. 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics*, 1(4), 597-607.
- Ahmad, I., Cimdins, A., Beske, T. and Römling, U. 2017. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of *csgD* expression in *Salmonella* Typhimurium. *BMC Microbiology*, 17, 27.
- Ahmad, I., Lamprokostopoulou, A., Le Guyon, S., Streck, E., Peters, V., Barthel, M., Hardt, W.D., Römling, U. 2011. Complex c-di-GMP signaling networks mediate the transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *PLOS One*, 6, e28351.
- Ahmad, I., Rouf, S.F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Le Guyon, S., Schottkowsski, M., Rhen, M. and Römling, U. 2016. BcsZ inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Cell Factories*, 15, 177.
- Ahmad, I., Wigren, E., Le Guyon, S., Vekkel, S., Blanka, A., el Mouali, Y., Anwar, N., Chuah, M.L., Lünsdorf, H., Frank, R., Rhen, M., Liang, Z.X., Lindqvist, Y., Römling, U. 2013. The EAL-like protein STM1697 regulates virulence phenotypes, motility and biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 90(6), 1216-1232.
- Ahmer, B.M. 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 52(4), 933-945.
- Alegado, R.A. and Tan, M.W. 2008. Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of *Salmonella* Typhimurium in the *C. elegans* intestine. *Cellular Microbiology*, 10, 1259-1273.
- Allerberger, F., Liesegang, A., Grif, K., Khaschabi, D., Prager, R., Danzl, J., Hock, F., Otl, J., Dierich, M.P., Berghold, C., Neckstaller, I., Tschape, H. and Fisher, I. 2003. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. *Wiener medizinische Wochenschrift*, 153, 148-152.
- Alpuche-Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P., Miller, S.I. 1992. *Salmonella* Typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceeding of National Academy of Science*, 89, 10079-10083.
- Altier, C. 2005. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *Journal of Microbiology*, 43, 85-92.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A.I., Burnham, K.D. and Maurer, R. 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Molecular Microbiology*, 35(3), 635-646.
- Anriany, Y., Sahu, S.N., Wessels, K.R., McCann, L.M., Joseph, S.W. 2006. Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica*

- serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 5002-5012.
- Anriany, Y.A., Weiner, R.M., Johnson, J.A., De Rezende, C.E. and Joseph, S.W. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4048-4056.
- Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W. and Collinson, S.K. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 162, 295-301.
- Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le-Moua, H. and Miller, S.I. 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, 122(3), 461-472.
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. and Høiby, N. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -Lactamase and alginate production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1175-1187.
- Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C. and Lee, C.A. 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Molecular Microbiology*, 22, 703-714.
- Bakowski, M.A., Braun, V. and Brumell, J.H. 2008. *Salmonella* containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*, 9, 2022-2031.
- Ban, G.H., Kang, D.H. and Yoon, H. 2015. Transcriptional response of selected genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm cells during inactivation by superheated steam. *International Journal Food Microbiology*, 192, 117-123.
- Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L. and Charkowski, A.O. 2007. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 20, 1083-1091.
- Barlow, M. and Hall, B.G. 2002. Origin and evolution of the AmpC beta-lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46, 1190-1198.
- Barnhart, M.M. and Chapman, M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131-147.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M. and Heffron, F. 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 279-283.
- Baumler, A.J., Winter, S.E., Thiennimitr, P. and Casadesus, J. 2011. Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environmental Microbiology Reports*, 3, 508-517.
- Behlau, I. and Miller, S.I. 1993. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, 175, 4475-4484.

- Benach, J., Swaminathan, S.S., Tamayo, R., Handelsman, S.K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J.E., Forouhar, F., Neely, H., Seetharaman, J., Camilli, A., and Avi, J.F. 2007. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *The Embo Journal*, 26, 5153-5166.
- Beuzon, C.R. and Holden, D.W. 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes and Infection*, 3, 1345-1352.
- Biswas, R., Agarwal, R.K., Bhilegaonkar, K.N., Kumar, A., Nambiar, P., Rawat, S. and Singh, M. 2011. Cloning and sequencing of biofilm-associated protein (*bapA*) gene and its occurrence in different serotypes of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 138-143.
- Blanc-Potard, A.B. and Groisman, E.A. 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO Journal*, 16, 5376-5385.
- Boddicker, J.D., Ledebore, N.A., Jagnow, J., Jones, B.D. and Clegg, S. 2002. 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. *Molecular Microbiology*, 45, 1255-1265.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaefer, V., Sourjik, V., Roth, V., Jenal, U. 2010. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, 141, 107-116.
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J. and Parsek, M.R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 75, 827-842.
- Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts H., Mulvey, M.R. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *Journal of Bacteriology*, 183, 5725-5732.
- Boyd, J.F. 1985. Pathology of the alimentary tract in *Salmonella* Typhimurium food poisoning. *Gut*, 26, 935-944.
- Brandl, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 367-392.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. and Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2465-2467.
- Brown, P.K., Dozois, C.M., Nickerson, C.A., Zuppardo, A., Terlonge, J. and Curtiss, R. 2001. MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 41(2), 349-363.

