ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SALMONELLA TYPHIMURIUM'DA TİP 1 FİMBRİYANIN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Tuba Nur SÜRKAÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SALMONELLA TYPHIMURIUM'DA TİP 1 FİMBRİYANIN BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Tuba Nur SÜRKAÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, *fimF* geninin *S.* Typhimurium ATCC 14028 suşunda biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile, 14028 suşunun *fimF* ve dam geni mutantları yanında, *fimF* geninin sadece N domainininin klonlandığı konstrakt kullanıldı. *S.* Typhimurium *fimF* ve *dam* mutantında, doğal suşa oranla biyofilm oluşumunun istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.05$), *fimF* geninin N domaini klonlanmış konstraktında ise, *fimF* mutantına oranla biyofilm oluşturma kapasitesinin arttığı saptandı ($p<0.05$). Doğal tip ve mutant suşların oluşturduğu biyofilm morfotipleri incelendiğinde; doğal tip suş 'rdar' morfotip gösterirken, *fimF* mutant suşunun ve onun N domaini klonlanmış konstraktının 'bdar' morfotipe dönüştüğü ve *dam* mutant suşunun ise, tam 'rdar' morfotipi olmayan, 'ara morfotip' olarak adlandırdığımız biyofilm morfotipini gösterdiği saptandı. Bunun yanında, *fimF* geninin, bu genin sadece N domainini ifade eden gen bölgesinin ve *dam* geninin, *Salmonella'*da pelikül oluşumu ve peliküllerin yapısal özellikleri üzerinde etkili olduğu belirlendi. Katı ve sıvı kültür ortamlarında mutant suşların doğal tipe kıyasla daha az, *fimF* geninin N domaini klonlanmış konstraktının, *fimF* mutant suşuna oranla daha fazla selüloz ürettiği belirlendi. Bu suşların yüzde otoagregasyon miktarları karşılaştırıldığında, doğal tipe kıyasla *fimF* ve *dam* mutantlarında otoagregasyon yeteneği bakımından istatistiki açıdan önemli düzeyde azalma ($p<0.05$) tespit edildi. Oksidatif stres koşullarında bakteriyel üreme oranları incelendiğinde, doğal tip suş ve *fimF* geninin N domaini klonlanmış konstraktının aksine, *fimF* ve *dam* mutantlarında artış olduğu saptandı. HEp-2 ve Caco-2 hücrelerine tutunma denemeleri sonucu, *fimF* mutant suşunda doğal suşa kıyasla aderansının önemli ölçüde düştüğü saptandı ($p<0.05$).

Aralık 2022, 87 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *S.* Typhimurium, *dam*, *fimF*, tip 1 fimbriya, biyofilm, selüloz

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT of TYPE 1 FIMBRIAE ON BIOFILM FORMATION IN *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Tuba Nur SÜRKAÇ

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, in order to determine the effect of *fimF* gene on biofilm formation in *S.* Typhimurium ATCC 14028 strain, *fimF* and *dam* gene mutants of 14028 strain, as well as the construct in which only the N domain of the *fimF* gene was cloned was used. In the *S.* Typhimurium *fimF* and *dam* mutant, biofilm formation was found to be statistically significantly reduced compared to the wild strain ($p<0.05$), while the N domain cloned construct of the *fimF* gene increased the biofilm forming capacity compared to the *fimF* mutant ($p<0.05$). When the biofilm morphotypes formed by wild type and mutant strains are examined; It was determined that the wild type strain showed the 'rdar' morphotype, while the *fimF* mutant strain and its N domain cloned construct converted to the 'bdar' morphotype, and the *dam* mutant strain showed the biofilm morphotype, which we call the 'intermediate morphotype', without the complete 'rdar' morphotype. In addition, it was determined that the *fimF* gene, the gene region expressing only the N domain of this gene, and the *dam* gene were effective on pellicle formation and structural properties of pellicles in *Salmonella*. It was determined that mutant strains produced less cellulose compared to wild type in solid and liquid culture media, and the N-domain cloned construct of *fimF* gene produced more cellulose compared to the fimF mutant strain. When the percent autoaggregation amounts of these strains were compared, a statistically significant decrease ($p<0.05$) was found in *fimF* and *dam* mutants in terms of autoaggregation ability compared to wild type. When bacterial growth rates were examined under oxidative stress conditions, it was determined that there was an increase in *fimF* and *dam* mutants, in contrast to the wild type strain and the N-domain cloned construct of the *fimF* gene. As a result of the adhesion experiments to HEp-2 and Caco-2 cells, it was determined that the adherence of the *fimF* mutant strain was significantly reduced compared to the wild strain ($p<0.05$).

December 2022, 87 Pages

Key Word: *S.* Typhimurium, *dam*, *fimF*, type 1 fimbriae, biofilm, selluloce

TEŞEKKÜR

Tüm tez yolculuğum boyunca, gölgesini üzerimden hiç eksik etmeyen, üstün bilgi birikimiyle en iyisini başarabilmem için beni destekleyen, kendi kişiliğimi keşfetmeme yardımcı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Gösterdiği muhteşem ve gerçek dostluğun yanı sıra, tez sürecimin her anında bilgi ve deneyimini benimle paylaşan sevgili laboratuvar arkadaşım Elif Gamze HAS'a, ayrıca gösterdikleri bilimsel ve manevi arkadaşlıktan ötürü başta Dr. Caner ÖZDEMİR olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Beni bugünlere getiren, yanımda olan, yeri geldiğinde Ankara'ya denizi getirebileceğime inanan sevgili annem Mürvet SÜRKAÇ ve değerli babam Ali SÜRKAÇ'a minnetlerimi borç bilirim. Tüm bunların haricinde, lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca gerek bilimsel olarak gerekse manevi olarak yanımda olan başta dostum Duygu KORKMAZ'a ve tüm değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tuba Nur SÜRKAÇ
Ankara, Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK ..... **i**

ÖZET ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **iv**

SİMGELER DİZİNİ ..... **viii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiv**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **3**

2.1 *Salmonella* Patojeni **3**

2.2 Fimbriyal Adezinler **4**

2.2.1 Şaperon-Usher Yolağı **8**

2.2.2 İnce Agregatif Fimbriya: Nucleation-Precipitation (N/P, birleşme çekirdeği oluşturarak çökme) Yolağı **11**

2.2.3 Tip IV Fimbriya Yolağı **12**

2.3 Tip 1 Fimbriya **13**

2.4 Tip 1 Fimbriya Ekspresyonunun Regülasyonu **15**

2.4.1 Direkt regülasyon **16**

2.4.2 Global regülasyon **18**

2.4.3 Tip 1 fimbriya üretimi ve virülans arasındaki ilişki **19**

2.5 Tip 1 Fimbriyanın Biyofilm Oluşumundaki Rolü ve *Salmonella*'nın Hücrelere Adezyonu **20**

2.6 Bakteriyel Adezyonda Görevli *fimF* Geni ve Kodladığı Proteinin Karakteristikleri **23**

2.7 Replikasyon Orijininde Görev Alan *dam* Geni ve Kodladığı Proteinin Karakteristikleri **25**

3. MATERYAL ve YÖNTEM **29**

3.1 Materyal **29**

3.1.1 Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları **29**

3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler 29

3.1.3 Antibiyotikler 31

3.2 Yöntem 32

3.2.1 *fimF* gen bölgesini içeren rekombinant plazmidin eldesi 32

3.2.1.1 Genomik DNA izolasyonu 32

3.2.1.2 *fimF* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltılması 33

3.2.1.3 Saf *fimF* PZR ürünü eldesi 35

3.2.1.4 Plazmid izolasyonu 35

3.2.1.5 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi 36

3.2.1.6 DNA bağlanma reaksiyonu (Ligasyon) 38

3.2.1.7 *E. coli* BL21 suşuna 3i/1v ligasyon ürününün transformasyonu 38

3.2.1.8 Elektrokompotent hücrelerin hazırlanması ve *S.* Typhimurium ATCC 14028 *fimF* mutant suşuna rekombinant plazmidin transformasyonu 40

3.2.2 Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi 41

3.2.3 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi 41

3.2.4 Bakteriyel hücre agregasyonunun belirlenmesi 42

3.2.5 Oksidatif stres koşullarına bakterilerin direncinin belirlenmesi 43

3.2.6 Cam slaytlar üzerinde oluşturulan pelikül yapılarının selüloz içeriğinin tanımlanması 43

3.2.7 Kongo Red içeren LB^{-NaCl} agar besiyerinde doğal tip suş ve mutantlarda biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi 44

3.2.8 Kalkoflor bağlanma denemesi 44

3.2.9 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının pelikül oluşturma özellikleri 44

3.2.10 Caco-2 ve HEp-2 hücrelerine bakteriyel aderansın belirlenmesi 45

3.2.11 Dam ve FimF proteinlerinin 3 boyutlu yapı analizi 45

3.2.12 İstatistiki analizler 46

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 47

4.1 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Suşuna Ait *fimF* Geninin N Terminal Domaininin pBAD24 Vektörüne Klonlanması ve Rekombinant Vektörüne Aktarımı 47

4.1.1 *S.* Typhimurium ATCC 14028 suşunda *fimF* geninin çoğaltılması 47

4.1.2 Klonlamada kullanılacak fragmentlerde yapışkan uç oluşturma 48

4.1.3 DNA bağlama reaksiyonu (Ligasyon) 49

4.1.4 Genetik aktarım (Elektroporasyon) 50

4.1.5 Elektrotransformantlardan plazmid izolasyonu 51

4.1.6 İnsert genin doğrulanması 51

4.1.7 Rekombinant plazmidlerin *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* hücrelerine aktarımı 52

4.2 Polistiren Yüzeyde Doğal Tip ve Mutant Suşların Biyofilm Denemesi 53

4.3 Bakteriyel Hücre Agregasyonunun Belirlenmesi 54

4.4 Oksidatif Stres Koşullarına Bakterilerin Direncinin Belirlenmesi 55

4.5 Cam Slaytlar Üzerinde Oluşturulan Biyofilm Yapılarının Selüloz İçeriğinin Tanımlanması 57

4.6 Kongo Red İçeren LB^{-Nacl} Agar Besiyerinde Doğal Tip ve Onun Mutant Suşlarında Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi 59

4.7 Kalkoflor Bağlanma Denemesi 60

4.8 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Doğal Tip ve Mutant Suşlarının Pelikül Oluşturma Özellikleri 63

4.9 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Doğal Tip ve *fimf* Mutant Suşunda Caco-2 Ve HEp-2 Hücrelerine Bakteriyel Aderansın Değişimi 65

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 69

KAYNAKLAR 73

ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta/Mutant
°	Derece
γ	Gama
κ	Kappa
λ	Lambda
Ω	Ohm
π	Pi
σ	Sigma
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
%	Yüzde
Bç	Baz çifti
g	Gram
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Hidrojen gücü – asitlik
pmol	Pikomol

rpm	Dakikadaki devir sayısı
V	Volt
xg	G Kuvveti

Kısaltmalar

ATP	Adenozin Trifosfat
Caco-2	İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinomu
CFU/mL	Mililitredeki Toplam Bakteri Sayısı
CO_2	Karbondioksit
CU	Şaperon Usher
Dam	DNA adenin metilaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit
ECM	Hücre Dışı Matriks
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmüno-Sorbent Teknik
EPS	Hücre Dışı Polimerik Madde (Eksopolisakkarit)
EtOH	Etanol
FGC	Fimbriyal Gen Kümesi
FimF	Fimbriyal benzeri protein F
GAG	Glikozaminoglikan
GSP	Genel Sekresyon Yolağı
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HEp-2	İnsan Epitelyal Hücre-2
LB	Luria Bertani
LRP	Lösine Duyarlı Regülatör Protein
N-HS	Histon Benzeri Nükleoid
N/P	Nucleation Precipitation (Birleşme Çekirdeği Oluşturarak Çökme)
NK	Negatif Kontrol
OD	Optik Dansite
PAMP	Patojen İlişkili Moleküler Örüntüler
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
Pef	Plazmid Kodlu Fimbriya

P_{fimA}	*fimA* Promotörü
PK	Pozitif Kontrol
PMF	Proton Hareket Kuvveti
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
S.	*Salmonella*
SAM	S-adanozil-L-metiyonin
SeqA	Sequestration (Tecrit) A Regülatör Protein
SPI-1	*Salmonella* Patojenite Adası-1
SPI-7	*Salmonella* Patojenite Adası-7
T2SS	Tip 2 Sekresyon Sistemi
T3SS	Tip 3 Sekresyon Sistemi
Tafi	İnce Agregatif Fimbriya
tRNA	Transfer RNA
UV	Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Salmonella* fimbriyalarının farklı tipleri (Rehman vd. 2019) 6

Şekil 2.2 *Salmonella* fimbriya'nın adezif mekanizması (Rehman vd. 2019) 8

Şekil 2.3 Şaperon-Usher yolağı tarafından gerçekleştirilen fimbriya biyogenezinin modellenmesi (Werneburg ve Thanassi 2018) 10

Şekil 2.4 *S. enterica* serovar Typhimurium'un *fim* gen kümesinin şeması (Boyd ve Hartl 1999 esinlenilerek çizilmiştir) 14

Şekil 2.5 Biyofilm oluşum diyagramı (Sürkaç ve Akçelik 2022) 22

Şekil 2.6 *S.* Typhimurium ATCC 14028 FimF proteininin 3 boyutlu yapısı (Phyre2 ile çizildi) 24

Şekil 2.7 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Dam proteininin 3 boyutlu yapısı (Phyre2 ile çizildi) 26

Şekil 3.1 Amfisilin direnç genini barındıran pBAD24 plazmidinin genetik haritası…… 36

Şekil 4.1 *fimF* geni N terminal bölgesi PZR ürünü……...47

Şekil 4.2 pBAD24 plazmid vektörü ve *fimF* geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi..... 48

Şekil 4.3 Rekombinasyon ürünleri 49

Şekil 4.4 *Escherichia coli* BL21 suşuna *fimF* geninin N terminal domaininin aktarıldığı pBAD24 vektör plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamında gelişimi 50

Şekil 4.5 Seçilen BL21 kolonilerinin plazmid içeriği 51

Şekil 4.6 Seçilen BL21 Rekombinat vektör üzerinde çoğaltılan *fimF* geni N terminal bölgesi..... 52

Şekil 4.7 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* elektrotransformantlarının antibiyotik dirençlilik kriterine göre üreme ortamında seçimi 53

Şekil 4.8 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının polistiren yüzeylerde biyofilm üretim karakteristikleri 54

Şekil 4.9 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının yüzde otoagregasyon karakteristikleri..... 55

Şekil 4.10 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının 4mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ihtiva eden ortamda stres koşuluna verdikleri tepkilerin karakteristikleri 56

Şekil 4.11 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu ve mutant suşlarının cam kuponlar üzerinde oluşturduğu pelikül yapısının kalkoflor bağlanma yeteneğinin 5x objektif altında floresan mikroskobu görüntüsü 57

Şekil 4.12 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu ve mutant suşlarının cam kuponlar üzerinde oluşturduğu pelikül yapısının kalkoflor bağlanma yeteneğinin 20x objektif altında floresan mikroskobu görüntüsü 58

Şekil 4.13 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu ve mutant suşlarının cam kuponlar üzerinde oluşturduğu pelikül yapısının kalkoflor bağlanma yeteneğinin 40x objektif altında floresan mikroskobu görüntüsü 59

Şekil 4.14 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının kongo redli agar yüzeyde oluşturdukları biyofilm morfotiplerinin stereo mikroskop görüntüsü 60

Şekil 4.15 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve doğal tip pBAD suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin katı besiyerinde incelenmesi..... 61

Şekil 4.16 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*dam* ve Δ*dam* (pBAD*dam*) suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin katı besiyerinde incelenmesi..... 61

Şekil 4.17 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF ve* Δ*fimF (*pBAD*fimF*) suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin katı besiyerinde incelenmesi..... 62

Şekil 4.18 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin sıvı besiyerinde incelenmesi..... 63

Şekil 4.19 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının tuzsuz LB besiyerinde pelikül oluşturma miktarları..... 64

Şekil 4.20 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suş ve *fimF* mutantının Caco-2 hücrelerine aderansı 66

Şekil 4.21 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suş ve *fimF* mutantının HEp-2 hücrelerine aderansı 67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1 Antibiyotik çözeltileri 31

Çizelge 3.2 Gen spesifik primer dizileri 33

Çizelge 3.3 PZR içeriği 34

Çizelge 3.4 PZR Koşulları 34

Çizelge 3.5 Enzim kesim reaksiyon karışımı 37

Çizelge 3.6 DNA bağlanma reaksiyonu karışımı 38

Çizelge 3.7 Elektroporasyon koşulları 39

Çizelge 3.8 Koloni PZR reaksiyon içeriği 39

Çizelge 3.9 Koloni PZR koşulları 40

Çizelge 4.1 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının oluşturduğu pelikül yapılarının özellikleri 65

1. GİRİŞ

Biyofilm yapıları, mikrobiyal hücrelerin biyotik ve abiyotik yüzeylere ya da ara yüzeylere tutunarak, kendi ürettikleri hücre dışı bir polimerik madde (EPS) matriksi içerisinde oluşturdukları topluluklardır. Biyofilm yapılarının diğer mikroorganizma topluluklarından ayırıcı özelliği; üreme ve gen ekspresyonu açısından ortak regülasyon karakteristikleri kazanmalarıdır. Bu özellik onlara çok hücreli organizma benzeri bir yapı kazandırır (Donlan 2002, Flemming ve Wingender 2010, Jamal vd. 2018). Biyofilm yapılarında bulunan hücreler, aynı hücrelerin planktonik formlarına nazaran çevresel stres koşullarına karşı çok daha dirençlidirler. Bu nedenlerle biyofilm formlarından kaynaklanan enfeksiyonların ya da kontaminasyonların klasik sanitasyon stratejileri ile giderilmesi olanaklı değildir (Lamas vd. 2018). *Salmonella* kaynaklı enfeksiyonların ve endüstriyel kontaminasyonların en az % 85'inin bu bakterilerin planktonik değil, biyofilm formlarından kaynaklandığı gerçeği göz önünde bulundurulduğunda, bu patojenle mücadele stratejisinin biyofilm formları esas alınarak yeniden biçimlendirilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Söz konusu strateji değişikliği için öncelikle, biyofilm oluşumunun genetik, fizyolojik ve çevresel esaslarının detaylı bir şekilde tanımlanması zorunludur.

Tez çalışmasının temel hareket noktasını belirleyen bu saptama ışığında, tip 1 fimbriyanın *Salmonella*'da biyofilm oluşumu üzerinde etkinliğinin ve oksidatif stres yanıtına katkısının belirlenmesi hedeflenmiştir. Tip 1 fimbriya, *Salmonella* ve *E. coli* suşlarının çoğunda ve *Enterobacteriaceae* familyasının diğer birçok üyesinde bulunmaktadır (Jones vd. 1995, Wright vd. 2007). Tip 1 fimbriya, *Salmonella*'nın abiyotik yüzeylere ve farklı konakçı hücrelere etkili bir şekilde tutunmasını sağlayan yapılardan biridir. Tip 1 fimbriyalar, uç adezini FimH aracılığı ile hücrelerdeki şeker yapılarını içeren mannoza bağlanmaktadır (Duguid ve Campbell 1969, Nuccio ve Baumler 2007). Farklı çalışmalarda söz konusu fimbriyanın; *Salmonella*'nın ökaryotik hücrelere tutunmasında, kolonizasyonunda ve *S.* Typhimurium'un konakçı hücreleri istilasında kritik roller üstlendiği belirlenmiştir. *S.* Typhimurium fimbriyal gen kümesi (*fim*); yapısal proteinleri, montaj bileşenlerini ve bağımsız olarak transkribe edilen üç regülatör geni (*fimZ, fimY ve*

fimW) kodlayan, altı gen içeren bir operon organizasyonu (*fimAICDHF*) içermektedir (Pratt ve Kolter 1998, Blumer vd. 2005).

Escherichia coli'de tip 1 fimbriyanın biyotik ve abiyotik yüzeylere spesifik olmayan bağlanmasının incelendiği bir çalışmada, söz konusu özelliğin biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer bazı çalışmalarda, Tip 1 fimbriyanın çeşitli konakçı dokularına ilk kolonizasyonunda anahtar bir rol oynadığı saptanmış, ancak bu özelliğin biyotik ya da abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumuna katkısına dair yeterli bir veri sunulamamıştır (Bouckaert vd. 2006, Rosen vd. 2008). Tip 1 fimbriyanın biyofilm oluşumundaki rolü üzerine, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de oldukça sınırlı ve birbiri ile çelişen veriler bulunmaktadır. *Salmonella* üyeleri için ise bu konuda literatür araştırmalarımız doğrultusunda doğrudan bir veri elde edilememiştir. Ancak, son yıllarda *S.* Typhimurium'da tip 1 fimbriya üretiminin oksidatif stres yanıtını güçlendirdiğinin belirlenmesi (Mannan vd. 2020), bu konunun araştırılmasını elzem hale getirmiştir. Zira esasta biyofilmler, bakterilerin çevresel stres koşullarını tolore etmek için oluşturdukları yapılardır. Patojenlerin konakçı sistemlerde en yaygın karşılaştığı stres koşulunun da oksidatif stres olduğu düşünülür ise; bu tezin ana çerçevesini oluşturan tip 1 fimbriyanın biyofilm üzerindeki rolünün oksidatif stres yanıtı ile birleştirilerek analiz edilmesi, çalışma hipotezinin test edilmesinde daha güçlü veriler sunması açısından önem taşımaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Patojeni

Salmonella cinsi üyeleri insan ve hayvan sistemlerini konak olarak kullanması yanında, bitkilerin yüzeyinde ve dokularında uzun süreli kalıcılık yeteneği içermesi nedeni ile dünya çapında büyük bir halk sağlığı sorunu yaratan önemli patojenlerdir. Gelişmekte olan ülkelerde hastane ya da gıda kökenli salgınlara neden olan bu bakteriler, *Enterobacteriaceae* familyası üyesi, çubuk şeklinde, Gram negatif ve anaerobik özellikleri ile karakterize edilmektedir (Crump 2004, Threlfall 2002, Su 2007, Roy 2021). *Salmonella* cinsinin 2.600'den fazla serovaryetesi tanımlanmış ve bunların büyük bir çoğunluğunun insanlarda enfeksiyona sebebiyet veren *Salmonella enterica* türüne ait olduğu saptanmıştır (Threlfall 2002, Brown 2021).

Salmonella cinsi bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlar, tifoidal ve tifoidal olmayan *Salmonella* enfeksiyonları olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tifoidal olmayan *Salmonella* enfeksiyonlarının (gastroenterit etmeni, NTS) % 25 gibi büyük bir bölümünden *S.* Typhimurium serovaryetesi sorumlu bulunmuştur (Branchu 2018). Tifoidal *Salmonella* enfeksiyonlarının (TS) başlıca etmeni ise, *S.* Typhi serovaryetesidir. *S.* Typhi enfeksiyonunun gastroenterite neden olan NTS enfeksiyonlarından temel ayırıcı özelliği, sistemik oluşudur (McClelland vd. 2001).

S. enterica sp. I, insanlarda salmonelloza sebep olduğu bilinen en yaygın *Salmonella* türüdür. Filogenetik analizler dikkate alındığında *S. enterica* spp. I, beş farklı sınıfa ayrılır. Bunlar; ana serovarı Typhimurium olan ve genellikle gastroenterite neden olan IA sınıfı, Pullorum, Gallinarum, Dublin ve Enteritidis serovarlarının dahil olduğu benzer fimbriyal gen kümesine ve O-antijene sahip olan IB sınıfı, Paratyphi C ve Choleraesuis serovarlarından oluşan IC sınıfı, insana özgü olduğu bilinen Typhi ve Paratyphi serovarının dahil olduğu ID sınıfı ve Kentucky, Tennessee, Montevideo, Welterveden, Javiana ve Schwarzengrund gibi yenilebilir bitkilerden izole edilen serovarlarının dahil olduğu IE sınıfı olarak tanımlanmıştır (Rehman vd. 2019).

Hem tifoidal hem de tifoidal olmayan *Salmonella* enfeksiyonlarında rol oynayan genetik determinantlara ilişkin genomik veriler her geçen gün artmaktadır. Ancak, halen tüm tifoidal *Salmonella* enfeksiyonlarının genetik tanısını yapabileceğimiz basit bir tanı testi geliştirilebilmiş değildir. Bunun için halen geçerliliğini sürdüren uzun bir prosedür kullanılmaktadır. Öncelikle *Salmonella* varlığı belirlenmekte ve ardından tifoidal olmayan *Salmonella* ile tifoidal *Salmonella* ayırımı için gerçek zamanlı bir PZR testi uygulanmaktadır. Son aşamada ise; biyokimyasal, fizyolojik ve serolojik doğrulama testleri gerçekleştirilmektedir (Nair 2019).

2.2 Fimbriyal Adezinler

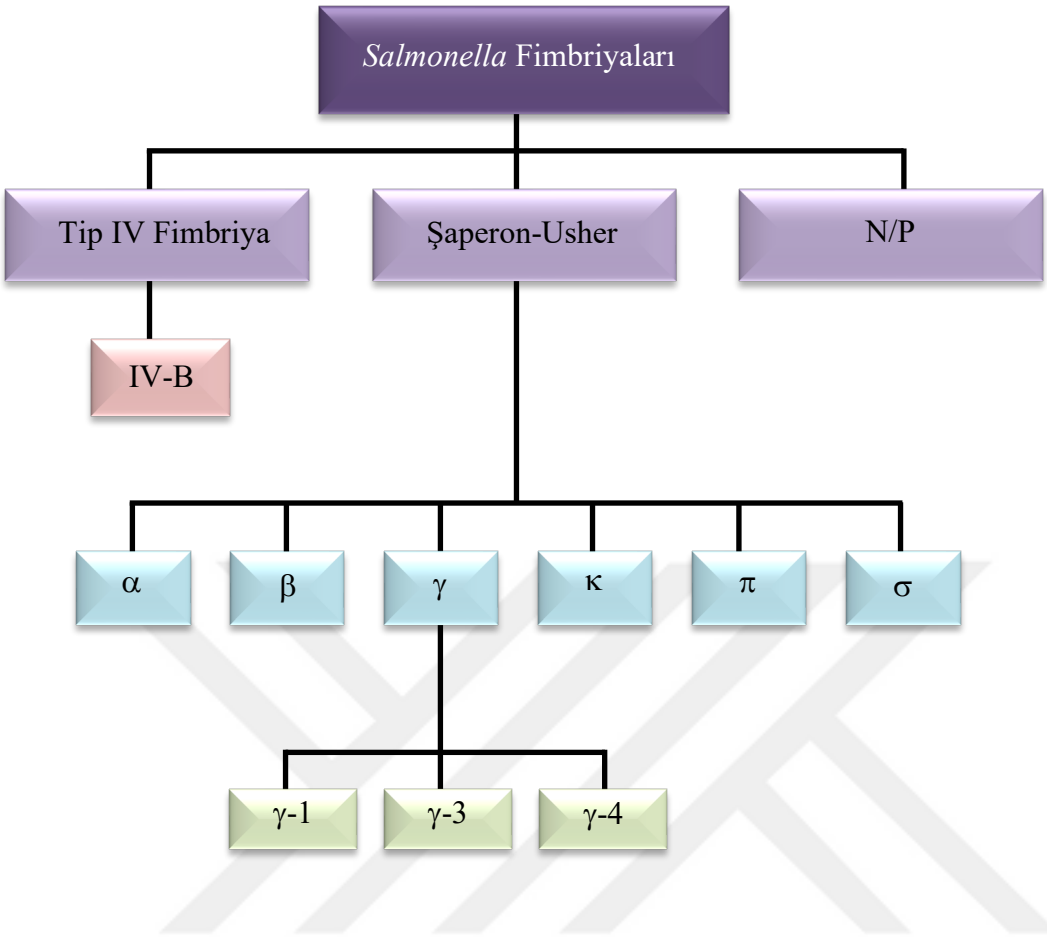
Bazı bakteriyel patojenler, çok sayıda adezif yapı ile donatılmıştır (Rehman vd. 2019). Hayvanlarda ve insanlarda, bakteri kaynaklı enfeksiyöz hastalıkların çoğunun patogenezinde, bakterilerin mukozal yüzeylere adezyonu en önemli rolü üstlenmektedir (Beachey 1981). Adezinler, ince bağırsağın kolonizasyonunda rol alırlar. Memeli konakçısının enfeksiyonu, *S.* Typhimurium hücrelerinin ince bağırsaktaki mukozal yüzeylere tutunması ile başlar ve hemen ardından epitel hücrelerinin invazyonu ile devam eder. *S.* Typhimurium'da bulunan *fim*, *lpf* ve *pef* fimbriyal operonlarının karakterizasyonu, fimbriyal adezinlerin bir enfeksiyonun ilk fazı esnasında birden fazla işlevi yerine getirdiğini göstermektedir. Adezinler aynı zamanda, *Salmonella* enfeksiyonuna karakteristik olan Peyer yamaları için doku tropizmine katkı sağlar. Adezinler, epitelyal hücrelere ilk temasa aracılık ederler. Bu olay, fimbriyal adezinlerin, invazyon ve inflamatuar yanıtın ortaya çıkmasında bir rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, fimbriyalar, *S.* Typhimurium için önemli virülans faktörleridir (Baumler vd. 1997).

Konakçı hücreye adezyon, bakteriyel patogenezde anahtar bir faktör olarak kabul edilir. Bakterilerin yüzeyinde bulunan özel protein yapıları ve konakçı hücre yüzeyindeki tamamlayıcı reseptörler genellikle bakterinin konak hücreye bağlanmasını kolaylaştırır. Bakteriyel yüzey protein bağlanma bölgesi (adezin), konak hücre yüzeyinde bulunan polihidroksile glikan ile bağlanması sonucunda tutunma gerçekleşir. Bazı durumlarda bakteriyel adezinlerin konakçı hücre yapısında bulunan glikozaminoglikanlara (GAG'ler)

bağlandığı da kanıtlanmıştır. Van der Waals güçleri ve hidrojen bağları adezif (tutunma) mekanizmada rol oynayan farklı bağlanma kuvvetleridir. Tutunmanın gerçekleştirildiği hücre membran reseptörlerinin, çoğunlukla glikolipid ve glikoproteinlerin oligosakkarid rezidülerinden oluştuğu saptanmıştır (Rehman vd. 2019).

Yukarıda özetlenen karakteristikleri nedeniyle fimbriyal yapılar, *Salmonella*'da patojen ilişkili moleküler örüntüler (PAMP) içerisinde sınıflandırılmaktadır (Rehman vd. 2019). Fimbriya, fimbrin adı verilen tek bir protein türünden oluşan polimerler olarak tanımlanmaktadır. Fimbriyal yapılar, genellikle 2-7 nm genişliğinde fimbrin filamentlerden oluşur (Collinson vd. 1991). Çok sayıda *S. enterica* serovaryetesine ait genomik analiz veriler esas alınarak, fimbriyal adezinleri kodlayan 15 operon tanımlanmıştır. Fimbriyalar, bakterinin konak hücreye bağlanmasındaki rollerinin yanı sıra, biyofilm oluşumunda da rol almaktadırlar (Ledeboer vd. 2006). Bunun yanında fimbriyaların, bakteriyofajlar için tutunma bölgeleri olarak da işlev görebildiği veya hücresel motiliteye yardımcı olabildiğine dair güçlü bilimsel kanıtlar da bulunmaktadır (White vd. 2001).

Fimbriyal yapılar evrimsel olarak; α, β, γ, κ, π, ve σ olmak üzere farklı kladelere ve alt kladelere ayrılmaktadır. *Salmonella* cinsi üyelerindeki fimbriyal yapıların detaylı bir şekilde incelenmesi sonucu, yukarıda anılan 6 farklı kladenin tümüne ait örnekler tanımlanmıştır. Örneğin; fimbriyal γ kladesi, γ1, γ3 ve γ4 olmak üzere 3 alt kladeye ayrılmaktadır. *lpf, fim* ve *sef* genleri γ1 ve γ3 alt kladelerine, *pef* geni κ kladesine ve *sdc* geni ise σ kladesine aittir. γ1 kladesi, yüksek oranda korunmuş oldukça büyük bir bölge ile (*fim*, *bcf* ve *sth*) karakterize edilmektedir. Ayrıca bu klade 22 fimbriyal gen kümesi içermektedir. En yüksek çeşitliliğe sahip klade, γ4 kladesi olarak belirlenmiştir. *sdc* geni, *S. enterica* IIIa alt türlerinde bulunan σ kladesini temsil eden tek fimbriyal gen kümesidir. Yedi tane fimbriyal gen kümesi; curli fimbriya (ince agregatif fimbriya ya da kıvrımlı fimbriya olarak da adlandırılmaktadır) ve şaperon-usher fimbriya (*std, stb, stc, sth, bcf* ve *fim*), evrimsel süreçte yüksek düzeyde korunmuş fimbriyalar olarak tanımlanmaktadır. *Fim* fimbriyanın, soğuk kanlı hayvanlarda enfeksiyona neden olan *S. bongori* hariç diğer tüm *S. enterica* üyelerinde bulunduğu saptanmıştır (Şekil 2.1) (Rehman vd. 2019).

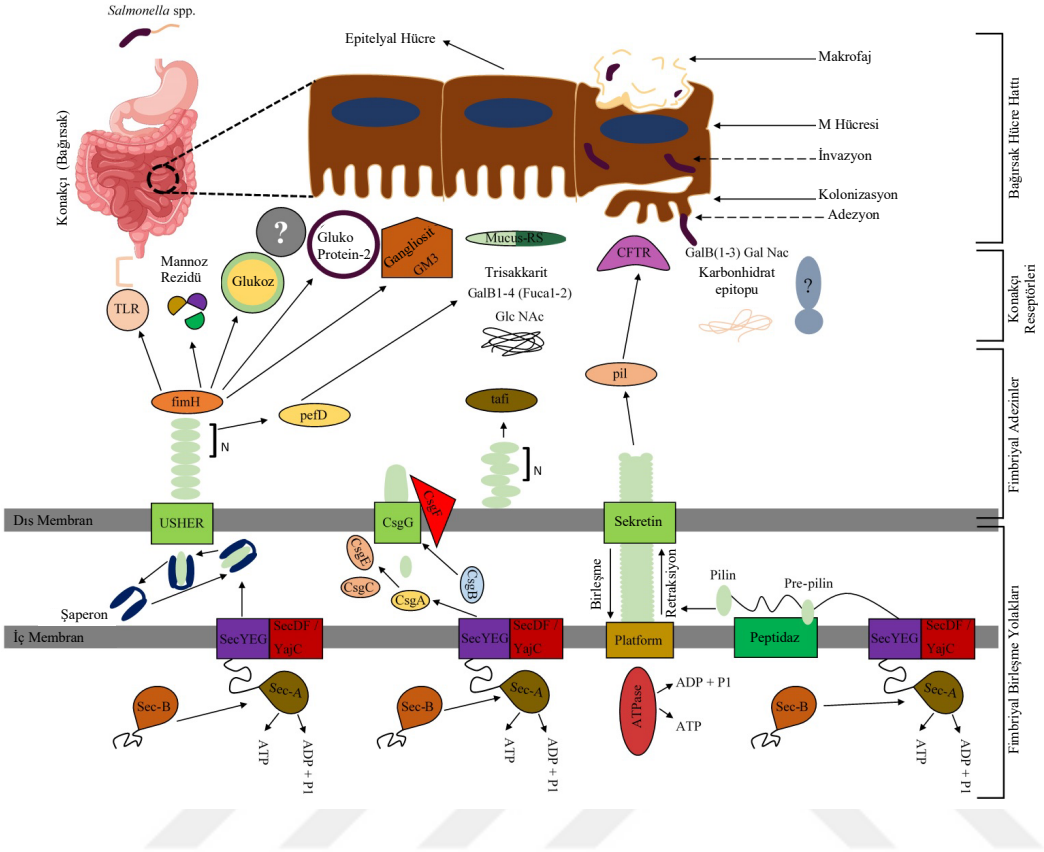


Şekil 2.1 *Salmonella* fimbriyalarının farklı tipleri (Rehman vd. 2019)

Daha önce de ifade edildiği gibi, farklı konakçı hücre yüzeylerine adezyon (tutunma) yeteneği, *S. enterica* enfeksiyonunun patogenezi için zorunlu bir fenotipik özelliği ifade etmektedir. Bu tutunma çok sayıda farklı adezinin katıldığı karmaşık bir süreçte gerçekleşmektedir. *S. enterica*'da konakçı tutunmasında fimbriyal adezinlerin yanı sıra; ShdA, MisL ve SadA gibi ototransporter adezinler ve tip 1 sekresyon sistemi tarafından salgılanan büyük tekrarlı adezinler olan SiiE ve BapA adezinlerinin de önemli roller üstlendiği belirlenmiştir (Wagner ve Hensel 2011). Ototransporter adezinler özellikle bağımsız genler tarafından kodlanırken, *Salmonella* fimbriyal gen kümelerinin (FGC'ler) genellikle 4-15 arası genden oluştuğu saptanmıştır. Bu genler, hücreye bağlı olarak perifere salgılanan fimbriyal yapılar için gerekli olan yapısal monomerleri, birleştirme elemanlarını ve regülatör proteinleri kodlamaktadır (Rehman vd. 2019).

Salmonella fimbriyaları konak hücre reseptör yapılarında bulunan proteinlerle etkileşime girerek patojenin konak hücre ile ilk etkileşimini ve bağırsak sistemlerinde kolonizasyonunu gerçekleştiren temel yapılardır. Bu durumda fimbriyaların akut ve kronik salmonellozun da vazgeçilmez patojen ilişkili moleküler örüntüleri olduğu ortaya çıkmaktadır. Konak hücreleri genellikle, hücre dışı proteinlerin ve polisakkaritlerin karmaşık bir ağ oluşturduğu bir hücre dışı açıklığa sahiptir. Fimbriyal yapılar, konak hücrelere önemli yapısal ve fonksiyonel özellikler kazandıran ve aynı zamanda adezif bir karaktere sahip olan bu hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerinin salgılanmasını teşvik etmek için stromal fibroblastları aktive eder. Hücre dışı matriksin polisakkarit kısmını, dermatan sülfat ve hiyalüronik asit gibi glikozaminoglikanlar (GAG'lar) oluşturur ve proteoglikanları meydana getirmek üzere proteinlerle kovalent olarak bağlanır. ECM'nin diğer protein bileşenleri; laminin, elastin, kollajen, fibronektin ve benzeri bağlanma proteinleri olarak sayılabilir. *Salmonella* fimbriyal adezinleri, uygun niş içine girmek için yapılarında hücre dışı matriks bileşenlerini barındırır. Ayrıca *Salmonella* cinsi üyesi serovaryeteler, eritrositlerde bulunan kan grubu antijenlerine de tutunabilir. Eritrositlerde bulunan glikosfingolipidler, sakkarit zincirlerinde karakteristik terminal uçlar bulundurur. Fakat kan grubu antijenleri dermal epitelde ve mukozal yüzeylerde de bulunur (Rehman vd. 2019).

Salmonella fimbriyaları alt ünitelerinin bir araya getirilmesi stratejilerinde farklılık göstermektedir. Ancak farklı alt ünite birleştirme stratejilerine sahip fimbriyalarda, adezif mekanizmanın ortak olduğu saptanmıştır. Olgun adezif fimbriyaların uç kısımlarında spesifik fimbriyal adezinler yer almaktadır. Bu *Salmonella* fimbriyal adezinleri, konakçı hücrelerin farklılık gösteren hücre dışı matrikslerine bağlanma afinitesine sahiptir (Şekil 2.2) (Rehman vd. 2019).