- Bueno, S.M., Tobar, J.A., Iruretagoyena, M.I. and Kalergis, A.M. 2005. Molecular interactions between dendritic cells and *Salmonella*: escape from adaptive immunity and implications on pathogenesis. *Critical Reviews in Immunology*, 25, 389-403.
- Bustamante, V.H., Martinez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., Puente, J.L. 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceeding of National Academy of Science*, 105, 14591-14596.
- Cabeza, M.L., Aguirre, A., Soncini, F.C. and Vescovi, E.G. 2007. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7335-7342.
- Castelli, M.E., Garcia-Vescovi, E. and Soncini, F.C. 2000. The phosphatase activity is the target for Mg^{2+} regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22948-22954.
- Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Åberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almqvist, F., Chapman, M.R. and Hultgren, S.J. 2009. Small molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, 5, 913-919.
- Cetre, C., Pierrot, C., Cocude, C., Lafitte, S., Capron, M. and Khalife, J. 1999. Profiles of Th1 and Th2 Cytokines After Primary and Secondary Infection by *Schistosoma mansoni* in the Semipermissive Rat Host. *Infection and Immunity*, 67, 2713-2719.
- Chamnongpol, S., Cromie, M. and Groisman, E.A. 2003. Mg^{2+} sensing by the Mg^{2+} sensor PhoQ of *Salmonella enterica*. *Journal of Molecular Biology*, 325(4), 795-807.
- Charles, R.C., Harris, J.B., Chase, M.R., Lebrun, L.M., Sheikh, A., LaRocque, R. C., Logvinenko, T., Rollins, S.M., Tarique, A., Hohmann, E.L., Rosenberg, I., Krastins, B., Sarracino, D.A., Qadri, F., Calderwood, S.B., Ryan, E.T. 2009. Comparative proteomic analysis of the PhoP regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhi versus Typhimurium. *PLOS ONE*, 4(9), 6994.
- Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T., Georgellis, D. 2010. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 2009-2012.
- Cheminay, C., Chakravorty, D., Hensel, M. 2004. Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infection and Immunity*, 72, 468-477.
- Cheminay, C., Mohlenbrink, A. and Hensel, M. 2005. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *Journal of Immunology*, 174, 2892-2899.
- Cherisse, L.H. and Vincent, T.L. 2018. Cyclic-di-GMP regulation of virulence in bacterial pathogens. *Wiley Interdisciplinary reviews RNA*, 9, e1454.
- Choi, E., Groisman, E.A. and Shin, D. 2009. Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake. *Journal of Bacteriology*, 191(23), 7174-7181.

- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., Jenal, U. 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry*. 280(35), 30829–30837.
- Clarke, D.J. 2010. The Rcs phosphorelay: More than just a two-component pathway. *Future Microbiology*, 5, 1173-1184.
- Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C. and Sperandio, V. 2006. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10420-10425.
- Collinson, S.K., Clouthier, S.C., Doran, J.L., Banser, P.A., Kay, W.W. 1996. *Salmonella* Enteritidis *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *Journal of Bacteriology*, 178, 662-667.
- Conlan, J.W. and North, R.J. 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella* Typhimurium involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infection and Immunity*. 60, 5164-5171.
- Crawford, R.W., Gibson, D.L., Kay, W.W. and Gunn, J.S. 2008. Identification of a bile induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infection and Immunity*, 76(11), 5341-5349.
- Crump, J.A., Luby, S.P. and Mintz, E.D. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82, 346-353.
- Cuatrecasas, P. 1970. Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*. 12, 3059-3065.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penadé, J.R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 2888-2896.
- Darwin, K.H. and Miller, V.L. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 405-428.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *PNAS*, 97(12), 6640-6645.
- Davidson, C.J., White, A.P., and Surette, M.G. 2008. Evolutionary loss of the rdar morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. *The ISME Journal*, 2(3), 293-307.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 114-122.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M. and Geesey, G.G. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1181-1186.