Şekil 2.2 *Salmonella* fimbriya'nın adezif mekanizması (Rehman vd. 2019)

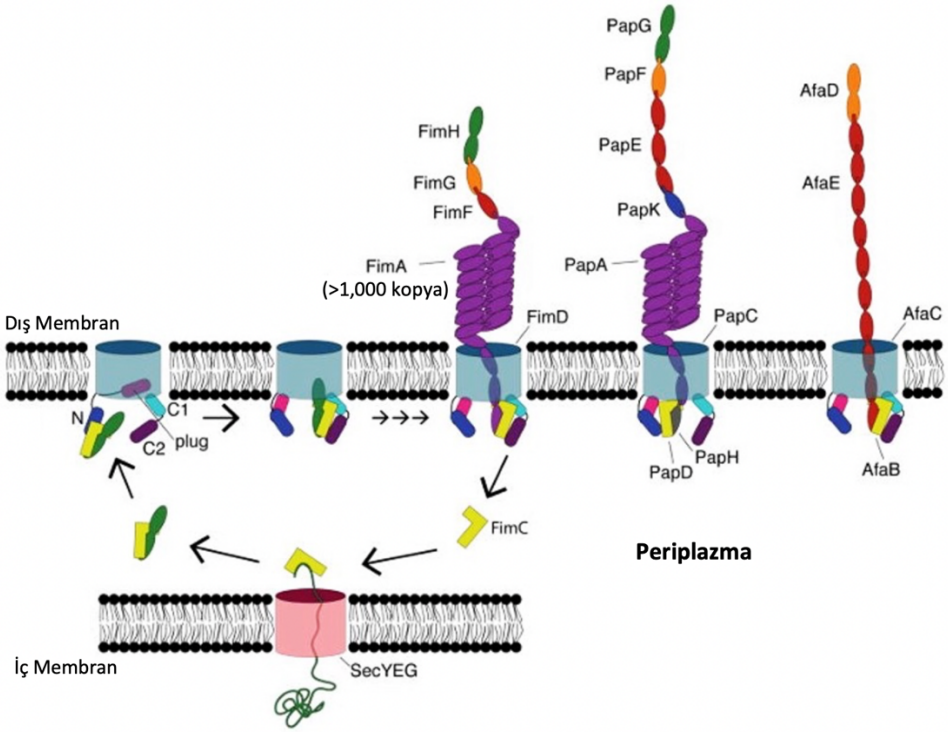
Salmonella fimbriyaları, üç tip montaj yolağıyla birleşir. Bunlar; Şaperon-Usher yolağı, Nucleation–Precipitation yolağı ve Tip IV fimbriya yolağıdır. Bu montaj yolakları birden fazla fimbriya tipinin oluşmasına neden olmaktadır (Rehman vd. 2019).

2.2.1 Şaperon-Usher Yolağı

Salmonella genomunda en yaygın olarak bulunan fimbriya tipi, Şaperon-Usher fimbriyadır (Rehman vd. 2019). Bu yolakta fimbriyal alt üniteler, transport edilirken kesilen N-terminal sekresyon sekansı aracılığıyla genel sekresyon yolağı tarafından periplazmaya yönlendirilirler. Periplazmada, spesifik şaperonlar ile oluşan interaksiyon, proteazların yönettiği hızlı parçalanmayı ve fimbriyal alt ünitelerin erken birleşimini

engellemektedir. Şaperonlar ayrıca fimbriyal alt üniteleri, fimbriyaların birleşimini koordine eden integral hücre dışı membran proteinlerinden oluşan bir USHER'a yönlendirmektedir. Olgun (Tamamlanmış) fimbriyaların ucunda, konakçı reseptörü ile interaksiyonda etkinlik gösteren ve reseptör-bağlanma bölgesini içeren distal alt üniteler bulunmaktadır (Wagner ve Hensel 2011).

Fimbriyal adezinlerin esas fonksiyonu, konakçı hücre üzerindeki spesifik bir reseptöre bağlanmayı sağlamaktır. Bu reseptörlerin, belirli bir zar proteini, şeker rezidüleri ya da lipid yapıları olabileceği belirlenmiştir. Diğer yandan, bugüne kadar *Salmonella*'da tanımlanan tüm adezinlerinin, lektin benzeri fonksiyon içerdiği saptanmıştır. Örneğin; *fim* operonu tarafından kodlanan FimH fimbriyal adezininin spesifik hedef olarak mannoz rezidülerini kullandığı tanımlanmıştır. Fim, *Salmonella*'da en yaygın olarak bulunan ve laboratuvar ortamında statik kültürlerde sentezlenen tek fimbriyal adezindir (Wagner ve Hensel 2011). Fim fimbriyaları, Tip 1 fimbriya ailesinin bir üyesidir. Tip 1 fimbriyalar, mannoza-duyarlı hemaglütinasyon ve konakçı hücrelere mannoza-duyarlı bağlanma ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.3) (Duguid 1959).



Şekil 2.3 Şaperon-Usher yolağı tarafından gerçekleştirilen fimbriya biyogenezinin modellenmesi (Werneburg ve Thanassi 2018)

Şaperon-Usher fimbriya biyogenezi, sitoplazmada üretilen alt ünitelerin Genel Sekresyon Yolu kullanılarak (GSP), iç zardan dışa doğru aktarılmasıyla başlar. SecYEG kompleksi ve SecDF/YajC proteinleri, GSP yolağında yaygın olarak kullanılmaktadır. SecA yardımcı faktörünün üretimi gerçekleştikten sonra, SecB tarafından SecA'ya taşınan prepilini hedefler. Prepilin, çok çeşitli bakteri türleri tarafından salgılanmaktadır. Tip IV fimbriya oluşumu, toksinlerin ve diğer enzimlerin salgılaması, gen transferi ve biyofilm oluşumu dahil olmak üzere çeşitli işlevlerde rol almaktadır (LaPointe ve Taylor 2000). Burada, SecA tarafından katalize edilen ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji, SecYEG translokasyonunda kullanılmaktadır. Proton hareket gücünün (PMF) eşlik ettiği ATP kullanımının tetiklenmesi ile prepilin periplazmaya taşınır. Translokasyon sırasında, membran üzerinde N-terminal sinyal peptitlerinin parçalanması, periplazmada bulunan peptidaz enzimi sayesinde gerçekleştirilir. Proteazlar aracılığı hızlı bir şekilde gerçekleştirilen parçalanma ve periplazmada fimbriyal alt ünitelerin erken birleşmesi, spesifik şaperonlar arasındaki etkileşimler sayesinde önlenir. Bu süreçte fimbriyal alt üniteler, yüzeydeki fimbriyal birleşmeyi koordine eden dış membran integral

proteinlerinden oluşan öncüye yönlendirilir. Bu yönlendirmeyi şaperonlar gerçekleştirmektedir. Olgun fimbriyaların verimli bir şekilde bir araya getirilmesi, şaperon kapağının açılmasıyla gerçekleşir. Şaperon-Usher (CU) fimbriyanın, tamamen olgunluğa ulaşmış liflerinin morfolojisi ve boyutları temel olarak iki esasa bağlıdır. Bunlar, alt üniteler ve bunların bileşimleri arasındaki etkileşimlerdir. Şaperon-Usher fimbriyal alt ünitelerinin geniş bir farklılık yelpazesi içermesi, *Salmonella*'nın virülanslığına katkıda bulunan önemli bir özellik olarak tanımlanmaktadır (Rehman vd. 2019).

2.2.2 İnce Agregatif Fimbriya: Nucleation-Precipitation (N/P, birleşme çekirdeği oluşturarak çökme) Yolağı

Fimbriyal adezinlerin bir diğer alt grubu olan ince agregatif fimbriya (Tafi, Curli fimbriya veya kıvrımlı fimbriya) belirgin bir morfolojiye sahiptir. Bu yapıları nedeniyle ‘’nucleation-precipitation yolağı’’ adı verilen özgün bir yolakta birleştirilirler. İnce agregatif fimbriya, çeşitli yüzeylere adezyonda, biyofilm oluşumunda ve *Salmonella*’nın otoagregasyonunda rol oynamaktadır (Collinson vd. 1993).

Salmonella’da, ince agregatif fimbriya, *agfDEFG* ve *agfBA* olarak adlandırılan iki operon tarafından kodlanır. AgfD proteini transkripsiyonel regülatör, AgfBA proteini fimbriyal alt ünite ve AgfEFG proteini ise fimbriyanın birleşmesinin yönetiminden sorumlu proteinler olarak tanımlanmıştır (Barnhart ve Chapman 2006, Wagner ve Hensel 2011, Rehman vd. 2019). İnce agregatif fimbriyanın *E. coli* bakterisindeki homoloğu curli’dir. Curli ise *csgDEFG* operonu tarafından kodlanmaktadır (Römling vd. 1998). AgfA *S.* Typhimurium’da, CsgA ise *E. coli*’de ana agregatif alt ünitedir. Bu iki protein birbirine çok benzeyen polipeptit sekansına ve benzer fonksiyonlara sahiptir (Collinson vd. 1996, Hammar vd. 1996). İnce agregatif fimbriya ve curli düşük ozmolarite, düşük sıcaklık ve besin sınırlandırılmasına cevap olarak eksprese edilmekte ve olgunlaştırılmaktadır. Tafi ve curli fimbriyaların, fibronektin veya laminin gibi farklı hücre dışı matriks proteinleri ile etkileşime girdiği belirlenmiştir (Wagner ve Hensel 2011).

İnce agregatif fimbriya ve curli alt üniteleri, nucleation-precipitation yolağı yoluyla birleştirilir. *csgBA* operonu tarafından kodlanan alt üniteler, genel sekresyon yolağı aracılığıyla periplazma içerisine taşınırlar. Bu olay gerçekleşirken CsgD, *csgBA*'nın transkripsiyonunu regüle eder. CsgG bir dış membran lipoproteinidir. CsgG'nin; CsgE proteininin dış membran ile etkileşimlerini yönlendirmesi yanında, CsgA ve CsgB'nin sekresyonları için de önemli bir işlevselliğe sahip olduğu da belirlenmiştir (Wagner ve Hensel 2011). Fimbriyanın birleşmesi için, bir nükleatör olan CsgB polimerleri, CsgA'yı bakteriyel hücrelerden dış ortama salgılarlar. Tek bir hücreden salgılanan CsgA, komşu hücrenin CsgB'si üzerinde polimerize edilebilir. Bu durum, interbakteriyel komplementasyon için bir kanıt niteliğindedir. *Salmonella*'da, interbakteriyel komplementasyonun, sadece ortamda LPS bulunmadığında meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu bulgu sonucunda ise LPS'nin CsgA'nın difüzyonu için bir engel teşkil ettiği sonucuna varılmıştır (White vd. 2003, Wagner ve Hensel 2011).

Nucleation-precipitation yolağı ve Şaperon-Usher yolağı arasında çok önemli bir fark vardır. Şaperon-Usher yolağında fimbriyal alt ünitelerin polimerizasyonu dış membranın periplazmik bölgesinde meydana gelirken, Curli ve ince agregatif fimriyalarının kullandığı yolak olan nucleation-precipitation yolağında fimbriyal alt üniteler bakteri hücre zarfının dışında polimerize edilir (Wagner ve Hensel 2011).

2.2.3 Tip IV Fimbriya Yolağı

Salmonella'da Tip IV fimbriyanın birleşmesi için gerekli 11 gen tanımlanmıştır. Bu genlerin tamamı *Salmonella* patojenite adası 7'de (SPI-7) lokalize *pil* operonunda kodlanmaktadır. Tip IV fimbriya *Salmonella* serovarları arasında en nadir olarak bulundurulan fimbriya tipi olarak belirlenmiştir (Rehman vd. 2019).

Tip IV fimbriya tekrarlanan alt ünitelerin birleştirilmesi sonucu oluşturulan ve genellikle 1-5 µm uzunluğunda olan bir fimbriyadır. Basit yapısal özelliklerine rağmen, bu fimbriyanın birleşmesi için karmaşık bir mekanizma kullanılmaktadır. Bu mekanizma ilk olarak, liflerin sabitlenmesini kolaylaştıran ve lif birleşmesi için gerekli enerjiyi sağlayan birçok farklı proteinden meydana gelen bir düzeneğin oluşmasıyla başlar. Fimbriyanın alt

ünitelerinin periplazmaya taşınması genel sekresyon yolağı aracılığıyla gerçekleşir ve daha sonra bunlar iç membrana tutunurlar. Bu durumdaki yapılar "intact" (işlenmemiş, ham) fimbriya olarak adlandırılır ve devam eden sekresyon sürecinde dış membrana iletilirler. Tip 2 sekresyon sistemi (T2SS) ile benzer bir düzeneğe ve yapısal özelliklere sahip olan Tip IV fimbriya, çoğunlukla T2SS ile karşılaştırılır. Tip IV fimbriya, birleşme ve fimbriyal oluşumunda yer alan karmaşık mekanizmasında kullanılmak üzere ATP'ye ihtiyaç duyar. Tip IV fimbriya birleşmesinin iki yönlü (bağlanma-çözülme) bir süreç olduğu belirlenmiştir (Rehman vd. 2019).

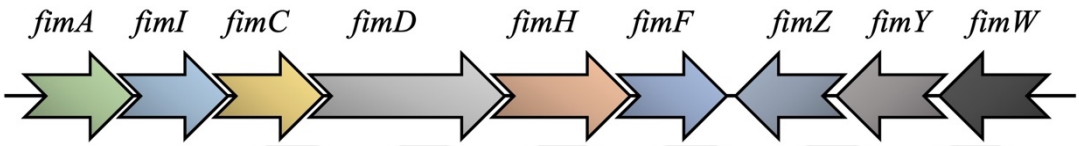
FimH fimbriyaları, konak hücrenin reseptörlerine bağlanabilmek için bünyesinde bulunan tüm fimbriyal uç adezinlerini kullanır. FimH, konak hücrenin spesifik reseptörleri dışındaki Tip IV fimbriya reseptörlerine bağlanmak için fimbriya uç adezinlerinin yanı sıra disülfit bağlı bir loop (ilmek) bölgesi de kullanmaktadır (Rehman vd. 2019).

2.3 Tip 1 Fimbriya

Tip 1 fimbriyalar, karakteristik bir şekilde 1 μm boyunda ve 6 nm çapında (Korhonen vd. 1980, Wagner ve Hensel 2011) fibrillerden meydana gelmektedir. Tip 1 fimbriyalar, enterositlere özgü adezinlerdir (Althouse vd. 2003). *S*. Typhimurium tip 1 fimbriyalarının tanımlayıcı bir diğer özelliği, mannoz-duyarlı hemaglutinasyon yetenekleridir. Bu fimbriya tipinin Şaperon-Usher yolağı ile birleştirildiği saptanmıştır. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'un tip 1 fimbriyalarının, ökaryotik hücre yüzeyleri üzerinde mannoz içeren glikokonjugatlara bağlanmaya aracılık etmek suretiyle patojen-konakçı ilişkisini yönlendirdiği, biyokimyasal ve immünolojik testlerle kanıtlanmıştır (Boddicker vd. 2002).

S. Typhimurium'daki tip 1 fimbriyal proteinler, *fim* gen kümesi (*fimAICDHFZYW*) tarafından kodlanmaktadır. *fimAICDHF* tek bir transkripsiyonel birim olarak eksprese edilir. *fim* gen kümesi, altı yapısal gen, üç regülatör gen ve nadir arginin kodonlarına (AGA ve AGG) özgü bir tRNA'dan oluşur. *fimA, fimI, fimC, fimD, fimH* ve *fimF* yapısal genlerinin tümü, P_{fimA} promotöründen tek bir transkript halinde eksprese edilir. *fimZ, fimY*

ve *fimW* regülatörlerinin tümü bağımsız promotörlerden eksprese edilir. *fimU* tarafından kodlanan tRNA, *fim* gen kümesinin bir ucunda bulunur ve tümü nadir arginin kodonları taşıyan regülatör genlerin etkili translasyonu için gereklidir (Saini vd. 2009). Fimbriyanın yapısal komponentleri, FimA (ana alt ünite), FimI ve FimH (adezin) ve FimF (adaptör)'den oluşur. *S.* Typhimurium fimbriyal gen kümesi, yapısal ve birleştirme komponentlerini kodlayan (*fimAICDHF*) altı gen içeren bir operon ve *fimZ*, *fimY* ve *fimW* olmak üzere, üç adet bağımsız transkribe edilen regülatör genden oluşur. Fimbriyal uzantılar ana fimbriyal alt ünitesi olan FimA'nın çoklu kopyalarından meydana gelmektedir. FimC ve FimD, hücre yüzeyinde bulunan, birleştirme fimbriyaları olarak işlev gören, şaperon ve usher proteinleridir. Bu proteinler tarafından son işleme (birleştirme) gerçekleştirilir. Fimbriyaların adezyonu, fimbriyanın ucunda bulunan fimbriyal protein FimH ile gerçekleştirilir (Şekil 2.4) (Zeiner vd. 2012a).



Şekil 2.4 *S. enterica* serovar Typhimurium'un *fim* gen kümesinin şeması
(Boyd ve Hartl 1999 esinlenilerek çizilmiştir)

Tip 1 fimbriya ailesine mensup, *fim* gen kümesine bağlı olan FimA, fimbriyal şaftı oluşturmak için polimerize edilen büyük yapısal alt üniteyi temsil eder (Boddicker vd. 2002). Tip 1 fimbriyalar, mannoz içeren konakçı glikoprotein reseptörlerini tanıyıp, bağlanmaya aracılık edecek bir bağlanma bölgesi içeren ve bir uç adezin proteini olan FimH ile ilişkilidirler (Amano vd. 2010). FimH, konak hücrelere bağlanmadan sorumludur. FimH polipeptidi, tip 1 fimbriyaların adezin molekülü olarak kabul edilir ve fimbriyalara bağlanma özgüllüğü kazandırır. Bu polipeptidi üretemeyen mutantların adezyon yeteneğinden yoksun olduğu kanıtlanmıştır (Hancox vd. 1997, Boddicker vd. 2002, Wagner ve Hensel 2011). *E. coli*'de bulunan FimH, epitelyal hücrelere bağlanmayı tercih ederken, *Salmonella*'da bulunan FimH'nin ise enterositlere özgüllük gösterdiği saptanmıştır (Thankavel vd. 1999). Burada FimH, lektin benzeri fonksiyon gösterir. Bunun yanı sıra ise "M" hücrelerinin üzerinde eksprese edilen FimH'nin, glikoprotein-2'ye bağlandığı varsayılmaktadır (Hase vd. 2009). FimH, *S.* Typhimurium'da, düşük adezif ve yüksek adezif olmak üzere iki farklı gruba ayrılır. FimH'nin insan epitelyal

hücrelerine olan afinitesi, yüksek adezif formunda çok daha yüksektir (Boddicker vd. 2002). *S.* Typhimurium'da bulunan FimF ile *S.* Enteritidis'de bulunan FimF'nin düşük adezif varyantlarının aynı karakteristiklere sahip olduğu belirlenmiştir (Kisiela vd. 2006).

Tip 1 fimbriyalar, hücre yüzeylerinde bulunan mannoz benzeri reseptörlere bağlanarak *Salmonella*'ya adezif özellik kazandırmaktadır (Tavendale vd. 1983). *Salmonella* fimbriyaları, adezyonu başlatmak için konak hücrelerin reseptörlerine bağlanırlar. Bu zamana kadar Toll benzeri reseptörler gibi birçok reseptör tanımlanmasına rağmen *Salmonella* fimbriyalarının adezif mekanizmalarına dahil olabilecek reseptörlerin tamamı tanımlanmış değildir (Rehman vd. 2019).

Tip 1 fimbriya adezinleri, hücre yüzeyindeki α-D-mannopiranosil reseptörlerine spesifik olarak bağlandığına dair güçlü kanıtlar mevcuttur (Leusch vd. 1991). Bu mekanizmada, serbest mannoz moleküllerinin de reseptör olarak işlev görmesi nedeniyle adezinin konakçı spesifik bağlanmasını önlediği de belirlenmiştir. Ancak, serbest mannoz moleküllerine tutunma kolayca tersine çevirebilir ve yıkandıklarında bakteriler adezifliklerini geri kazanır. Tip 1 fimbriya tanımı bu nedenle morfolojilerine, hemaglutinasyona, adezif özelliklerinin karakteristik geniş spektrumuna ve D-mannoz duyarlılığına dayandırılmıştır. Ancak bu özellikleri esas alınarak tanımlanan fimbriyalar, tüm farklı bakterilerde aynı değildir. Örneğin; *E. coli*'nin tip 1 fimbriyaları ile *Salmonella*'nın tip 1 fimbriyaları arasında antijen paylaşımı bulunmamaktadır. Farklı *E. coli* suşları arasında da tip 1 fimbriya antijenlerinde önemli farklılıklar belirlenmiştir (Tavendale vd. 1983, Tavendale vd. 1985).