- De Rezende, C.E., Anriany, Y., Carr, L.E., Joseph, S.W. and Weiner, R.M. 2005. Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7345-7351.
- Deep, A., Chaudhary, U. and Gupta, V. 2011. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *Journal of Laboratory Physicians*, 3(1), 4-11.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., Hensel, M. 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Molecular Microbiology*, 31, 1759-1773.
- Dong, H., Peng, D., Jiao, X., Zhang, X., Geng, S. and Liu, X. 2011. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. *Microbiology*, 157, 1798-1805.
- Dong, H., Zhang, X., Pan, Z., Peng, D. and Liu, X. 2008. Identification of genes for biofilm formation in a *Salmonella* Enteritidis strain by transposon mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 48, 869-873.
- Ehrbar, K., Miold, S., Friebel, A., Stender, S., Hardt, W.D. 2002. Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(6-7), 479-485.
- Eichelberg, K. and Galan, J.E. 1999. Differential regulation of *Salmonella* Typhimurium type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and *hilA*. *Infection and Immunity*. 67, 4099-4105.
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R. and Slauch, J.M. 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 57, 691-705.
- Ellermeier, J.R. and Slauch, J.M. 2007. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 24-29.
- Fang, X., Ahmad, I., Blanka, A., Schottkowski, M., Cimdins, A., Galperin, M.Y., Römling, U. and Gomelsky, M. 2014. GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in *Enterobacteriaceae*. *Molecular Microbiology*, 93, 439-452.
- Feasey, N.A., Dougan, G., Kingsley, R.A., Heyderman, R.S. and Gordon, M.A. 2012. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*, 379, 2489-2499.
- Fey, P.D. and Olson, M.E. 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*, 5, 917-933.
- Firacative, C., Gressler, A.E., Schubert, K., Schulze, B., Müller, U., Brombacher, F., Bergen, M. and Alber, G. 2018. Identification of T helper Th1- and Th2-

- associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. *Scientific Reports*, 8, 1-14.
- Folkesson, A., Lofdahl, S. and Normark, S. 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in Microbiology*, 153, 537-545.
- Galan, J. E. 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annual Review Cell Developmental Biology*, 17, 53-86.
- Galan, J.E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Molecular Microbiology*, 20, 263-271.
- Gal-Mor, O., Valdez, Y., Finlay, B.B. 2006. The temperature-sensing protein TlpA is repressed by PhoP and dispensable for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. *Microbes and Infection*, 8, 2154-2162.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., Koonin, E.V. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 11-21.
- Garcia, B. Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C. and Lassa, I. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 54(1), 264-277.
- Geddes, K., Cruz, F. and Heffron, F. 2007. Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLOS Pathogens*, 3, e196.
- Geddes, K., Worley, M., Niemann, G., Heffron, F. 2004. Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 73, 6260-6271.
- Geoghegan, J.A., Corrigan, R.M., Gruszka, D.T., Speziale, P., O’Gara, J.P., Potts, J.R. and Foster, T.J. 2010. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 192, 5663-5673.
- Gerlach, R. G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.D., Hensel, M. 2007. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiology*, 9, 1834-1850.
- Gerstel, U. and Römling U. 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Research in Microbiology*, 154, 659-667.
- Gerstel, U. and Römling, U. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*, 3(10), 638-648.
- Giaouris, E., Samoilis, G., Chorianopoulos, N., Ercolini, D. and Nychas, G.J. 2013. Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 on stainless steel surface. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 105-113.

- Gibson, D.L., White, A.P., Rajotte, C.M. and Kay W.W. 2007. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology*, 153, 1131-1140.
- Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M. and Kay, W.W. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722-7730.
- Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Ward, L.R., Smith, H.R. 2005. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? *Epidemiology and Infection*, 133, 759-801.
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K., Römling, U. 2010. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. 192, 456-466.
- Grassl, G.A. and Finlay, B.B. 2008. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24, 22-26.
- Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P. and Romeo, T. 2001. Regulatory interactions of Csr components: The RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 6017-6027.
- Hamilton, S., Bongaerts, R.J., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., Lapin-Scott, H.M. and Hinton, J.C.D. 2009. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, 10, 599.
- Hanisch, J., Ehinger, J., Ladwein, M., Rodhe, M., Derivery, E., Bosse, T., Steffen, A., Bumann, D., Misselwitz, B., Hardt, W.D., Gautreau, T.E. and Rottner, K. 2010. Molecular dissection of *Salmonella*-induced membrane ruffling versus invasion. *Cell Microbiology*, 12(1), 84-98.
- Hansen-Wester, I. and Hensel, M. 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes and Infection*, 3, 549-559.
- Hansen-Wester, I., Stecher, B., Hensel, M. 2002. Type III secretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG. *Infection and Immunity*. 70, 1403-1409.
- Hauge, S., Madhun, A.S., Cox, R.J., Brokstad, K.A. and Haaheim, L.R. 2007. A Comparison of the Humoral and Cellular Immune Responses at Different Immunological Sites after Split Influenza Virus Vaccination of Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 65, 14-21.
- Hengge, R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 263-273.
- Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 373-395.

- Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews*, 36, 478-503.
- Hensel, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 95-102.
- Hensel, M., Nikolaus, T., Egelseer, C. 1999. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*, 31, 489-498.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C. and Holden, D.W. 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Molecular Microbiology*, 30, 163-174.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., Harwood, C.S. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceeding of National Academy of Science*, 102(40), 14422-14427.
- Hisert, K.B., Maccoss, M., Shiloh, M.U. Darwin, K.H., Singh, S., Jones, R.A., Ehrt, S., Zhang, Z., Gaffney, B.L., Gandotra, S., Holden, D.W., Murray, D. and Nathan, C. 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic di GMP. *Molecular Microbiology*, 56(5), 1234-1245.
- Holden, D.W. 2002. Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic*, 3, 161-169.
- Hong, K.H. and Miller, V.L. 1998. Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *Journal of Bacteriology*, 180, 1793-1802.
- Hood, S.K., Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 145-153.
- Hu, L. and Kopecko, D.J. 2003. Typhoid *Salmonella*. *International handbook of foodborne pathogens*, 151-165, New York.
- Hultgren, S.J., Normark, S. and Abraham, S.N. 1991. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annual Review of Microbiology*, 45, 383-415.
- Jennings, M. E., Quick, L.N., Ubol, N., Shrom, S., Dollahon, N. and Wilson, J.W. 2012. Characterization of *Salmonella* type III secretion hyper-activity which results in biofilm-like cell aggregation. *Plos One*, e33080.
- Johnson, L., Horsman, S.R., Charron-Mazenod, L., Turnbull, A.L., Mulcahy, H., Surette, M.G. and Lawenza, S. 2013. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiology*, 13, 115.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U. and Melefors, O. 2010. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility

- systems of *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*, 12(2), 524-540.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U. and Melefors, O. 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, 70(1), 236-257.
- Jones, B.D. 2005. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *Journal of Microbiology*, 43, 110-117.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., Römling, U. 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 60, 602-616.
- Kato, A. and Groisman, E. A. 2008. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 631, 7-21.
- Kim, S.H. and Wei, C.I. 2009. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 72, 1841-1847.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48, 1511-1524.
- Klinman, D.M., H. Xie, S. Little, D. Currie and B. Ivins. 2004. CpG oligonucleotides improve the protective immune response induced by the anthrax vaccination of rhesus macaques. *Vaccine* 22:2881-2886.
- Knodler, L.A., Celli, J., Hardt, W.D., Vallance, B.A., Yip, C., Finlay, B.B. 2002. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Molecular Microbiology*, 43, 1089-1103.
- Krasteva, P.V., Fong, J.C., Shikuma, N.J. Beyhan, S., Navarro, M.V., Yildiz, F.H. and Sondermann, H. 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science*, 327(5967), 866-868.
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z. and Hasnain, S.E. 2017. Biofilms: Survival and defence strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307, 481-489.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamprokostopoulou, A., Monteiro, C., Rhen, M., and Römling, U. 2010. Cyclic di-GMP signalling controls virulence properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at the mucosal lining. *Environmental Microbiology*, 12(1), 40-53.
- Lamps, L.W. 2007. Infective disorders of the gastrointestinal tract. *Histopathology*, 50, 55-63.

- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H. and Haas, D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241-253.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penades, J.R. and Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1322-1339.
- Latasa, C., Echeverez, M., Garcia, B., Gil, C., Garcia-Ona, E., Burgui, S., Casares, N., Hervás-Stubbs, S., Lasate, J.J., Lasa, I., Solano, C. 2016. Evaluation of *Salmonella* Strain Lacking the Secondary Messenger C-di-GMP and Rpos as a Live Oral Vaccine. *PLOS One*, 11, e0161216
- Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R. and Lasa, I. 2006. Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*, 329, 849-857.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. and Altier, C. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1451-1464.
- Le Guyon, S., Simm, R., Rhen, M., Römling, U. 2014. Dissecting the c-di-GMP signaling network regulating motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1310-1320.
- Ledeboer, N.A. and Jones, B.D. 2005 Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *Journal of Bacteriology*, 187, 3214-3226.
- Ledeboer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M. and Jones, B.D. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, 74, 3156-3169.
- Lee, A.K., Detweiler, C.S., Falkow, S. 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Journal of Bacteriology*, 182, 771-781.
- Lippa, A.M. and Goulian, M. 2009. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLOS Genetics*, 5(12), e1000788.
- Lucchetti-Miganeh, C., Burrowes, E., Baysse, C. and Ermel, G. 2008. The posttranscriptional 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.
- Luo, Q., Shang, J., Feng, X., Guo, X., Zhang, L. and Zhou, Q. 2013. PrfA led to reduced biofilm formation and contributed to altered gene expression patterns in biofilm forming *Listeria monocytogenes*. *Current Microbiology*, 67(3), 372-378.
- Ma, L., Jackson, K.D., Landry, R.M., Parsek, M.R. and Wozniak, D.J. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl

- polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188, 8213-8221.
- Majdalani, N. and Gottesman, S. 2005. The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology*, 59, 379-405.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis, *Clinical Infectious Diseases*. 50(6), 882-889.
- Malcova, M., Karasova, D. and Rychlik, Ivan. 2009. *aroA* and *aroD* mutations influence biofilm formation in *S. Enteritidis*. *FEMS Microbiology*, 291(1), 44-49.
- Mariscotti, J.F. and Garcia-del Portillo, F. 2009. Genome expression analyses revealing the modulation of the *Salmonella* Rcs regulon by the attenuator IgaA. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1855-1867.
- Marshall, J.M., Flechtner, A.D., La Perle, K.M. and Gunn, J.S. 2014. Visualization of extracellular matrix components within sectioned *Salmonella* biofilms on the surface of human gallstones. *Plos One*, 9, e89243.
- Mattick, J.S. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Biochemistry*. 56, 289-314.
- Mazur, O. and Zimmer, J. 2011. Apo- and cellopentaose-bound structures of the bacterial cellulose synthase subunit BcsZ. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 17601-17606.
- McQuiston, J.R., Fields, P.I., Tauxe, R.V., Logsdon, J.M. Jr. 2008. Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends in Microbiology*, 16, 142-148.
- Mohamed, J.A., Teng, F., Nallapareddy, S.R. and Murray, B.E. 2006. Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* *sagA*-like genes, *salA* and *salB*, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. *Journal of Infection Disease*, 193, 231-240.
- Momba, M.N. and Kaleni, P. 2002. Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Research*, 36, 3023-3028.
- Monack, D.M., Bouley, D.M. and Falkow, S. 2004. *Salmonella* Typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1* +/- mice and can be reactivated by IFN gamma neutralization. *The Journal Experimental Medicine* 199, 231-241.
- Monack, D.M., Mueller, A., Falkow, S. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 747-765.
- Mondragon, V., Franco, B., Jonas, K., Suzuki, K., Romeo, T., Meleforts, O. and Gorgellis, D. 2006. pH dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8303-8306.

- Morgan, J.L., McNamara, J.T., Zimmer, J. 2014. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(5), 489-496.
- Morgan, J.L., Strumillo, J. and Zimmer, J. 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493, 181-186.
- Nam, D., Choi, E., Kweon, D.H. and Shin, D. 2010. The RstB sensor acts on the PhoQ sensor to control expression of PhoP-regulated genes. *Molecules and Cells*, 30(4), 363-368.
- Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., Kenney, L.J., Gunn, J.S., Fang, F.C. and Libby, S.J. 2005. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular Microbiology*, 56(2), 492-508.
- Neethirajan, S., Clond, M.A. and Vogt, A. 2014. Medical biofilms-nanotechnology approaches. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 2806-2827.
- Newman, J.A., Rodrigues, C. and Lewis, R.L. 2013. Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 10766-10778.
- Niba, E.T.E., Naka, Y., Nagase, M., Mori, H. and Kitakawa, M. 2007. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. *DNA Research*, 14, 237-246.
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., Littman, D.R. and Reinecker, H.C. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307, 254-258.
- Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A. 2007. Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4791-4799.
- Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S., Normark, S. 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 7, 523-536.
- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J. Melida, H., Mazur, O., Bulone, V. and Zimmer, J. 2013. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proceeding of National Academy of Science*, 110(44), 17856-17861.
- Pang, J.M., Layre, E., Sweet, L., Sherrid, A., Moody, D.B., Ojha, A. and Sherman, D.R. 2012. The polyketide Pks1 contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 194, 715-721.
- Parry, C.M., Hien, T.T., Dougan, G., White, N.J. and Farrar, J.J. 2002. Typhoid fever. *New England Journal of Medicine*, 347, 1770-1782.