Salmonella bakterisi tarafından üretilen çeşitli fimbriyalar arasında, sadece *S.* Typhimurium'un tip 1 fimbriyasının, patogenezdeki rolü uzun süreli araştırmalar sonucunda kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır (Collinson vd. 1993).

2.4 Tip 1 Fimbriya Ekspresyonunun Regülasyonu

Tip 1 fimbriya ekspresyonu, çevresel koşullara dayalı olarak faz değişimine uğrar. Faz değişimi, ''açık'' ve ''kapalı'' faz olarak ikiye ayrılır. Tip 1 fimbriya ekspresyonunda;

operonun transkripsiyonunun bloke edildiği faz "kapalı faz", *fim* operon mRNA'sının ekspresyonu ile sonuçlanan faz ise "açık faz" olarak adlandırılmaktadır. Faz varyasyonunda açık fazdan kapalı faza geçiş sıklığı, tam tersi yönündeki geçişten çok daha fazladır. Fimbriya ekspresyonunun faz değişimi (varyasyonu) yeteneği, bakteri yüzeyinde bu yapıların varlığı yahut yokluğunu ve dolayısı ile de bakteriyel enfeksiyonun çeşitli aşamalarını etkiler. Bu faz varyasyonu *Salmonella* patogenezinin alterasyonunda kritik bir role sahiptir.

Farklı bakteri türleri arasındaki faz değişim mekanizmaları çeşitlilik gösterir. *Enterobacteriaceae* familyasındaki faz değişim mekanizmaları sadece *E. coli*'de tam anlamıyla tanımlanmıştır. *E. coli* ve *Salmonella*'daki tip 1 fimbriyalar, morfolojik ve fonksiyonel benzerliklerine rağmen serolojik ve evrimsel olarak birbirlerinden alakasızdırlar. Bu nedenle, *Salmonella*'daki *fim* operonunun faz değişiminin regülatör mekanizmaları *E. coli*'dekinden farklıdır (Kolenda vd. 2019).

2.4.1 Direkt regülasyon

Salmonella'da her biri kendi promotörü tarafından eksprese edilen, üç ana regülatör protein bulunur. Bunlar FimZ, FimY ve FimW proteinleridir. Bu proteinler, *fimA* promotörünün regülasyonu yoluyla *fim* operon ekspresyonunu kontrol eder. FimZ ve FimY proteinlerinin her ikisi de tip 1 fimbriya ekspresyonunun pozitif regülasyonu için gereklidir. Tip 1 fimbriya ekspresyonunda, FimZ dominant aktivatör ve FimW ise negatif regülatör olarak görev yapar. Bu proteinlere ek olarak, *fimY* ve *fimW* genleri arasında lokalize olmuş, *stm0551* olarak adlandırılan bir açık okuma çerçevesi tarafından kodlandığı varsayılan bir fosfodiesterazın, *S.* Typhimurium'da tip 1 fimbriya ekspresyonunu aşağı yönde regüle (ekspresyonunu düşürdüğü) ettiği bulunmuştur (Wang vd. 2012, Kolenda vd. 2019). *Fim* gen kümesinin sonunda, *fimU* geni tarafından kodlanan bir $tRNA^{Arg}$ bulunmaktadır.

FimZ proteini, diğer klasik aktivatörlere benzer şekilde, *fimA* transkripsiyon başlatma bölgesinin yukarı akış bölgesini (-47 ila -98 nükleotid arasında) bağlayabilen bir transkripsiyon aktivatörü olarak tanımlanmıştır (Yeh vd. 2002). Bu protein, iki bileşenli

regülatör sistemlerin yanıt düzenleyicileri ile ilişkili bir DNA bağlayıcı protein ailesi ile yüksek homolojiye sahip bulunmuştur. FimZ proteininin başlangıç aktivasyonu, henüz tanımlanması yapılmamış bir kinazın aracılık ettiği aspartat-56'nın fosforilasyonu aracılığıyla sürdürülebilir. FimZ kendi ekspresyonunu regüle edebilmesine rağmen (otoregülatör), kendi regülasyon bölgesine bağlanmadığı saptanmıştır. Bu nedenle regülasyon mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır (Kolenda vd. 2019).

FimZ proteini tarafından *fimA* promotörünün aktivasyonu için ikinci bir regülatöre ihtiyaç vardır. Bu ikinci regülatör FimY proteinidir. FimY, regülatör yolağında *fim* gen kümesinde *fimZ*'den önce konumlanmıştır. Ancak, *fimY, fimZ* ya da *fimW*'nin her ikisiyle de doğrudan bir etkileşimi yoktur. FimY ve FimZ proteinleri birbirlerinin promotör bölgelerini çapraz bir şekilde aktive eder ve daha sonra her iki proteinin birikimi yoluyla tip 1 fimbriya ekspresyonu güçlü bir şekilde uyarılır. FimY, *fimW*'nin ekspresyonunu indükleyebilir, bu da *fimY* promotörünün baskılanmasıyla sonuçlanır (Saini vd. 2009, Zeiner vd. 2012a, Kolenda vd. 2019). *S.* Typhimurium genomunda kodlanan FimY proteini bir DNA bağlayıcı proteindir ve bu protein *fimZ* promotörü içindeki bir bölgeye bağlanır (Wang vd. 2014).

Tip 1 fimbriya ekspresyonunun üçüncü bir ana regülatör proteini ise FimW'dur. FimW, T1F ekspresyonunda bir repressör olarak görev yapar. *Salmonella* fimbriya oluşumu olmadığı, ya da çok az olduğu koşullarda, FimW, yüksek oranda ekprese edilir. Buna ilave olarak FimW, kendi ekspresyonunu otoregüle eder. FimY'de olduğu gibi, *fimW* ve *fimA* promotör bölgesi arasında direkt bir etkileşim yoktur. FimW, FimZ'nin *fimA* promotörüne bağlanmasını önler ve böylece tip 1 fimbriya aktivasyonunda modülatör bir rol oynar. FimZ ve FimY'nin ekspresyonu, FimW tarafından negatif olarak kontrol edilir. Çünkü FimY, *fimW* promotörünü aktive eder ve bu nedenle, bir negatif geri besleme döngüsü başlatır.

Feutrier ve arkadaşları (1986), tip 1 fimbriya ekspresyonunun bir Tn*10* elementi tarafından regüle edildiğini saptamıştır. Tn*10* daha sonra Clouthier ve arkadaşları (1998) tarafından, *fim* regülatör genlerinin translasyonu üzerine etkisi olan *fimU* geninin ürününü, $tRNA^{Arg}$ olarak tanımlanmıştır. Tn*10*, *fimY* mRNA'nın etkili translasyonu için kritik rol oynar ve $tRNA^{Arg}$ tarafından tanınan birkaç nadir AGA ve AGG arjinin

kodonlarını içerir. Tip 1 fimbriyada beş tane nadir arjinin AGA kodonu vardır. Bunlardan üç tanesi *fimY* geninde ve iki tanesi *fimW* geninde bulunur. *fimU* eksikliği durumda FimY ekspresyonu etkilenir (Kolenda vd. 2019).

2.4.2 Global regülasyon

Salmonella tip 1 fimbriya ekspresyonunun regülasyonu için bir diğer mekanizma ise global regülasyon'dur. Tip 1 fimbriyalar metabolizma, strese verilen tepkiler ya da virülans faktörlerinin üretimi ile ilgili genlerin global regülasyonunda yer alan transkripsiyon faktörleri tarafından regüle edilir. *lrp, sirA, iprA, stbC, yqiC, invS, arcZ/hfq* ve *adhE* genlerinin protein ürünleri tip 1 fimbriya regülasyonunda yer alır.

Lösine duyarlı regülatör protein (Lrp), birçok fimbriyal geninin regülasyonunda rol alır ve *E. coli fim* operonunu indüklediği bilinen 18.8 kDa'lık bir DNA bağlayıcı proteindir. Lrp, *fimZ* promotörüne bağlanan gram-negatif bakterilerin global bir repressörü olan histon benzeri nükleoid yapılandırıcı (N-HS) proteinin yer değiştirmesiyle *fimZ* ekspresyonunu doğrudan etkiler. Lrp, *fimA* promotörüne doğrudan bağlandığında tip 1 fimbriya ekspresyonu baskılanır. Bu aktivasyon ya da baskılama, hücresel Lrp seviyelerine bağlıdır. Aşırı ya da yetersiz Lrp seviyeleri, tip 1 fimbriya ekspresyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır. Lrp ekspresyonu, çevresel besin koşullarıyla ilişkilidir. Bu nedenle, Lrp seviyelerinin çevresel besin koşullarına verdiği tepkiye göre tip 1 fimbriya ekspresyonun akıbeti belirlenir (Kolenda vd. 2019).

Salmonella'da biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden biri olan *sirA*, tip 1 fimbriya ekspresyonunun pozitif regülasyonunda da görev alır. SirA proteininin, *fimA* promotörüne doğrudan bağlanabilme özelliği vardır ve bu protein *fim* operonunun transkripsiyonunun başlatılması için gereklidir. Bu nedenle de tip 1 fimbriyanın ekspresyonunu arttırdığı yönünde varsayımlar bulunmaktadır (Teplitski vd. 2006, Herman vd. 2016, Kolenda vd. 2019).

Salmonella tarafından eksprese edilen bazı genlerin tip 1 fimbriya ekspresyonunu baskıladığı belirlenmiştir. Bu genlerden *yqiC* veya *arcZ*'nin delesyonu sonucunda *S.*

Typhimurium'da tip 1 fimbriya ekspresyonunun aktive edildiği saptanmıştır. Bu genlere ilave olarak, biyofilm oluşumunda yer alan *arcZ* geninin delesyon mutantında, tip 1 fimbriya ekspresyonunun yukarı yönlü regülasyonu (pozitif regülasyonu) teşvik edildiği saptanmıştır. Bu gen, tip 1 fimbriya ve curli fimbriya ekspresyonu arasındaki geçişe aracılık ederek, tip 1 fimbriya ekspresyonunda rol oynamaktadır. Bir Stb fimbriya öncüsü olan *stbC* geninin delesyon mutantında ise, yüksek *fimZ* ve düşük *fimW* ekspresyonu tanımlanmıştır (Kolenda vd. 2019).

Tip 1 fimbriya ekspresyonunun etkilendiği diğer bir faktör ise, karbonhidrat metabolizmasında yer alan AdhE (fermentatif alkol dehidrogenaz) gibi proteinlerdir. AdhE'nin aşırı ekspresyonu, tip 1 fimbriya ekspresyonunu inhibe eder. Ancak *adhE* geninin delesyon mutantında tip 1 fimbriya ekspresyonunun uyarıldığı saptanmıştır (Kolenda vd. 2019).

2.4.3 Tip 1 fimbriya üretimi ve virülans arasındaki ilişki

Aktive edilmiş *fim* operonu, CsrA aktivitesini düzenleyerek plazmid kodlu fimbriyaların (Pef) ekspresyonunu önler. Polisistronik *fimAICDHF* mRNA'nın global bir transkripsiyon sonrası regülatör bir protein olan CsrA'ya bağlanması, CsrA aktivitesini azaltır ve böylece Pef ekspresyonu üzerindeki pozitif etkisini engeller (Kolenda vd. 2019).

Fim operonunun direkt regülasyonunda görev alan FimZ, aynı zamanda motilitenin (hareketliliğin) regülasyonunda da rol alır. *Salmonella*'da FimZ proteini aşırı eksprese olduğu takdirde, motilitede ve invazyonda azalma meydana gelir. İnvazyon fenotipi, *Salmonella* Patojenite Adası 1 (SPI-1) Tip 3 sekresyon sisteminin (T3SS) aktivasyonuna bağlıdır. SPI-1 T3SS aktivasyonu, iki anahtar aktivatör olan *hilA* ve *invF* geninin yanı sıra, çeşitli pozitif ve negatif regülatör genler aracılığı ile sağlanır. *hilA* ekspresyonu, *hilE* ekspresyon seviyesi ile regüle edilir. *hilE*'nin ekspresyonu ise, *fimY* ve *fimZ* genleri tarafından regüle edilir. *fimYZ* tarafından stimüle edilen *hilE*'nin indüksiyonu, *hilA*'nın baskılanmasına ve bunu takip eden süreçte SPI-1 tarafından kodlanan invazyon genlerinin aşağı yönlü regülasyonuna (negatif regülasyon) yol açar (Kolenda vd. 2019).

İki bileşenli sistemlerden *phoPQ*, *hilA* ekspresyonunun regülatörü olarak görev yaparken; *phoBR,* baskılayıcısı (Repressör) olarak görev yapmaktadır. PhoPQ dedektör proteini magnezyum, PhoBR ise fosfat yetersizliğine yanıt veren bir transkripsiyonel regülatör olarak görev görür (Monsieurs vd. 2005, Baxter ve Jones 2015). Fosfat ve magnezyum seviyeleri, *hilA* ekspresyon seviyelerinin kontrolü için gereklidir. PhoBR dedektör proteini, *fimZ* ekspresyonunu indükleyebilme yeteneğine sahiptir. Ancak PhoPQ, *fimZ* ekspresyonunda böyle bir fonksiyona sahip değildir. PhoPQ yalnızca *hilE* FimZ'ye bağlı bir şekildeyken yukarı yönlü regüle edebilir (Baxter ve Jones 2015).

Salmonella patojenite adası 2 (SPI-2) ile ilişkili bir regülatör olan PhoPQ, SPI-1 ile ilişkili regülatöre göre sRNA'yı daha fazla kontrol etmektedir. InvS, invazyonda önemli bir role sahip *Salmonella* sRNA'sıdır ve PhoPQ tarafından pozitif olarak regüle edilir. InvS, *fimZ* ekspresyonunu azaltır, ancak bunun tam tersi olarak ise flagella ekpresyonu için önemli bir regülatör olan *flhD*'nin ekspresyonunu arttırır (Colgan vd. 2016).

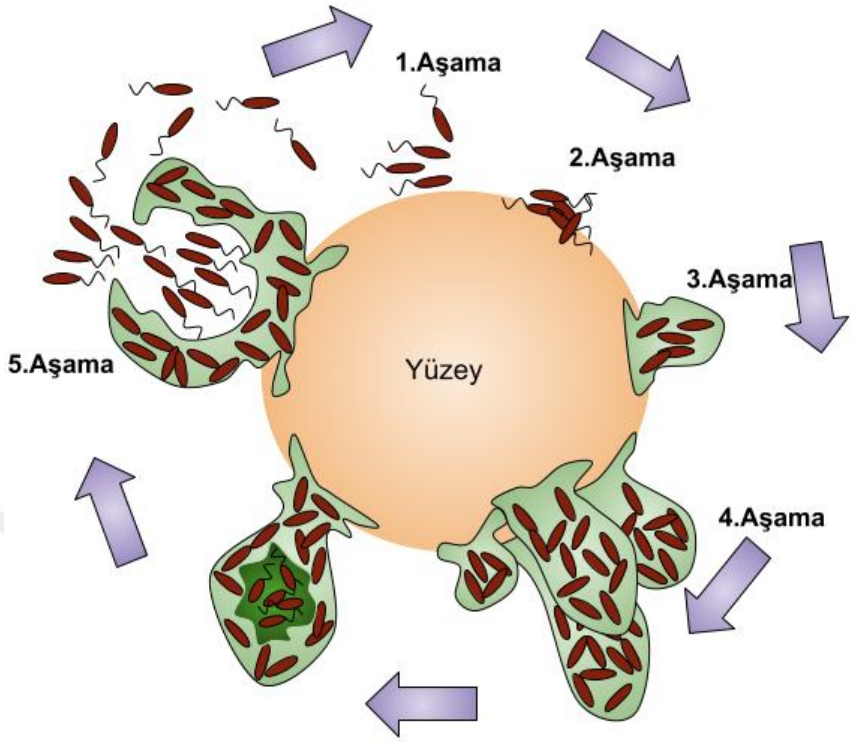
Belirli çevresel sinyaller tarafından desteklenen *Salmonella* fimbriyal faz varyasyon süreçleri özellikle virülans ile ilişkilidir. Tip 1 fimbriya ekspresyonun ana regülatörü olan FimZ yalnızca fimbriyal fazın regülasyonunda değil, *Salmonella* enfeksiyonunda da rol oynar. Özetle FimZ, *Salmonella* enfeksiyonunda çok çeşitli fenotiplerin global regülatörlerinden biri olarak görev yapar (Kolenda vd. 2019).

2.5 Tip 1 Fimbriyanın Biyofilm Oluşumundaki Rolü ve *Salmonella*'nın Hücrelere Adezyonu

Bakteriler konakçı ve çevre içinde hayatta kalmak ve varlıklarını sürdürebilmek amacıyla biyofilm yapıları oluştururlar (Flemming vd. 2016). Biyofilm yapıları, mikrobiyal hücrelerin biyotik veya abiyotik ya da ara yüzlere tutunarak oluşturdukları topluluklar olarak tanımlanmaktadır. Bu hücrelerin dışında, kendi ürettikleri bir hücre dışı polimerik matriks yapısı bulunur. Bu matriks sayesinde, çevresel stres koşullarına direnç ve yüzeylere tutunma yetenekleri artar. Biyofilm oluşumu, bakterilerin konakçı savunma mekanizmasına karşı direnç geliştirme stratejisi olarak da tanımlanabilir (O'Toole vd. 2000, Donlan 2002, Percival vd. 2011, Jamal vd. 2018).

Biyofilm oluşumu biyotik ve abiyotik yüzeylere adezyon ile başlar. Bakterilerin bir yüzeye yeterince yaklaşması, biyofilm oluşumunun ön koşuludur. Bakteriler bir yüzeye yaklaştıkça hem çekici ve hem de itici kuvvetler devreye girer. Yüzeyden yaklaşık 10-20 nm mesafede, bakteri yüzeyindeki negatif yükler, çoğu çevresel yüzeydeki negatif yükler tarafından itilir. Bakteri hücreleri ve yüzey arasındaki çekici van der Waals kuvvetleri ve yüzeye mekanik bağlanma sağlamak için fimbriya ve flagella kullanımıyla, bu itme kuvvetinin üstesinden gelinebilmektedir (Gonzalez-Escobedo ve Gunn 2013, Rabin vd. 2015).

Biyofilm oluşumu beş ana aşamada gerçekleşir (Şekil 2.5). Birinci aşamada, hareket halindeki planktonik hücreler bir yüzeye tutunur. Doğru koşulların mevcut olması koşuluyla, yüzeye tutunan bu hücreler daha sonra yüzeyde biyofilm üretimini başlatır. İkinci aşamada, yüzeye tutunan hücreler hücre dışı bir polimerik madde (EPS) salgılar ve yüzeye geri çevrilemez şekilde bağlanır, bu da hücre kümelenmesi ve matriks oluşumu ile sonuçlanır. Yüzeye geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanan biyofilm komünitesi, güçlü fiziksel veya kimyasal kesme kuvvetlerini tolere edebilir. Üçüncü aşamada, biyofilm komünitesi mikro koloniler ve su kanalı yapısı geliştirerek olgunlaşmaya başlar ve aynı zamanda çok katmanlı bir hale dönüşür. Dördüncü aşamada, tamamen olgunlaşmış biyofilm maksimum hücre yoğunluğuna ulaşır ve üç boyutlu bir hücre topluluğu olarak kabul edilir. Beşinci aşamada, olgun biyofilm ana hücre topluluğundaki hücrelerin mikro kolonilerini ortama salar (Rabin 2015, Verderosa 2019). Ayrılan mikro koloniler tutunacak yeni yüzey arayışına girerler ve bu döngü birçok kez tekrarlanır.