- Pashine, A., John, B., Rath, S., George, A., Bal, V. 1999. Th1 Dominance in the Immune Response to Live *Salmonella* Typhimurium Requires Bacterial Invasiveness but Not Persistence. *International Immunology*, 11, 481-489.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., Harshey, R.M. 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Molecular Cell* 38(1), 128-139.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., Jenal, U. 2004. Cell cycle dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes and Development*, 18(6), 715-727.
- Paulander, W., Pennhag, A., Andersson, D.I. and Maisnier-Patin, S. 2007. *Caenorhabditis elegans* as a model to determine fitness of antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 766-769.
- Pegues, D.A., Hantman, M.J., Behlau, I., Miller, S.I. 1995. PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Molecular Microbiology*, 17, 169-181.
- Pernestig, A.K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S. and Melefors, O. 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 843-853.
- Pernestig, A.K., Melefors, O. and Georgellis, D. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 225-231.
- Pontes, M.H., Lee, E.J., Choi, J. and Groisman, E.A. 2015. *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 112, 5183-5188.
- Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Gheesling, L.L. 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*, 154(3), 173-174.
- Povolotsky, T.L. and Hengge, R. 2012. ‘Life-style’ control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *Journal of Biotechnology*, 160, 10-16.
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S., Nasser, W. 2012. The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Molecular Microbiology*, 86, 172-186.
- Prost, L.R., Daley, M.E., Le Sage, V., Bader, M.W., Le Moual, H., Klevit, R.E. and Miller, S.I. 2007. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular Cell*, 26(2), 165-174.

- Prouty, A.M. and Gunn, J.S. 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity*, 68, 6763-6769.
- Prouty, A.M. and Gunn, J.S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 71(12), 7154-7158.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Nillian, E., Ghazali, F.M., Cheah, Y.K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Radu, S. 2011. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*, 22, 337-342.
- Pultz, I.S., Christen, M., Kulasekara, H.D., Kennard, A., Kulasekara, B., Miller, S. I. 2012. The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Molecular Microbiology*. 86, 1424-1440.
- Raghunathan, D., Wells, T.J., Morris, F.C., Shaw, R.K., Bobat, S., Peters, S.E., Paterson, G.K., Jensen, K.T., Leyton, D.L., Blair, J.M., Browning, D.F., Pravin, J., Flores-Langarica, A., Hitchcock, J.R., Moraes, C.T., Piazza, R.M., Maskell, D. J., Webber, M.A., May, R.C., MacLennan, C.A., Piddock, L.J., Cunningham, A.F., Henderson, I.R. 2011. SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infection and Immunity*, 79, 4342-4352.
- Rakeman, J.L. and Bonifield, H.R., Miller, S.I. 1999. A HilA-independent pathway to *Salmonella* Typhimurium invasion gene transcription. *Journal of Bacteriology*, 181, 3096-3104.
- Recht, J. and Kolter, R. 2001. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5718-5724.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2, 361-367.
- Robbe-Saule, V., Jaumouille, V., Prevost, M.C., Guadagnini, S., Talhouarne, C., Mathout, H., Kolb, A. and Norel, F. 2006. Crl activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3983-3994.
- Rollet, C., Gal, L. and Guzzo, J. 2009. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 290, 135-142.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun S, de Vroom E, van der Marel G.A., van Boom J.H. and Benziman, M. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101), 279-281.

- Römling, U. 2005. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cellular and Molecular Life Science*, 62, 1234-1246.
- Römling, U. and Rohde, M. 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. *FEMS Microbiological Letters*, 180, 91-102.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D. and Normark, S. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology*, 80, 722-731.
- Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., and Tschape, H. 2003. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(4), 273-285.
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M. 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(1), 1-52.
- Römling, U., Rohde, M., Olsen A., Normark, S. and Reinkoster, J. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36, 20-23.
- Römling, U., Sierralta, W.D, Eriksson, K., Normark, S. 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, 28(2), 249-264.
- Rumbo, M., Anderle, P., Didierlaurent, A., Sierro, F., Debard, N., Sirard, J.C., Finke, D., Kraehenbuhl, J.P. 2004. How the gut links innate and adaptive immunity. *Annals of the New York Academy of Science*, 1029, 16-21.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P., Maxwell Dow, J. 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceeding of National Academy of Science*, 103, 6712–6717.
- Rydstrom, A. and Wick, M.J. 2007. Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection, *Journal of Immunology*, 178, 5789-5801.
- Ryjenkov, D.A, Tarutina, M., Moskvina, O.V., Gomelsky, M. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in Bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1792–1798.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U. and Gomelsky, M. 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30310-30314.

- Salcedo, S.P., Noursadeghi, M., Cohen, J. and Holden, D.W. 2001. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cellular Microbiology*, 3, 587-597.
- Sansonetti, P.J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, 4, 953-964.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G. and Baumler, A.J. 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*, 3, 1335-1344.
- Saxena, I.M., Brown Jr, R.M., Fevre, M., Geremia, R.A. and Henrissat, B. 1995. Multidomain architecture of β -glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *Journal of Bacteriology*, 177, 1419-1424.
- Saxena, I.M., Kudlicka, K., Okuda, K., and Brown, R.M. 1994. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *Journal of Bacteriology*, 176, 5735-5752.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. and Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M. 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology*. 187(14), 4774-4781.
- Schmidt, J., Müsken, M., Becker, T., Magnowska, Z., Bertinetti, D., Möller, S., Zimmermann, B., Herberg, F.W., Jänsch, L. and Häussler, S. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PLOS One*, 6.
- Scott, R.D.I. 2009. The Direct Medical Costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the Benefits of Prevention. Division of Healthcare Quality Promotion National Center for Preparedness, Detection and Control of Infectious Diseases.
- Serra, D.O., Richer, A.M. and Hengge, R. 2013. Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 195, 5540-5554.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D.W. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *Proceeding of National Academy of Science*, 93, 2593-2597.
- Shin, D. and Groisman, E.A. 2005. Signal-dependent binding of the response regulators PhoP and PmrA to their target promoters in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4089-4094.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A. and Teixeira, P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2.

- Simm, R., Ahmad, I., Rhen, M., Le Guyon, S. and Römling, U. 2014. Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Future Microbiology*, 9, 1261-1282.
- Simm, R., Fetherston, J.D., Kader, A., Romling, U. and Perry, R.D. 2005. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. *Journal of Bacteriology*, 187, 6816-6823.
- Simm, R., Lusch, A., Kader, A., Andersson, M., Römling, U. 2007. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3613-3623.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. and Römling, U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 53(4), 1123-1134.
- Simm, R., Remminghorst, U., Ahmad, I., Zakikhany, K. and Römling, U. 2009. A Role for the EAL-Like Protein STM1344 in Regulation of CsgD Expression and Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 191(12), 3928-3937.
- Solano, C., Garcia, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedrosa, E., Lasa, I. 2009. Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proceeding of National Academy of Science*, 106(19), 7997–8002.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C. and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43, 793-808.
- Song, H., Kong, W., Weatherspoon, N., Qin, G., Tyler, W., Turk, J., Curtiss, R., Shi, Y. 2008. Modulation of the regulatory activity of bacterial two-component systems by SlyA. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28158-28168.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., and Rainey, P.B. 2003. Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology* 50, 15-27.
- Stecher, B., Macpherson, A.J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T., Hardt, W.D. 2005. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germ free mice and mice pretreated with streptomycin. *Infection and Immunity*, 73, 3228-3241.
- Steele-Mortimer, O., 2008. Infection of epithelial cells with *Salmonella enterica*. *Methods Mol. Biol.* 431, 201–211.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., de Keersmaecker, S.C. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45, 502-531.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-179.

- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R. and Romeo, T. 2006. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes and Development*, 20(18), 2605-2617.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P. And Romeo, T. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5130-5140.
- Taga, M.E. and Bassler, B.L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proceeding of National Academy of Science*, 100, 14549-14554.
- Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T., Hughes, K.T. 2012. YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Molecular Microbiology*, 83(6), 1268-1284.
- Takaya, A., Suzuki, M., Matsui, H., Tomoyasu, T., Sashinami, H., Nakane, A. and Yamamoto, T. 2003. Lon, a stress-induced ATP dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. *Infection and Immunity*, 71, 690-696.
- Tamayo, R., Pratt, J.T. and Camilli, A. 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Review Microbiology*, 61, 131-148.
- Teplitski, M., Al-Agely, A. and Ahmer, B.M. 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 152(11), 3411-3424.
- Teplitski, M., Goodier, R.I. and Ahmer, B.M. 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7257-7265.
- Thijs, I.M., De Keersmaecker, S.C., Fadda, A., Engelen, K., Zhao, H., McClelland, M., Marchal, K. and Vanderleyden, J. 2007. Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *Journal of Bacteriology*, 189, 4587-4596.
- Tierrez, A. and Garcia-del Portillo, F. 2004. The *Salmonella* membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7481-7489.
- Tobar, J.A., Carreno, L.J., Bueno, S.M., Gonzalez, P.A., Mora, J.E., Quezada, S.A. and Kalergis, A.M. 2006. Virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infection and Immunity*, 74, 6438-6448.
- Tu, X., Latifi, T., Bougdour, A., Gottesman, S., and Groisman, E.A. 2006. The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in *Salmonella enterica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36); 13503-13508.

- Tükel, C., Nishimori, J.H., Wilson, R.P., Winter, M.G., Kestra, A.M., van Putten, J.P. and Baumber, A.J. 2010. Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell Microbiology*, 12(10), 1495-1505.
- Ulett, G.C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J.M. and Schembri, M.A. 2007. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infection and Immunity*, 75, 3233-3244.
- Valdez, Y., Grassl, G.A., Guttman, J.A., Coburn, B., Gros, P., Vallance, B.A. and Finlay, B.B. 2009. Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during *Salmonella*-induced colitis in mice. *Cell Microbiology*, 11, 351-362.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumber, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T., Fang, F.C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401, 804-808.
- Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5, 20.
- Wada, T., Morizane, T., Abo, T., Tominaga, A., Inoue-Tanaka, K., Kutsukake, K. 2011. EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. 193(7), 1600-1611.
- Wallis, T.S. and Galyov, E.E. 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36, 997-1005.
- Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y., Huang, R. 2014. Extracellular DNA inhibits *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* serovar Typhi biofilm development on abiotic surfaces. *Current Microbiology*, 68, 262-268.
- Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M. and Harshey, R.M. 2007. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8447-8457.
- Wang, X., Rochon, M., Lamprokostopoulou, A., Lünsdorf, H., Nimtz, M., Römling, U. 2006. Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cellular and Molecular Life Science*, 63(19-20), 2352-2363.
- White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Baner, P.A., and Kay, W.W. 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5398-5407.