Şekil 2.5 Biyofilm oluşum diyagramı (Sürkaç ve Akçelik 2022)

Tip 1 fimbriyalar, kolesterol ve safra taşları yüzeyinde biyofilm oluşumu esnasında yukarı yönlü regüle olurlar. Ancak, aşırı fimbriya üretimi biyofilm oluşumunda negatif bir etki yaratır. Bunlara ilave olarak ise tip 1 fimbriya; HEp-2 hücrelerinde, bazı kemirici türlerinin bağırsak epitelinde, tavuk bağırsak epitelinde ve plastik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumuna da katkıda bulunmaktadır (Crawford vd. 2010, Gonzalez-Escobedo ve Gunn 2013, Kolenda vd. 2019).

S. Typhimurium üzerinde yapılan çalışmalar, tip 1 fimbriya bulunduran suşların, fimbriya içermeyen suşlara oranla, HeLa hücreleri üzerinde çok daha yüksek oranda adezyon ve invazyon yeteneği içerdiğini kanıtlamıştır. *Salmonella*'nın HEp-2 hücrelerine mannoz duyarlı bir şekilde adezyon yeteneği gösterdiği ve bu nedenle de bu bağlanmaya tip 1 fimbriyanın aracılık ettiği bilinmektedir (Kolenda vd. 2019).

2.6 Bakteriyel Adezyonda Görevli *fimF* Geni ve Kodladığı Proteinin Karakteristikleri

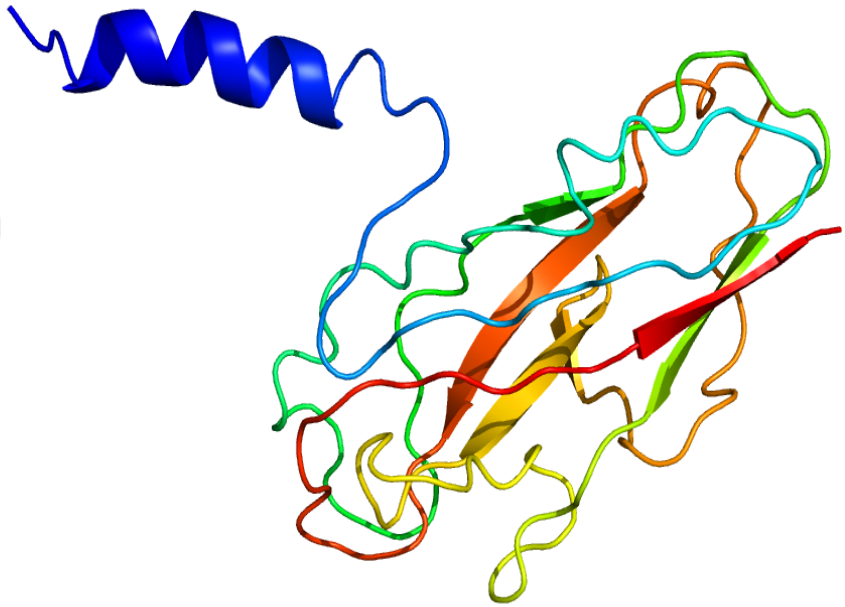
Tip 1 fimbriyanın yapısal bileşenleri FimA, FimI, FimH ve FimF'dir. FimF proteininin literatürde kabul edilen ismi, "Fimbriyal benzeri protein" ya da kısa tanımıyla FimF'dir. *S.* Typhimurium FimF proteini, adaptör protein görevi görmektedir. Bu protein, *E. coli* adaptör proteinlerinden FimF ve FimG' ye çok az benzerliğe sahiptir. Ancak FimF'nin *S.* Typhimurium *fim* gen kümesi içerisindeki konumu ve hem FimF hem de *Salmonella* FimA alt ünitesinde bulunan korunmuş amino asit alanlarının varlığı nedeniyle adaptör görevi gördüğü varsayılmaktadır (Zeiner vd. 2012a) (Şekil 2.7).

Tip 1 fimbriya kodlayan operonun bir parçası olan *fimF*, proteinlerin bir yüzeye tutunmasında, çevresel kalıcılıkta, biyofilm oluşumu için kolonizasyonda ve invazyon için bakteri-konak arasındaki etkileşimlerde önemli rol oynamaktadır (Campos-Galvão vd. 2016).

Salmonella fim gen kümesi (*fimAICDHFZYW*) tarafından kodlanan *fimF* geni, *fimA* promotör bölgesinin (P_{fimA}) kontrolü altında tek bir operon içerisinde yer almaktadır. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 genomunda bulunan *fimF* geni, 519 bç büyüklüğünde olup, 172 amino asitten oluşmaktadır. Sarmal FimA ana alt ünitesinin aksine, FimF lineer yapıdadır (Gossert vd. 2008). FimF proteini kodlayan *fimF* geni, tip 1 fimbriya biyogenezinde kritik bir rol oynar. FimF proteininin fimbriyal düzeneğin başlatılması için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Hancox vd. 1997). Zira, *fimF* geninin delesyona uğratılmasının, fimbriya oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (Kolenda vd. 2019). Hem *E. coli'* de ve hem de *S.* Typhimurium'da adaptör protein görevi gören FimF ve diğer adezin proteinleri kodlayan genlerin spesifik delesyonlarının fimbriya üretimini engellemediği, ancak bu bakterilerin adezif özelliklerini yitirdiği belirlenmiştir (Şekil 2.6) (Hancox vd. 1997).

S. Typhimurium tip 1 fimbriyaları hem HeLa hem de Hep-2 hücrelerine tutunmadan sorumludur. Bu bilgiden yola çıkarak Hancox ve arkadaşlarının (1997) *fimH* ve *fimF* genlerinin delesyonları sonucu oluşturdukları mutantlar ile yürüttükleri çalışmada, bu mutasyonların fimbriyal filamentleri eksprese edebilen ancak mannoz duyarlı adezif

özellikten yoksun bakterilerin oluşumuna neden olduğunu saptamışlardır. FimF varlığında FimH, FimF'nin adaptör görevinden kaynaklı olarak, fimbriyal şafta verimli bir şekilde tutunma gerçekleştirir. FimF proteinini kodlayan *fimF* geninin üzerindeki polar etkiler, transformantların fimbriyal fenotipini etkilemektedir (Hancox vd. 1997).



Şekil 2.6 *S.* Typhimurium ATCC 14028 FimF proteininin 3 boyutlu yapısı (Phyre2 ile çizildi)

E. coli fim gen kümesinde bulunan, ancak *S.* Typhimurium *fim* gen kümesinde bulunmayan tek bir adaptör protein FimG olarak tanımlanmıştır (Zeiner vd. 2012b). *S.* Typhimurium'da fimbriya üretiminden sorumlu adaptör proteini yalnızca FimF iken, *E. coli*'de FimF ve FimG olmak üzere iki adaptör protein bulunmaktadır. FimF, fimbriya bağlanmasında, FimG'nin ise fimbriya polimerizasyonunun inhibisyonunda görev aldığı belirlenmiştir (Russell ve Orndorff 1992).

E. coli adaptör proteinleri olan FimF ve FimG, C-terminal β-zincirinden yoksun bir immünoglobulin benzeri katlamayı içeren proteinlerdir (Puorger vd. 2008). *E. coli* FimF domaini içerisinde, kendi kendini tamamlayan C-terminal donör zincirini kapsayan etkileşimler bulunur. FimF adaptör proteinin donör iplik alıcı bölgesi, hidrofobik

rezidülerle kaplı bir oluktan oluşmaktadır. Donör ipliğin amino asit yan zincirleri, alıcı proteinin yan zincirleriyle ve bir ‘’moleküler fermuar’’ oluşturan beş enterkalasyonlu rezidü hattı ile etkileşime girer (Gossert vd. 2008).

S. Enteritidis’de kısa bir linker'den önce gelen FimF'nin N-terminal uzantısı, donör zincirin fimbriyal domainde hidrofobik oluğun eksik C-terminal uzantısıyla tamamlanmasına izin vermektedir (Grzymajło vd. 2010). Tip 1 fimbriya, *Salmonella* bakterisinin en iyi çalışılmış fimbriyalarından biri olmasına karşın, literatürde FimF proteininin *Salmonella*’daki işleyişi, virülanslığı, biyofilm oluşumu ve konakçı hücre invazyonundaki rolü hakkındaki çalışmalar yetersizdir.

2.7 Replikasyon Orijininde Görev Alan *dam* Geni ve Kodladığı Proteinin Karakteristikleri

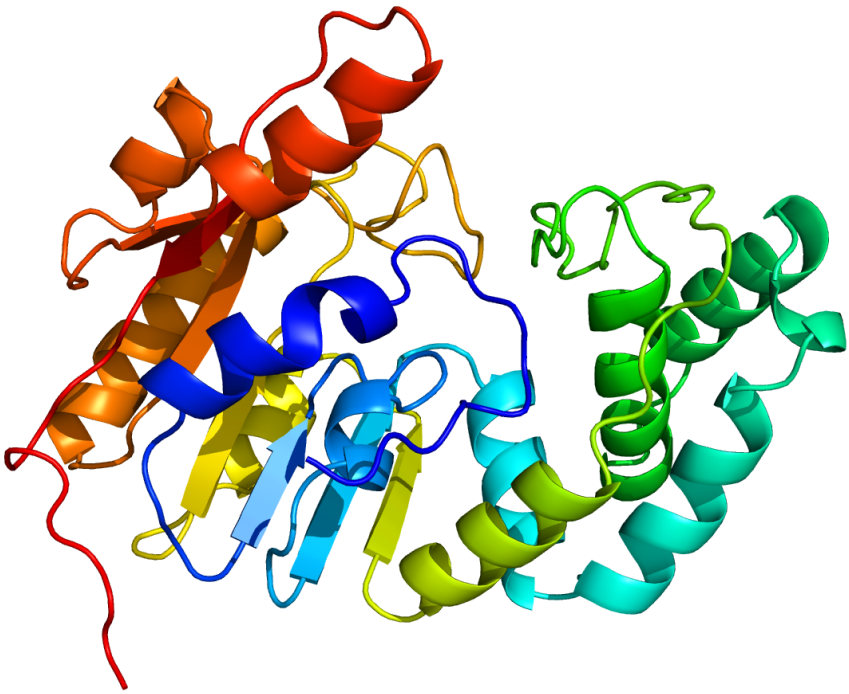
DNA metilasyonu, bakteriler, bitkiler ve memeliler de dahil olmak üzere canlılar dünyasının neredeyse tümünde gerçekleşen bir olaydır. DNA metilasyonu, sitozinin C-5 N-4 pozisyonlarında ve adenin N-6 pozisyonunda meydana gelir. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (MTazlar) olarak bilinen enzim grubu tarafından katalize edilir (Giacomodonato vd. 2009). Prokaryotlarda DNA metilasyonu, yalnızca konak savunma sistemde değil, aynı zamanda çevreye doğrudan yanıt verebilen hücre döngüsünü, gen ekspresyonunu ve virülansı da düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır (Seong vd. 2021).

Dam (DNA adenin metilaz) homologları, *E. coli*, *Salmonella* spp. ve *Vibrio cholerae* gibi enterik bakteriler arasında yaygındır. Dam, *V. cholerae’*da hayati bir önem taşırken, *E. coli* ve *Salmonella*’da canlılık için temel bir protein değildir (Giacomodonato vd. 2009).

Bakteri hücresinde, DNA adenin metilasyonu (Dam), DNA replikasyonu, kromozom segregasyonu, DNA yanlış eşleşme tamiri ve belirli genlerin transkripsiyonu gibi çeşitli süreçlerde rol oynar. Dam metilasyonu tarafından düzenlenen genler genellikle ya kendi promotörlerinde ya da yukarı akış regülatör dizilerinde 5’GATC’3 bölgeleri içerir. Bu 5’GATC’3 bölgelerinin metilasyon konumu, RNA polimeraz veya regülatör proteinler ile

bunların aynı kökenli DNA bağlama bölgeleri arasındaki etkileşimi kontrol eder (García-Del Portillo vd. 1999).

Dam metil transferaz enzimi, iki özgül S-adanozil-L-metiyonin (SAM) bağlanma bölgesi içermektedir. Bu bağlanma bölgelerinden biri katalitik bölgede bulunurken diğeri allosterik efektör bölgede yer alır (Bergerat ve Guschlbauer 1990) (Şekil 2.7). Dam metil transferaz, basit kinetik davranışından dolayı bir monomer olarak işlev görür (Herman ve Modrich 1982). Monomerik formdaki Dam metil transferaz enzimi, bir metil donörü olan SAM kofaktöründen metil grubunu alır. Daha sonra bu metil grubunun, 5'GATC'3 tetramer palindromik serilerde bulunan adenin bazının N-6 pozisyonuna transferini katalizler. Dam metil transferaz enziminin birincil hedefi tek zinciri metillenmiş (hemimetile) DNA'dır ve 5'GATC3' sekanslarında ikinci metilasyonu gerçekleştirir (dimetilasyon). Dam metilaz enzimi bu aktivitesi için öncelikle doğal formdaki DNA'yı tercih eder. Yani herhangi bir nedenle halka formuna dönüşmüş ya da çift zincir formu tamamen açılmış DNA yapıları güçlü bir metil grubu alıcısı değildir (Şekil 2.7) (Herman ve Modrich 1981, Herman ve Modrich 1982, Jakomin vd. 2008).



Şekil 2.7 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Dam proteininin 3 boyutlu yapısı (Phyre2 ile çizildi)

Dam proteini, replikasyon orijininde görev yapar ve replizomu kısa bir mesafeden takip ettiği için hemimetillenmiş DNA genellikle kısa ömürlüdür (Balbontín vd. 2006). DNA replikasyonunun başlamasını düzenleyen bir başka protein ise SeqA proteinidir. SeqA proteini, Dam metilazın bağlandığı hemimetillenmiş 5'GATC'3 serilerine, Dam metilazdan daha yüksek bir afiniteyle bağlanır (Uğur vd. 2018). SeqA proteini 5'GATC'3 serilerine, jenerasyon zamanın 1/3 kadar bir süre bağlanır ve daha sonra ayrılır. Böylece Dam metilazın sürekli olarak 5'GATC'3 serilerine bağlanmasını engelleyerek replikasyonun erken aşamalarında replikasyonun başlamasını düzenler (Campbell ve Kleckner 1990).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları

S. Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suş, bu suşun *dam* geni mutantı, pBAD vektörü üzerinde *dam* geni içeren rekombinant vektörün *dam* mutantına aktarımı ile elde edilen tamamlanmış varyantı ve yine 14028 suşunun *fimF* geni mutantı, Prokaryotik Genetik çalışma grubu tarafından oluşturulan kültür koleksiyonundan (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) sağlandı. *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal suşu ve mutantları, Luria Bertani (LB) besiyerinde 37 ºC sıcaklıkta 200 devir/dk rotasyon yapan inkübatörde 12 saat inkübe edildi. *dam* ve *fimF* geni homolog bölge rekombinasyonu tekniği kullanılarak delesyona uğratılan mutant suşlar kloramfenikol (20 µg/mL^{-1}) içeren ortamlarda ve bu genlerin tamamlanmış konstraktları ise, amfisilin (100 µg/mL^{-1}) içeren ortamlarda üretildi. Stok kültürler, % 60 oranında gliserol içeren LB Broth ortamında -20 ºC ve -80 ºC'de tutuldu.

3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar

İçerik	**g/L**
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15

Yukarıda verilen bileşenler 1000 mL distile su içerisinde homojenize edildi, pH 7,0 ± 0,2'ayarlandı ve 121 ºC'de (15 dk) sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
Agar	15

Bileşenler 1000 mL distile su içerisinde homojenize edildi, pH 7,0 ± 0,2'ayarlandı ve 121 ºC'de (15 dk) sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Kalkoflor (40 µg/mL) İçeren Luria Bertani (LB) Broth (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
Kalkoflor	0,04

Bileşenler 1000 mL distile su içerisinde, son aşamada 40 µg/mL kalkoflor aktarıldıktan sonra homojenize edildi, pH 7,0 ± 0,2'ayarlandı ve 121 ºC'de (15 dk) sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Fosfatla Tamponlanmış Su (PBS)

İçerik	g/L
KCl	2
NaCl	80
KH_2PO_4	2,4
Na_2HPO_4	14,45

Bileşenler 1000 mL distile su içerisinde homojenize edildi, pH 7,0 ± 0,4'ayarlandı ve 121 ºC'de (15 dk) sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tween-80 Stok Solüsyonu

Tween-80	1,09 g
dH_2O	1 mL

%33'lük Glasiyal Asidik Asit Solüsyonu

İçerik

Glasiyal Asetik Asit	33 mL
dH_2O	67 mL

% 95'lik Metanol Çözeltisi

İçerik

Metanol	95 mL
dH_2O	5 mL

%1'lik Kristal Viyole Boyası

İçerik

Kristal viyole	1 g
dH_2O	100 mL

%10'luk L-Arabinoz

İçerik

L-Arabinoz	10 g
MilliQ Water	100 mL

3.1.3 Antibiyotikler

Çalışma kapsamında kullanılan antibiyotik çözeltileri ve çözücü maddeleri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 1 Antibiyotik çözeltileri

Antibiyotik	Kısaltma	Çözücü
Amfisilin	AMP	dH_2O
Kloramfenikol	CHL	%95'lik EtOH

3.2 Yöntem

3.2.1 *fimF* gen bölgesini içeren rekombinant plazmidin eldesi

3.2.1.1 Genomik DNA izolasyonu

37 °C'de 18 saat süresince geliştirilen aktif *S.* Typhimurium ATCC 14028 suşundan 1,5 mL hacimli tüplere 1 mL aktarıldı ve 5000 Xg hızında 10 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet 180 µL hacimdeki kesim solüsyonunda çözüldü. Bu ortama 20 µL Proteinaz K çözeltisi eklenerek iyice karıştırıldı ve 56 °C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde ortama 20 µL RNaz A Solüsyonu ilave edilerek, bu ortam oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bu ortama 200 µL parçalama (lizis) çözeltisi aktarıldı, iyice karıştırıldı ve üzerine 400 µL % 50'lik etanol aktarıldı. Hazırlanan lizat, bir Genomik DNA saflaştırma kolonuna aktarıldı ve 1 dakika boyunca 6000 Xg'de santrifüj edildi. Yeni mikrosantrifüj tüpüne alınan kolona, etanol içeren ve toplam hacmi 500 µL olan yıkama çözeltisi I ilave edildi ve 8000 Xg'de 1 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 500 µL yıkama tamponu II (etanol eklenmiş) ilave edilerek 12000 Xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Son aşamada steril yeni bir 1,5'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılan kolona 200 µL geri kazanma çözeltisi eklenerek 2 dakika 24 °C'de tutuldu ve inkübasyon süresi bitiminde, DNA çöktürülmesi için 1 dakika boyunca 8000 Xg'de santrifüj işlemi uygulandı. Çözeltinin genomik DNA saflığı ve konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre cihazında (NanoDrop 2000, Thermo, USA) tespit edildi. Bakteriyel kromozomlar, GeneJET kitleri kullanılarak (Thermo Scientific, USA) ve kit üretici firmanın uygulama prosedürü kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.1.2 *fimF* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltılması

fimF geni 519 nükleotid çiftinden oluşmaktadır ve bu açık okuma kalıbında (ORF) 172 amino asit kodu bulunmaktadır. Bu genin genomun başka bir yerinde tekrarlanmayan primerlerine klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere *Sal*I ve *Pst*I (Çizelge 3.2) kesim serileri ilave edildi ve polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.3 ve 3.4). Bu reaksiyon sonrasında oluşan PZR ürünlerden 5 µL alınarak 2 µL 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırıldı ve agaroz jel sistemlerinde sabit akım uygulanmak suretiyle (100 V) yürütüldü. DNA fragment boylarının tespiti için, şahit ticari DNA preparatlarından (#SM0241, Fermentas, USA) yararlanıldı. Elektroforetik hareketliliğin belirlenmesi ve görüntülenmesi için jel sistemleri, DNA 0,2 µg/mL etidyum bromit çözeltisinde 15 dk boyama işlemine tabi tutuldu. Fotoğraflar, Kodak Gel Logic 200 (USA) görüntüleme sisteminde çekildi.

Çizelge 3.2 Gen spesifik primer dizileri

***fimF*-N-ter-klon ileri primer**	5'- gat**gtcgac**caacgtcgattgccact -3'
***fimF*-N-ter-klon geri primer**	5'- tga**ctgcag**tcaggaaggtcgcatcc -3'

Çizelge 3.3 PZR içeriği

Nükleaz İçermeyen Su	36,75 µL
Tampon (10x)	5 µL
dNTP (10mM)	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0,25 µL
$MgCl_2$ (25mM)	3 µL
İleri Primer (10 pmol)	1 µL
Geri Primer (10 pmol)	1 µL
DNA (40ng/µL)	2 µL

Çizelge 3.4 PZR Koşulları

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Ön Denatürasyon	95 ˚C	5 dk	1
Denatürasyon	95 ˚C	30 sn	35
Bağlanma	66 ˚C	30 sn	
Uzama	72 ˚C	1 dk	
Son Uzama	72 ˚C	10 dk	1

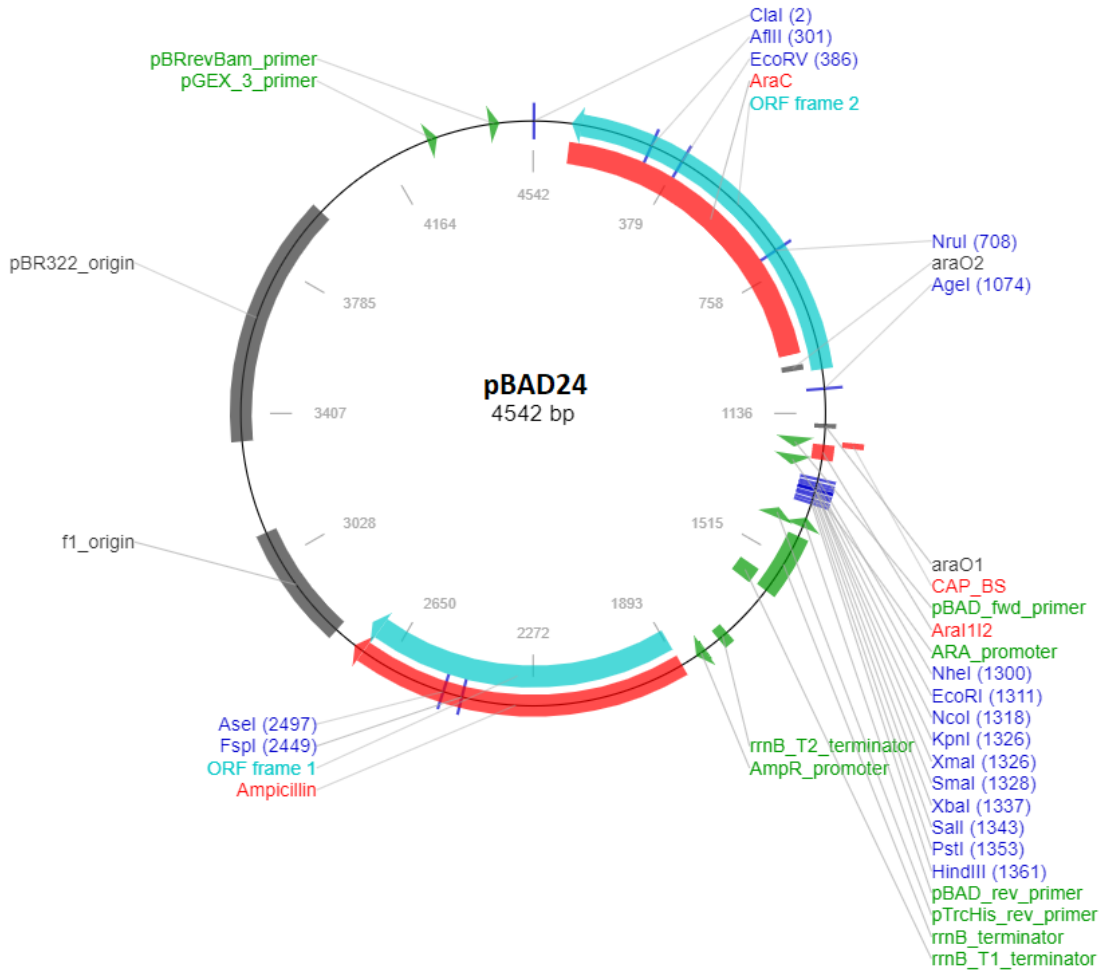
3.2.1.3 Saf *fimF* PZR ürünü eldesi

PZR ürünlerinin saflaştırılması GeneJET PCR saflaştırma kiti protokolü (Thermo Scientific, USA) uygulanarak yapıldı. PZR ile çoğaltılan *fimF* ürünleri 1,5 mL'lik bir tüpe aktarıldı ve PZR ürününe 1:1 oranında bağlanma tamponu eklendi. Karışıma 1:2 oranında % 100'lük isopropanol ilave edildi. Daha sonra karışım bir GeneJET pürifikasyon kolonuna aktarıldı ve 1 dakika boyunca 12000 Xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Kolonun üzerine 700 µL yıkama çözeltisi aktarıldı ve 1 dakika 12000 Xg'de santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Kolonda kalan yıkama tamponunu ortamdan tamamen uzaklaştırmak için 12000 Xg'de 1 dakika boyunca tekrar bir santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Kolon 1.5 mL'lik bir tüpe aktarıldı, üzerine 30 µL geri kazanma çözeltisi ilave edildi ve 1 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Pürifiye edilmiş PZR ürününün saflığı ve konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre cihazı (NanoDrop 2000, Thermo, USA) kullanılarak belirlendi.

3.2.1.4 Plazmid izolasyonu

pBAD24 vektörünü içeren (Şekil 3.1) *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*dam* (pBAD) hücreleri, 100 µg/mL amfisilin ve % 0,1 arabinoz içeren LB (Luria Bertani) Broth ortamında 37 °C'de 12 saat inkübe edildi. Bu üreme ortamlarından plazmid izolasyonu QIAGene QIAprep (Cat No: 27106, Germany) kit protokolü uygulanarak gerçekleştirildi. Üreme ortamına santrifüj işlemi uygulanarak elde edilen bakteri çökeltisi üzerine 250 µL P1 tamponu aktarıldı ve karıştırıldı. Bu ortama 350 µL N3 tamponu ilave edildikten sonra da bir süre karıştırma işlemine devam edildi. Bu karışımlar 13000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant, QIAprep (QIA Gene) kolona aktarıldı ve 13000 rpm'de (1 dk) santrifüj edildi. Bu işlemi takiben, QIAprep kolona 500 µL PB tamponu aktarıldı ve santrifüj işlemi tekrar edildi. Sonrasında kolona 750 µL PE tamponu ilave edildi, bu ortam santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işlemine tabi tutulan ortamda oluşan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve son aşamada, kolonun merkezine 50 µL elüsyon tamponu ilave edildi. Plazmid DNA'sının saflığı ve konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo, USA) cihazında

belirlendi. Saflığı ve konsantrasyonu ölçülen plazmid DNA, % 0,7 jel sistemlerine sabit akım uygulanmak suretiyle (80 V) elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işlemi sonrasında jellerdeki DNA etidyum bromit çözeltisi kullanılarak boyandı, UV ışık altında ‘’Kodak 1D imaging system’’ kullanılarak görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. DNA moleküllerinin büyüklükleri, süper sarmal moleküler standardı (#D5292, SIGMA, Germany) kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.1 Amfisilin direnç genini barındıran pBAD24 plazmidinin genetik haritası

3.2.1.5 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi

fimF gen konstraktının elde edileceği pBAD24 plazmidini içeren *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*dam* (pBAD) hücreleri 100 µg/mL amfisilin ve % 0,1 arabinoz ilave edilen LB

Broth ortamında 37 °C'de 12 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu üreme ortamlarından plazmid izolasyonu QIAGene QIAprep (Cat No: 27106, Germany) kit protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon sonunda elde edilen preparatlar bölüm 3.2.1.4 de detayları ile anlatılan elektroforetik koşullara tabi tutuldu. Ekstrakromozomal DNA moleküllerinin büyüklüklerinin saptanması amacı ile, ccc (covalently closed circular DNA) standardı (Cat No: D5292, SIGMA, Germany) kullanıldı.

DNA moleküllerinin spesifik bölgelerden kesimi amacı ile kullanılan tüm enzimler ve spesifik tamponlar Fermentas (Thermo Scientific, USA) firmasından sağlandı. Halkasal yapıdaki pBAD24 vektör plazmidinde ve *fimF* geni PZR ürünlerinde klonlama işlemlerine spesifik uçlar (yapışkan uçlar) oluşturmak için, bu DNA molekülleri üzerinde *Sal*I ve *Pst*I enzim kesimleri gerçekleştirildi. *Sal*I ve *Pst*I kesim bölgeleri arasında, pBAD24 haritasından da anlaşılacağı üzere sadece 10 nükleotid çifti bir mesafe bulunmaktadır. Pürifiye *fimF* PZR ürününde ve pBAD24 vektöründe kesim işlemleri için, kullanılan oranlar ve içerikler Çizelge 3.5'te verilmiştir. DNA kesim işlemleri için 37 °C inkübasyon sıcaklığı ve 4 saat inkübasyon süresi uygulandı. Bu işlemin sonunda enzim inaktivasyonunun sağlanması amacıyla 80 ºC sıcaklıkta 20 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. DNA, GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak saflaştırıldı.

Çizelge 3.5 Enzim kesim reaksiyon karışımı

Distile Su	15 µL	**Distile Su**	7 µL
RE Tamponu	3 µL	**RE Tamponu**	2 µL
Pürifiye *fimF* ürünü	10 µL	**pBAD24**	10 µL
***Sal*I RE enzimi**	1 µL	***Sal*I RE enzimi**	0,5 µL
***Pst*I RE enzimi**	1 µL	***Pst*I RE enzimi**	0,5 µL

3.2.1.6 DNA bağlanma reaksiyonu (Ligasyon)

Bölüm 3.2.15' de detayları ile anlatılan işlemlere tabi tutulan *fimF* PZR ürünü, lineerize edilen pBAD24 ligasyon işlemine tabi tutularak rekombine edildi. Ligasyonda T4 DNA ligaz enzimi kullanıldı. Ligasyon reaksiyon çözeltisine eklenecek olan insert miktarının hesaplanması için Promega Biomath Calculators (Promega Corporation, USA) programından yararlanıldı. Ligasyon reaksiyonunda insert/vektör oranı 3/1 olacak şekilde ayarlandı (Çizelge 3.6). Ligasyon reaksiyonu 22 ºC'de 16 saat süreyle gerçekleştirildi. Reaksiyon bitiminde enzim inaktivasyonunun sağlanması amacıyla bu ortam 65 ºC sıcaklıkta 10 dakika inkübasyon işlemine tabi tutuldu. DNA, GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) protokolü kullanılarak saflaştırıldı.

Çizelge 3.6 DNA bağlanma reaksiyonu karışımı

	***Salmonella* Typhimurium ATCC 14028**	**Kontrol Grubu***
Distile Su	12,20 µL	17 µL
T4 DNA Ligaz Tamponu	2 µl	2,5 µL
fimF	3,795 µl	-
pBAD24	1 µl	5 µL
T4 DNA Ligaz	1 µl	1 µL

*Kontrol grubu yalnızca vektör içermektedir.

3.2.1.7 *E. coli* BL21 suşuna 3i/1v ligasyon ürününün transformasyonu

İnsert/vektör oranı 3/1 şeklinde ayarlanan ligasyon ürünleri elektroporasyon yöntemi ile ara konak olan *E. coli* BL21 şusuna aktarıldı. Elektroporasyon için Çizelge 3.7'de belirtilen elektroporasyon koşulları uygulandı.

Çizelge 3.7 Elektroporasyon koşulları

Voltaj	2500 V
Kapasite	25 µF
Rezistans	200 Ω
Küvet boyutu	2 mm

Elektroporasyon işleminden sonra transformantlar 37 ºC'de 4 saat boyunca 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminden sonra 50 µg/mL amfisilin ve % 0,01 arabinoz ihtiva eden LB katı besiyerine ekimi yapılan transformantların 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, transformantların doğruluğunun kanıtı için plazmid izolasyonu ve koloni PZR (#B100BG0021, Solis BioDyne, Estonia) reaksiyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.8 ve 3.9).

Çizelge 3.8 Koloni PZR reaksiyon içeriği

5x HOT FIREPol Blend Master Mix	4 µL
İleri Primer	0,4 µL
Geri Primer	0,4 µL
DNA	10 µL
Distile Su	5,2 µL

Çizelge 3.9 Koloni PZR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 ˚C	5 dk	1
Denatürasyon	95 ˚C	10 sn	25
Bağlanma	66 ˚C	30 sn	
Uzama	72 ˚C	1 dk	
Son Uzama	72 ˚C	5 dk	1

3.2.1.8 Elektrokompotent hücrelerin hazırlanması ve *S.* Typhimurium ATCC 14028 *fimF* mutant suşuna rekombinant plazmidin transformasyonu

18 saat 37 ºC'de aktifleştirilen *S.* Typhimurium *fimF* mutant şusu, 1:100 oranında dilüe edildikten sonra OD_{600}=0,4 olana kadar inkübasyona bırakıldı. Durağan faza gelen *fimF* mutant suşundan 2 mL alındı ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpüne alınan suş, 4 ºC'de ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin bitiminde üst faz ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 mL soğuk dH_2O (+4 ºC) eklendi, homojen hale getirildi ve 10000 rpm santrifüjleme gücünde 20 dakika işleme tabi tutuldu. Santrifüj bitiminde üst faz ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet üzerine tekrar 1 mL soğuk dH_2O ilave edildi ve 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Bu yıkama işlemi toplamda üç kez tekrarlandı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Üçüncü ve son yıkama işleminden sonra pellet üzerine 50 µL soğuk dH_2O eklendi.

Oluşturulan elektrokompotent hücrelerin üzerine, 40 ng hacimde *E. coli* BL21 suşuna aktarılan 3i/1v transformantlarından izole edilen rekombinant plazmid eklendi. Homojen hale getirilen örnek elektroporatör küvetlerine aktarıldı. Çizelge 3.7'deki koşullar dahilinde elektroporasyon işlemine tabi tutuldu. Elektroporatörde 2500 V akım verilen küvetlerin üzerine daha sonra 1 mL LB besiyeri ilave edildi ve 4 saat boyunca 37 ºC'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde, inkübasyona bırakılan örnekler, 10 µg/mL

kloramfenikol, 50 µg/mL amfisilin ve % 0,01 arabinoz ihtiva eden seçici katı besiyerine ekildi ve tekrar 37 ºC'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde transformasyonun doğruluğunu kanıtlamak için seçilen kolonilerden aktifleştirilme yapıldı ve bu aktif suştan QIAGene QIAprep Spin Miniprep Kit protokolü kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.2 Minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi

96 kuyulu mikrotitre plakaları kullanılarak gerçekleştirilen MIC deneyinde, deney düzeneği üç paralel olacak şekilde tasarlandı. Deney düzeneğinde kullanılan tüm kuyulara 100 µL LB besiyeri konuldu. İlk kuyuya son konsantrasyonları 4096 µg/mL olan kloramfenikol (CHL) ve amfisilin (amp) antibiyotikleri aktarıldı ve bu ortam mikropipet aracılığı ile homojenize edildi. Daha sonra ilk kuyudan 100 µL alınarak ikinci kuyuya aktarıldı ve bu işlem son kuyuya kadar tekrar edildi. Son kuyuda ise, tüm karışımları eşitlemek için 100 µL hacim dışarı atıldı. Antibiyotik konsantrasyonları bu şekilde ayarlanan kuyulara, 18 saat 37 ºC'de inkübasyona bırakılan *fimF* mutant şusu kültür ortamından 30 µL ilave edildi. Bu denemelerde Δ*fimF*+LB[1], amp+LB[2], CHL+LB[3], LB[4] olmak üzere dört kontrol grubu gerçekleştirildi. Bu ortamlar 37 ºC'de (24 saat) inkübe edildi. Bu işlemin sonunda kuyulardaki bakteri üremesi optik yoğunlukları ölçülerek belirlendi.

3.2.3 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi

S. Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu, bu suşun *dam* geni mutantı (Δ*dam*), pBAD vektörü üzerine *dam* geni inserti bulunan rekombinant vektörün *dam* mutantına aktarımı ile elde edilen tamamlanmış varyantı (Δ*dam* (pBAD*dam*)) ve yine 14028 suşunun *fimF* geni mutantı (Δ*fimF*), pBAD vektörü üzerinde *fimF* geninin N terminal domainini içeren rekombinant vektörün, *fimF* mutantına aktarımı ile elde edilen tamamlanmış varyantının (Δ*fimF* (pBAD*fimF*)) biyofilm oluşturma kapasitesinin tespiti için Stepanovic vd. (2004) ve Vestby vd. (2009)'nin önerdiği yöntemler, kısmen kombine edilerek kullanıldı.

Bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri, 96 kuyucuklu polistiren yüzeylere sahip sistemlerde kantitatif olarak belirlendi.

Salmonella suşları NaCl içermeyen LB sıvı besiyerinde (LB^{-NaCl}) 37 ºC'de 18 saat boyunca 200 rpm çalkalamalı inkübatörde üretildi. 1×10^9 kob/mL (koloni oluşturma birimi) konsantrasyonda hazırlanan bakteri kültürlerinden 30 µL alındı ve 100 µL LB^{-NaCl} sıvı besiyeri bulunan 96 kuyulu polistiren mikroplaka kuyucuklarına aktarıldı. Mikroplakalar 20 °C'de 72 saat statik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde üst fazlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklar üç kez fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS, pH 7,0±2,0) ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında kuyucuklara tutunan biyofilm yapılarının fiksasyonu için 140 µL % 95'lik metanol ilave edildi ve 20 dakika süresince oda sıcaklığında bekletildi. Biyofilm yapıları % 1 kristal viyole kullanılarak 15 dakika süre ile boyandı. Plakalar steril distile su ile yıkandı ve bunun sonucunda biyofilm yapılarına tutunmayan boyanın ortamdan uzaklaştırılmasını takiben, mikroplakalar oda sıcaklığında kurutuldu. Üretilen biyofilm içerisine giren boyanın uzaklaştırılması için ortama 140 µL (% 33) glasiyal asetik asit ilave edildi ve bu ortamlar 24 ˚C'de, 30 dakika tutuldu. Biyofilme tutunan boya, OD_{595} nm'de ELISA okuyucusu (Biorad, USA) kullanılarak belirlendi. Nihai hesaplama; denenen suşlar için saptanan OD değerlerinin ortalamasından, kontrollerin aritmetik ortalamaları (yalnız LB^{-NaCl} Broth aktarılan kuyucuklar) çıkarılarak gerçekleştirildi. Bu denemeler 3 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde yürütüldü.

3.2.4 Bakteriyel hücre agregasyonunun belirlenmesi

Bakteriyel hücre agregasyonu, Tareb ve arkadaşları (2013) tarafından önerilen yöntem kullanılarak belirlendi. 18 saat boyunca 37 ºC'de aktifleştirilen kültürler 6000 rpm 4 ºC'de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işlemi bitiminde süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet 1 mL 1x PBS ile yıkandı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. İki kez yıkanan pellet üzerine 10 mL 1x PBS ilave edildi ve süspanse edildi. Bu süspansiyonun optik yoğunluğu OD_{600}=0,2 olacak şekilde ayarlandı. Her bir suş için hazırlanan hacimler 3 paralel olacak şekilde tüplere bölündü. Suşların farklı zaman

aralıklarındaki (0, 4, 20, ve 24. saat) optik yoğunluk (OD_{600}) ölçümleri yapılmak üzere 20 ºC statik inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Otoagregasyon yüzdesi: [(1 - OD_{zaman} / OD_{T0}) x 100] formülü kullanılarak belirlendi.