- White, A.P., Gibson, D.L., Grassl, G.A., Kay, W.W., Finlay, B.B., Vallance, B.A., Surette, M.G. 2008. Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 76(3), 1048-1058.
- White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W. and Surette, M.G. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3219-3227.
- White, A.P., Weljie, A.M., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R., Vogel, H.J. and Surette, M.G. 2010. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PLOS ONE*, 5(7), e11814.
- Wong, K.K., McClelland, M., Stillwell, L.C., Sisk, E.C., Thurston, S.J., Saffer, J.D. 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infection and Immunity*, 66, 3365-3371.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., Galyov, E.E. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular Microbiology*, 29, 883-891.
- Woodward, M.J., Sojka, M., Springings, K.A., Humphrey, T.J. 2000. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 481-487.
- Xie, H., Gursel, I., Ivins, B.E., Singh, M., O'Hagan, D.T., Ulmer, J.B., Klinman, D.M. 2005. CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polylactide-co-glycolide microparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed anthrax vaccine. *Infection and Immunity*. 73(2); 828-833.
- Yrliid, U., Svensson, M., Hakansson, A., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Wick, M.J. 2001. In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and Immunity*, 69, 5726-5735.
- Zakikhany, K., Harrington, C.R., Nimtz, M., Hinton, J.C., Romling, U. 2010. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 77, 771-786.
- Zhang, S., Kingsley, R.A., Santos, R.L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R.M., Adams, L.G., Baumler, A.J. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity*, 71, 1-12.
- Zheng, Y., Sambou, T., Bogomolnaya, L.M., Cirillo, J.D., McClelland, M., Andrews-Polymenis, H. 2013. The EAL domain containing protein STM2215 (rtn) is needed during *Salmonella* infection and has cyclic di-GMP phosphodiesterase activity. *Molecular Microbiology*, 89(3), 403-419.
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., and Römling, U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 71, 4151-4158.

- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452-1463.
- Zorraquino, V., Garcia, B., Latasa, C., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Lasa, I., Solano, C. 2013. Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *Journal of Bacteriology*, 195, 417-428.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Caner ÖZDEMİR
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 17.02.1984
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Dikmen Lisesi (YDA)
Lisans : Selçuk Üniversitesi, Fen fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü (2015)
Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü (2020)

Yayınlar (SCI)

“Effect of different culture media on biodegradation of triclosan by *Rhodotorula mucilaginosa* and *Penicillium* sp.” Water Science and Technology, 2016;74(2):473-81.

“The role of extracellular DNA in *Salmonella* biofilms” Molecular Genetics, Microbiology and Virology, January 2018, Volume 33, Issue 1, pp 60–71.

“Toxicity assessment of pesticide triclosan by aquatic organisms and degradation studies”, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017 Dec; 91:208-215.

Uluslararası Kongre Sunum

29/04/2017 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Vienna/AUSTRIA. “Anti-biofilm potential effect of *Lactococcus lactis* CNM81 strain isolated from raw milk on *Salmonella* Typhimurium SL1344 Biofilm”

21/03/2015 International Conference on Biomedical Engineering and Environmental Technology (BMEET) London/ ENGLAND. ‘Comparasion of the removal capacities of fungal and microalgal isolates in wastewater by advanced technological methods’

29/04/2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Copenhagen/ DENMARK ‘The Roles of Extracellular DNA in *Salmonella* Biofilms: Is It Intimate Relationship with Matrix or Initial Adhesion’

27/04/2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Copenhagen/ DENMARK ‘More Powerful *Salmonella* biofilms: a new scenario directed by the subinhibitory antibiotic consantrations’

21-23 Ekim 2016 International Conference on Biological Sciences, Konya/ TÜRKİYE. ‘Does sub-inhibitory concentrations of clinically important antibiotics induce biofilm production of *Enterococcus faecium* strain?’

14-17 Eylül 2015 XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Muğla/TÜRKİYE ‘*Chlorella* sp.’nin triklosan giderim kapasitesinin ileri teknolojik yöntemlerle analizi’