3.2.5 Oksidatif stres koşullarına bakterilerin direncinin belirlenmesi

Oksidatif stres koşullarına karşı bakterilerin gösterdiği direnç, Morales (2012) ve Hsu (2021) ve arkadaşlarını tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. 18 saat boyunca 37 ºC'de aktifleştirilen kültürler 25 mL LB besiyeri içerinde 1:1000 oranında dilüe edildi. Optik yoğunluğu (OD_{595}) 0,4 olana kadar 37 ºC ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı. OD_{595}=0,4 olan suş kültürlerinin üzerine son konsantrasyon 4 mM olacak şekilde, H_2O_2 ilave edildi. Bu kültürler, farklı zaman aralıklarında (0, 1, 2, 3 ve 4 saat) katı besiyerine ekilmek üzere tüplere bölündü. Farklı zaman aralıklarında LB katı besiyerine ekimi yapılan suşlar 24 saat 37 ºC'de statik inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonucunda koloni sayımı yapıldı ve sonuçlar kob/mL olarak ifade edildi.

3.2.6 Cam slaytlar üzerinde oluşturulan pelikül yapılarının selüloz içeriğinin tanımlanması

Suşların selülöz üretimi, Castelijn ve arkadaşları (2012)'nın tanımladığı prosedür kullanılarak tespit edildi. Steril cam kupon ilave edilmiş 6 kuyulu plakalara 6 mL kalkoflorlu (40 µg/mL) tuzsuz LB besiyeri eklendi. 18 saat boyunca 37 ºC'de aktifleştirilen kültürlerin optik yoğunluğu, OD_{595}=0.2 olacak şekilde ayarlandıktan sonra, 1/20 oranında kültür/besiyeri olacak şekilde (300 µL) kuyulara aktarıldı ve 20 ºC'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyular 3 kez steril PBS ile yıkandı. Kuponların arka yüzeyi PBS ile iyice temizlendikten sonra, steril lam üzerine aktarıldı ve floresan mikroskopisi (Zeiss Axio Imager M1, Germany) ile görüntülendi. Floresan mikroskop (Zeiss Axio Imager M1, Germany) görüntüleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünde alındı.

3.2.7 Kongo Red içeren LB^{-NaCl} agar besiyerinde doğal tip suş ve mutantlarda biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi

Denemelerde kullanılan suşların biyofilm morfotipleri, Römling ve Rohde (1999) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Bu denemede öncelikle, 18 saat süresince 37 ºC'de aktifleştirilen bakteri kültürlerinden 20 µL alınarak, kongo red (40 µg/mL) içeren tuzsuz LB katı besiyeri üzerine damlatma ekim yapıldı. 20 ºC'de minimum 8 günlük inkübasyon sonucunda Petri plaka yüzeyinde oluşan koloniler stereo mikroskop (Leica DMS1000, Germany) kullanılarak görüntülendi. Tüm çalışma 6 paralel ve 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.8 Kalkoflor bağlanma denemesi

Kalkoflor bağlanma denemesi, katı ve sıvı olmak üzere iki farklı besiyerinde gerçekleştirildi. LB ortamında, 18 saat boyunca 37 ºC'de geliştirilen aktif kültürlerin, kalkoflor (50 µg/mL) içeren tuzsuz LB katı besiyerine ekimi yapıldı. Sıvı besiyerindeki deneme için ise 4500 µL kalkoflor (50 µg/mL) içeren tuzsuz LB besiyerine, 500 µL aktif kültür ilave edildi ve karıştırıldı. Hem katı hem de sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılan örnekler, 20 ºC'de 8 günlük inkübasyon sonucunda, 366 nm UV ışık altında (Biometra TI 2, USA) Petri plakalarının ve cam tüplerin görüntüleri alındı. Tüm deneyler için deneme deseni 2 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde oluşturuldu (Vestby vd. 2009).

3.2.9 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının pelikül oluşturma özellikleri

S. Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşları, sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma özelliklerine göre incelendi. *Salmonella* suşları, 18 saat 37 ºC'de 200 rpm'de geliştirildi. Aktif kültürlerden 500 µL alınarak 4500 µL tuzsuz LB besiyeri bulunan deney tüplerine inoküle edildi. 20 ºC statik inkübatörde 8 günlük inkübasyon sonucunda tüplerin fotoğrafı çekildi. Sonuçlar, sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumu ve bu pelikülün parçalanma miktarına göre değerlendirildi. Pelikül, çok kolay parçalanıyorsa kırılgan,

parçalanmıyor ya da az parçalanıyorsa rijit olarak sınıflandırıldı (Römling vd. 2000, Solano vd. 2002).

3.2.10 Caco-2 ve HEp-2 hücrelerine bakteriyel aderansın belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin Caco-2 ve Hep-2 hücrelerine adezyonu, Hancox ve arkadaşları (1997) tarafından önerilen yöntem kullanılarak araştırıldı. 6 kuyulu kültür plakalarında geliştirilen Caco-2 ve Hep-2 hücre hattı tek tabakaları (monolayers) PBS kullanılarak 3 kez yıkandıktan sonra, 10^9 CFU/mL konsantrasyonundaki bakteri kültürleri 1:1000 oranında seyreltilerek ökaryotik hücreler üzerine aktarıldı ve bu ortamlar % 5 CO_2 koşulunda, 37 ºC'de statik inkübatörde 30 dakika, 60 dakika ve 90 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde, adsorbe edilmiş bakteri kültürlerinin ortamdan uzaklaştırılması için PBS ile yıkama yapıldı ve her bir plakanın her bir kuyucuğuna 1 mL Tween-80 ilave edilerek, 30 dakikalık bir inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde, kuyucuklardaki bakteri süspansiyonları, önceden sterilize edilmiş olan tüpler içerisinde 10^{-7} düzeyine kadar dilüe edildi ve LB agar üzerine ekim gerçekleştirildi. 37 ºC statik inkübatörde 18 saatlik inkübasyon sonunda, Caco-2 ve Hep-2 hücrelerine tutunan bakteriler koloni sayımı yapılarak belirlendi. Deneyler 3 biyolojik paralel halinde gerçekleştirildi.

Caco-2 ve Hep-2 hücreleri için test edilen bakterilerin tutunması ve kolonizasyonu, konfokal lazer mikroskopisi (Zeiss lsm 510, Germany) ile görüntülendi. Bu amaçla, yeşil floresan protein ekspresyonu sağlayan pET28aGFP plazmidi, *fimF* mutant suşuna aktarıldı. Akış odalarına alınan Caco-2 ve Hep-2 hücreleri 1µM cell tracker orange (CMTMR, Invitrogen, C2927) ile boyandı. CLSM görüntüleri Bilkent UNAM tesisinde çekildi.

3.2.11 Dam ve FimF proteinlerinin 3 boyutlu yapı analizi

S. Typhimurium ATCC 14028 suşuna ait olan 278 amino asit dizisine sahip DNA metiltransferaz (Dam) proteini ve 172 amino asit dizisine sahip fimbriyal-benzeri protein

F (FimF)'nin NCBI veri tabanından alınan FASTA sekansları, Phyre2 veri tabanına yüklendi. Phyre2 veri tabanından gelen sonuca göre proteinlerin 3 boyutlu yapı görüntüsü çizildi (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7).

3.2.12 İstatistiki analizler

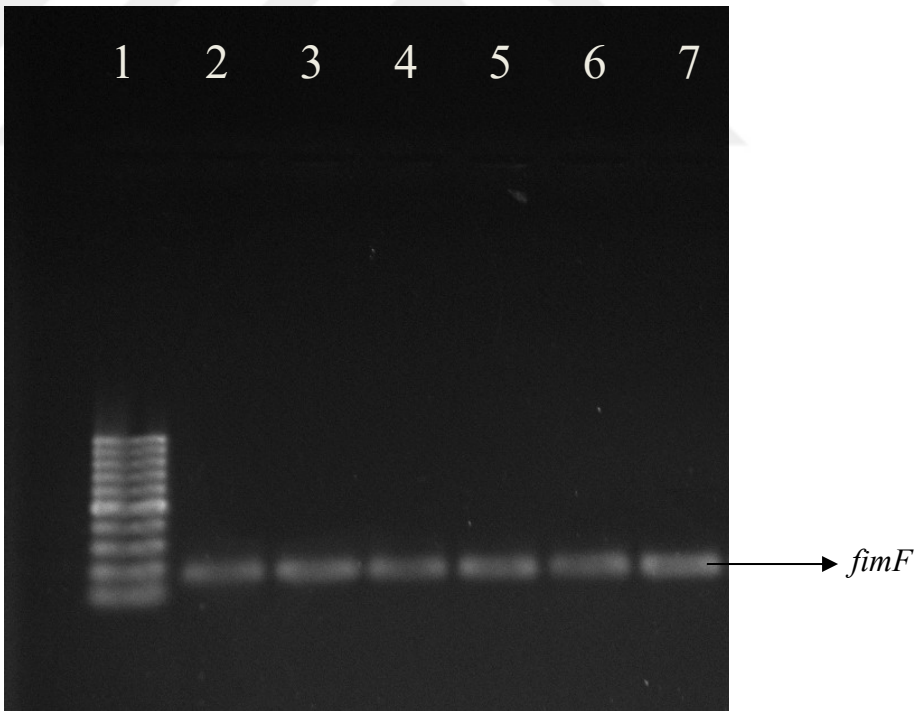
Bu çalışmadan elde edilen veriler için gerekli istatistiki analizlerin gerçekleştirilmesi amacı ile GraphPad Prism 8 Software kullanıldı. Deney grupları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde, 'F' değeri esas alındı ve tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Gruplar arası varyasyonlar, Tukey doğruluk testinden yararlanılarak değerlendirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Suşuna Ait *fimF* Geninin N Terminal Domaininin pBAD24 Vektörüne Klonlanması ve Rekombinant Vektörüne Aktarımı

4.1.1 *S.* Typhimurium ATCC 14028 suşunda *fimF* geninin çoğaltılması

519 bç büyüklüğüne sahip *fimF* geni N terminal bölgesi; bu bölgeye spesifik olacak şekilde tasarlanan geri primer 5'-GATGTCGACCAACGTCGATTGCCACT-3' ve ileri primer 5'-TGACTGCAGTCAGGAAGGTCGCATCC-3' çiftleri ile, *S.* Typhimurium ATCC 14028 kromozomu üzerinde çoğaltıldı. Bu çoğaltma reaksiyonu sonrasında, 151 baz çifti (bç) ürün agaroz jel sistemlerinde tanımlandı (Şekil 4.1).

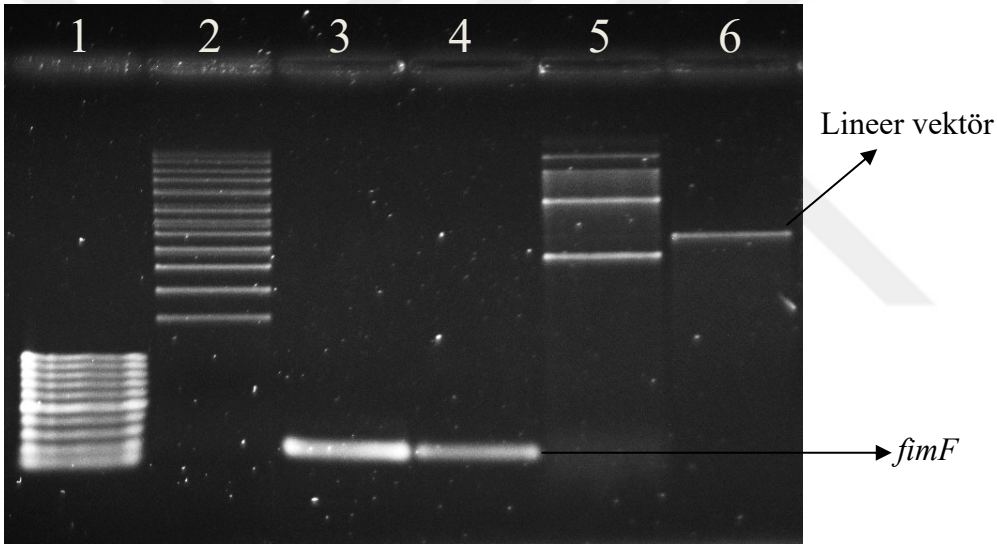


Şekil 4.1 *fimF* geni N terminal bölgesi PZR ürünü

Kuyu 1 100 bç DNA marker (#SM0241, Fermentas, USA)
Kuyu 2-7 *fimF* geni PZR ürünleri

4.1.2 Klonlamada kullanılacak fragmentlerde yapışkan uç oluşturma

Klonlama işleminde etkin yapışkan uçların elde edilmesi amacı ile, halkasal saf pBAD24 plazmid vektörü ve saf *fimF* geni PZR ürünü, *Sal*I ve *Pst*I enzimleri kullanılarak kesildi. pBAD24 plazmid vektörünün klonlama bölgesinde, *Sal*I ve *Pst*I spesifik tanıma sekansları arasında sadece 10 baz çifti bir mesafe mevcuttur. Bu nedenle kesim reaksiyonları sonucunda oluşan düzlemsel plazmidin boyutu, yaklaşık 4542 bç olarak saptandı. Aynı işleme tabi tutulan *fimF* N terminal bölge PZR ürünü de uç bölgelerinde enzim tanıma sekansları içerdiğinden, büyüklük kaybına uğramamıştır. Dolayısı ile kesim sonrası elde edilen ürün, yaklaşık 151 bç olarak tanımlandı (Şekil 4.2).

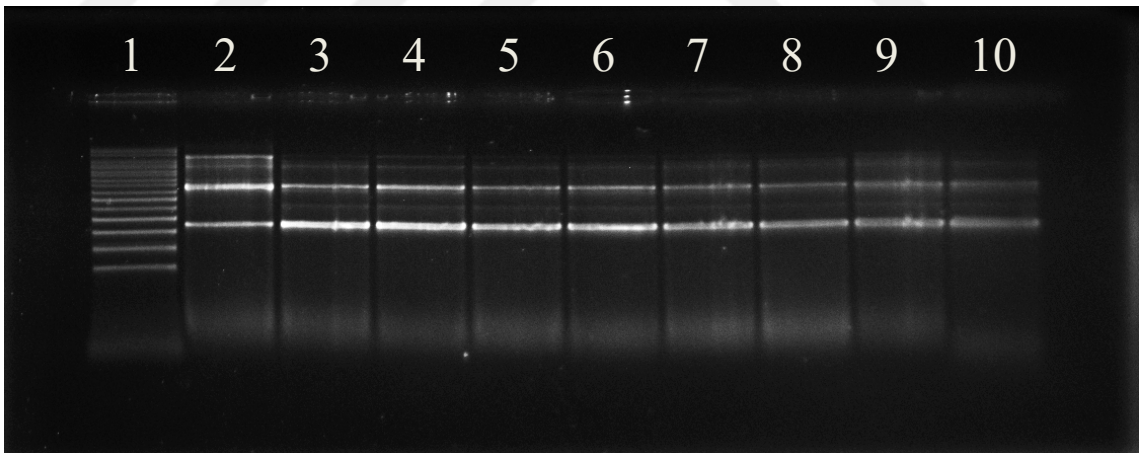


Şekil 4.2 pBAD24 plazmid vektörü ve *fimF* geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi

Kuyu 1 100 bç DNA marker (#SM0241, Fermentas, USA)
Kuyu 2 Supercoiled marker (#D5292, SIGMA, Germany)
Kuyu 3 *fimF* geni
Kuyu 4 *fimF* geninin *PstI* ve *SalI* enzimleri ile kesimi
Kuyu 5 pBAD24 plazmid vektörü
Kuyu 6 pBAD24 plazmid vektörünün *PstI* ve *SalI* enzimleri ile kesimi

4.1.3 DNA bağlama reaksiyonu (Ligasyon)

Enzimatik kesime tabi tutularak oluşturulan pBAD24 plazmid vektörü ve *fimF* geni fragmentlerinin ligasyonunda T4 ligaz enzimi kullanıldı. Ligasyon denemesi, insert gen molar konsantrasyonu 3 ve vektör molar konsantrasyonu 1 (3i/1v), insert gen molar konsantrasyonu 1 ve vektör molar konsantrasyonu 3 (1i/3v), insert gen molar konsantrasyonu 1 ve vektör molar konsantrasyonu 1 (1i/1v) olarak gerçekleştirildi. Tüm ligasyon ortamları agaroz jellere yüklendi ve insert içermeyen plazmid kontrol de uygulanan jellerde yürütüldü. Ancak pBAD24 vektörünün 151 bç büyüklükteki inserte (*fimF*) bağlanarak 4693 bç büyüklükte yeni bir rekombinant plazmid oluşturduğu insertin çok küçük olması nedeniyle agaroz jel sistemlerinde tanımlanamadı (Şekil 4.3). Bunun üzerine söz konusu jellerden saflaştırılan pBAD24+insert içerdiği varsayılan plazmidler üzerinde inserte özgü primerler kullanılarak tanımlayıcı PZR denemeleri gerçekleştirildi. Bu deneme sonucunda insert tanımlanan rekombinant vektörlerle çalışmaya devam edildi.

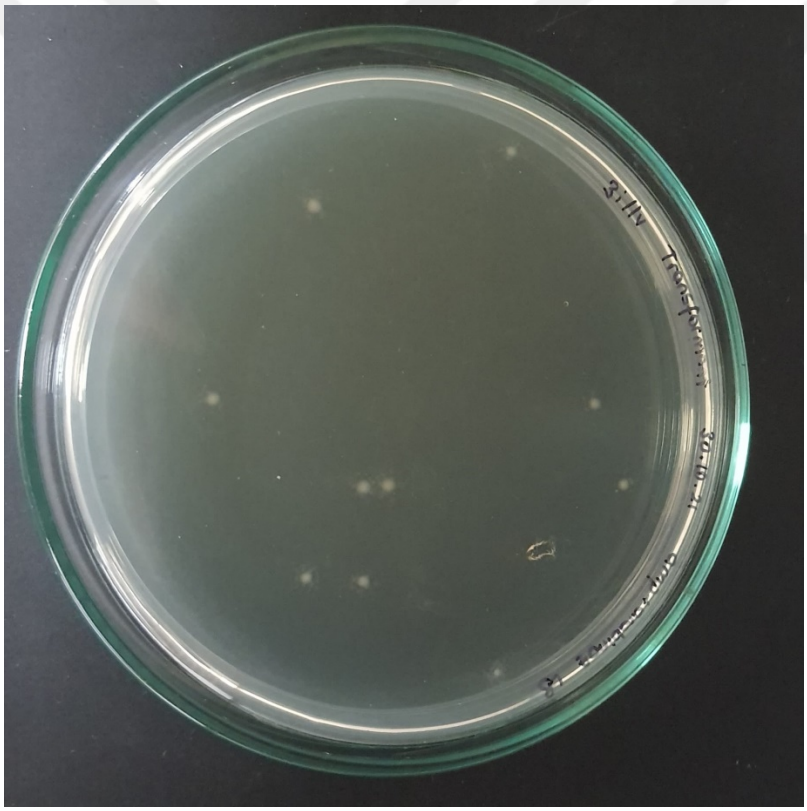


Şekil 4.3 Rekombinasyon ürünleri

Kuyu 1	Supercoiled marker (#D5292, SIGMA, Germany)
Kuyu 2	pBAD24 plazmid vektörü
Kuyu 3	Kontrol Ligasyon Denemesi
Kuyu 4-8	3i/1v transformant ürünü
Kuyu 9-10	1i/3v transformant ürünü

4.1.4 Genetik aktarım (Elektroporasyon)

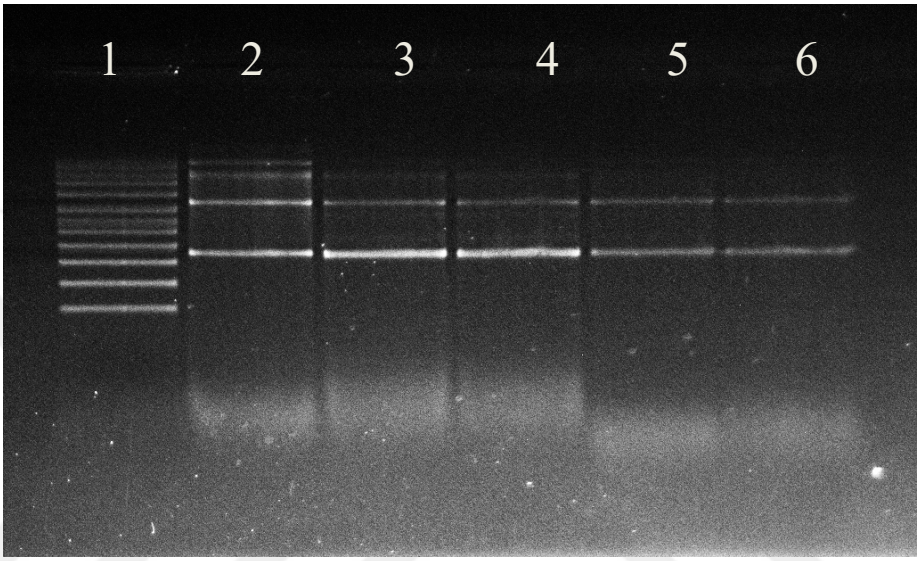
Oluşturulan rekombinant vektör, 3.2.1.7 başlığı altında verilen koşullar sağlanarak elektrokompotent *E. coli* BL21 suşuna aktarıldı. Bu denemelerde kullanılan pBAD24 plazmid vektörü amfisilin (100 µg/mL) dirençlilik gen kasetine sahip olduğu ve arabinoz promotorundan transkribe edildiği için, seçici besiyeri olarak amfisilin (100 µg/mL) ve arabinoz (% 0,01) ihtiva eden LB agar kullanıldı. Elektroporasyon işlemi sonrasında, plazmidi olmayan BL21 suşunun amfisilin antibiyotiğini içeren ortamda üremesi, vektör plazmidin genetik aktarımının gerçekleştiğini kanıtlamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *Escherichia coli* BL21 suşuna *fimF* geninin N terminal domaininin aktarıldığı pBAD24 vektör plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamında gelişimi

4.1.5 Elektrotransformantlardan plazmid izolasyonu

Elekrotransformasyon sonrasında, rejenerasyon ortamlarında iyi gelişen koloniler rastgele bir şekilde seçildi ve plazmid izolasyonuna tabi tutularak, rekombinant plazmidi içeren koloniler belirlendi (Şekil 4.5).

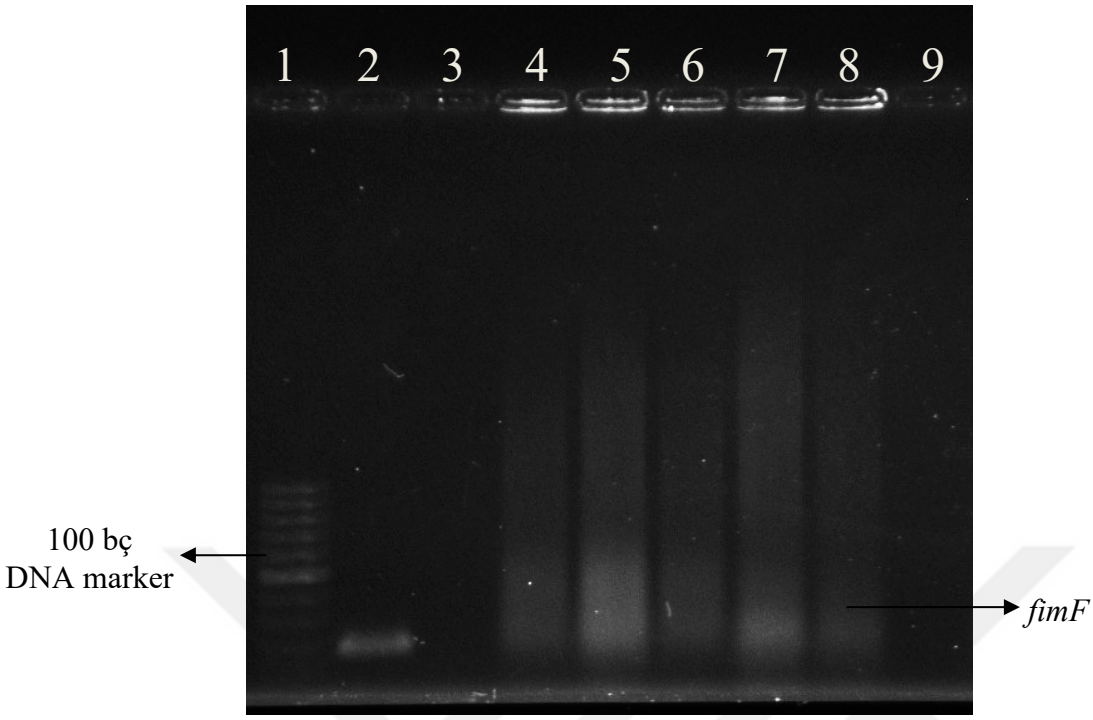


Şekil 4.5 Seçilen BL21 kolonilerinin plazmid içeriği

Kuyu 1 Supercoiled marker (#D5292, SIGMA, Germany)
Kuyu 2 pBAD24 plazmid vektörü
Kuyu 3-6 $BL21^{Rc}$ suşlarının pBAD24 plazmid DNA'sı

4.1.6 İnsert genin doğrulanması

Yukarıda anlatılan şekilde rekombinant plazmidin taşıdığı fenotipik kriterlere göre seçilen ve agaroz jel sistemlerinde tanımlanan vektörün, klonlanan *fimF* gen bölgesini (N terminal bölge) içerip içermediği, bu bölgeye özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucu ile saptandı. Denemelerde 14028 suşunun kromozomal DNA'sı pozitif kontrol, nükleaz içermeyen su ise negatif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 4.6).

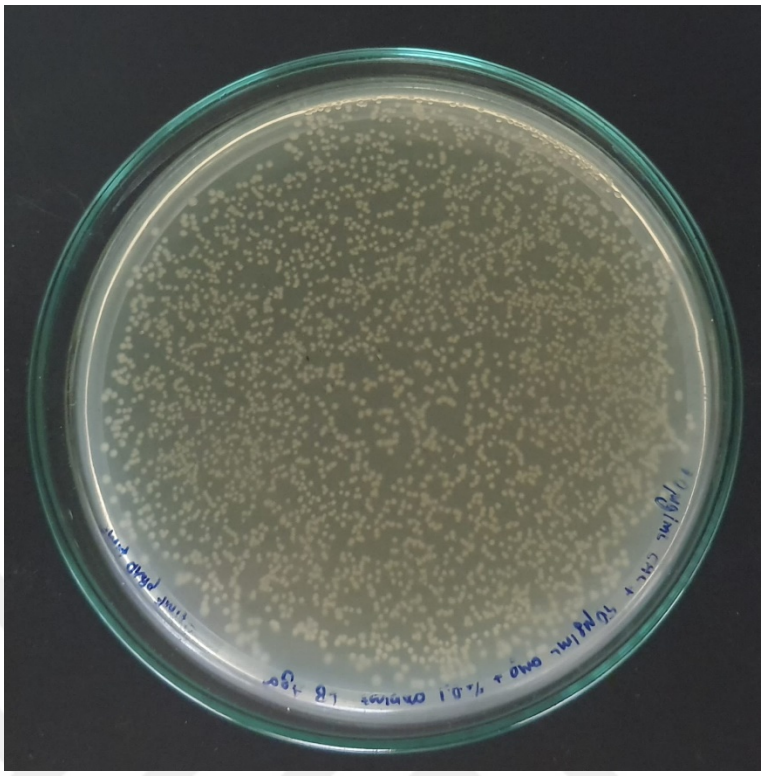


Şekil 4.6 Seçilen BL21 Rekombinat vektör üzerinde çoğaltılan *fimF* geni N terminal bölgesi

Kuyu 1	100 bç DNA marker (#SM0241, Fermentas, USA)
Kuyu 2	*S.* Typhimurium ATCC 14028 suşunun genomik DNA'sından PZR ile çoğaltılan *fimF* geni (pozitif kontrol)
Kuyu 3	BL21 suşunun plazmid plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan *fimF* geni (negatif kontrol)
Kuyu 4-8	$BL21^{Rc}$ suşlarının pBAD24 plazmid DNA'sından koloni PZR ile çoğaltılan *fimF* geni
Kuyu 9	PZR negatif kontrol (Nükleazsız su)

4.1.7 Rekombinant plazmidlerin *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* hücrelerine aktarımı

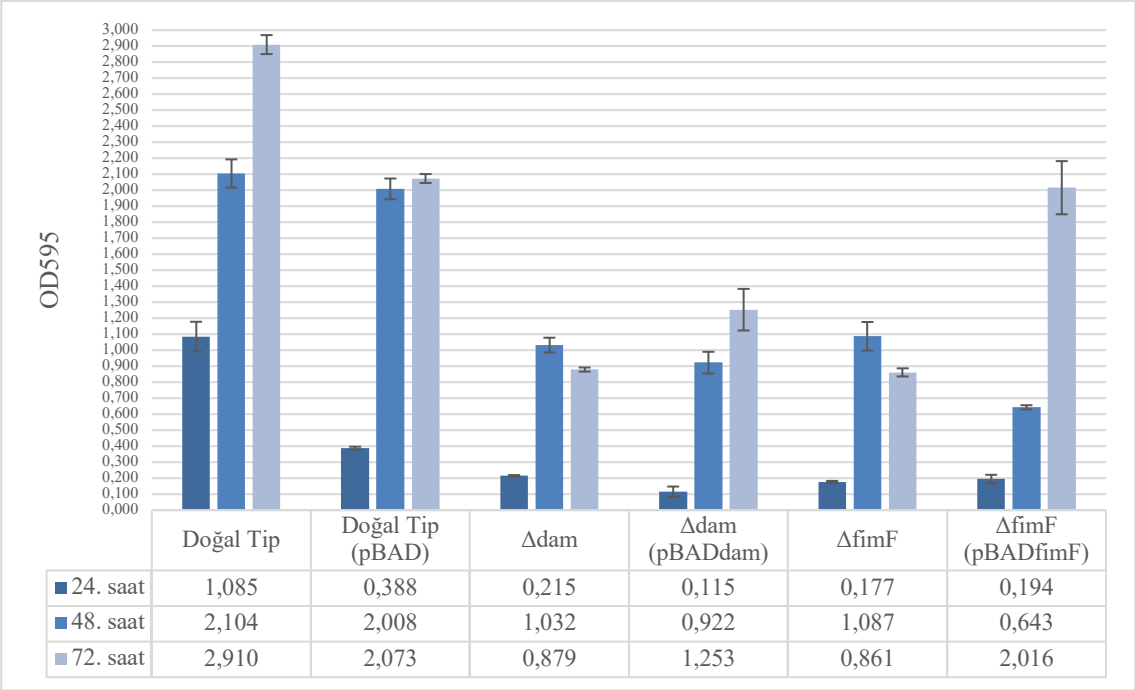
E. coli BL21 kültürlerinden saflaştırılan rekombinant plazmid vektör, *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* suşuna eletroporasyon yöntemi ile transfer edildi. Elektroporasyon işlemi sonrasında bu plazmidi içermeyen 14028 suşunun amfisilin (50 µg/mL), kloramfenikol (10 µg/mL) ve arabinoz (% 0,01) ihtiva eden ortamda üremesi, vektörel aktarımın gerçekleştiğinin kanıtı olarak görülmüş ve söz konusu koloniler seçilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 *S*. Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* elektrotransformantlarının antibiyotik dirençlilik kriterine göre üreme ortamında seçimi

4.2 Polistiren Yüzeyde Doğal Tip ve Mutant Suşların Biyofilm Denemesi

S. Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturma kabiliyetleri incelendiğinde; boş pBAD vektörünün aktarımı halinde bu suşta biyofilm üretme yeteneğinin doğal tip suşa oranla 24., 48. ve 72. saatte sırasıyla % 64,24, % 4,563 ve % 28,76 oranında daha düşük biyofilm oluşumunun gerçekleştiği belirlendi. Aynı zaman dilimleri ile yürütülen biyofilm denemelerinde *S*. Typhimurium ATCC 14028 Δ*dam* suşunda % 80,18, % 50,95 ve % 69,79; *S*. Typhimurium ATCC 14028 Δ*dam* (pBAD*dam*) suşunda % 89,40, % 56,18 ve % 56,94; *S*. Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* suşunda % 83,69, % 48,34 ve % 70,41 ve *S*. Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF* (pBAD*fimF*) suşunda ise % 82,12, % 69,44 ve % 30,72 oranlarında düşüşler belirlendi (Şekil 4.8).

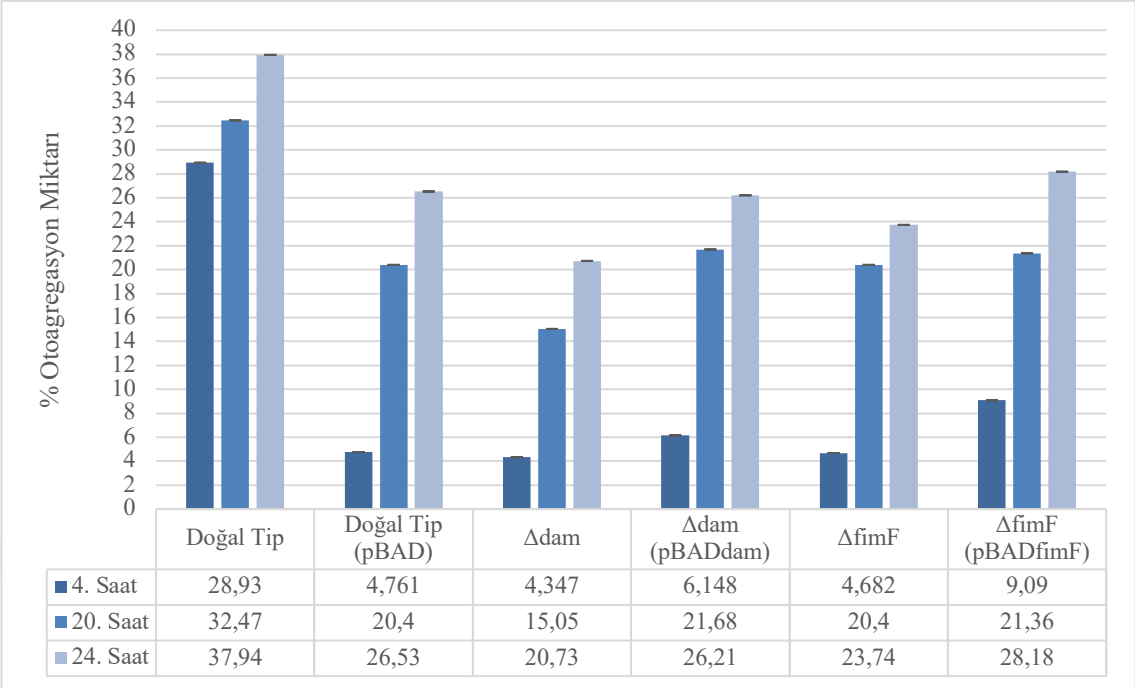


	Doğal Tip	Doğal Tip (pBAD)	Δdam	Δdam (pBADdam)	ΔfimF	ΔfimF (pBADfimF)
24. saat	1,085	0,388	0,215	0,115	0,177	0,194
48. saat	2,104	2,008	1,032	0,922	1,087	0,643
72. saat	2,910	2,073	0,879	1,253	0,861	2,016

Şekil 4.8 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının polistiren yüzeylerde biyofilm üretim karakteristikleri

4.3 Bakteriyel Hücre Agregasyonunun Belirlenmesi

Otoagregasyon denemeleri, farklı zaman aralıklarında oluşturulan agregatların optik yoğunlukları (OD_{600}) belirlenmek suretiyle gerçekleştirildi. *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşta otoagregasyon miktarları 4., 20. ve 24. saatte başlangıç zamanına oranla sırasıyla % 28,93, % 32,47 ve % 37,94 oranında artış gösterdi. Bu oranlar: *S.* Typhimurium doğal tip (pBAD) suşunda 4., 20. ve 24. saatte başlangıca oranla sırasıyla % 4,76, % 20,4 ve % 26,53; *S.* Typhimurium Δ*dam* mutant suşunda % 4,34, % 15,05 ve % 20,73; *S.* Typhimurium Δ*dam* (pBADdam) suşunda % 6,14, % 21,68 ve % 26,2; *S.* Typhimurium Δ*fimF* mutant suşunda % 4,68, % 20,4 ve % 23,74 ve *S.* Typhimurium Δ*fimF* (pBAD*fimF*) mutant suşunda ise % 9,09, % 21,36 ve % 28,18 oranında artışlar olarak belirlendi (Şekil 4.9).



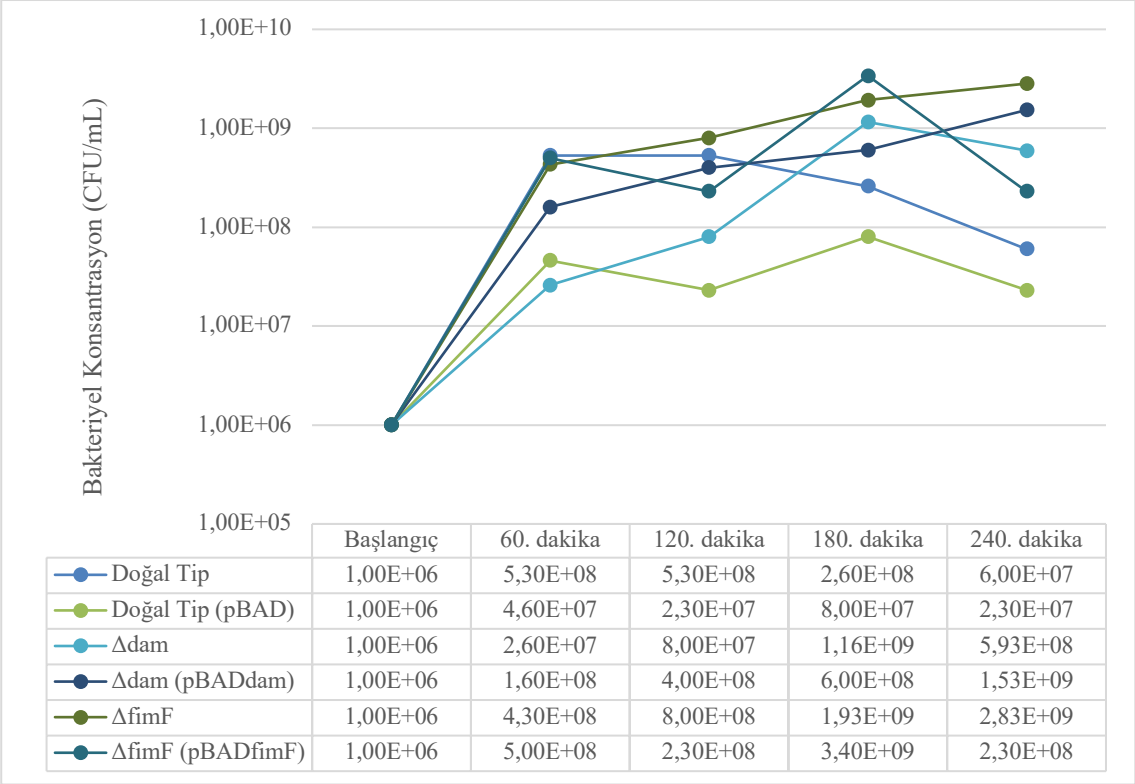
	Doğal Tip	Doğal Tip (pBAD)	Δdam	Δdam (pBADdam)	ΔfimF	ΔfimF (pBADfimF)
4. Saat	28,93	4,761	4,347	6,148	4,682	9,09
20. Saat	32,47	20,4	15,05	21,68	20,4	21,36
24. Saat	37,94	26,53	20,73	26,21	23,74	28,18

Şekil 4.9 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının yüzde otoagregasyon karakteristikleri

4.4 Oksidatif Stres Koşullarına Bakterilerin Direncinin Belirlenmesi

S. Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığındaki bakteriyel üreme miktarları değerlendirildi. Doğal tip suşunun hidrojen peroksit varlığındaki bakteriyel üreme miktarı 60. dakikada başlangıçtaki $1x10^6$ hücreden, $5,3x10^8$ hücreye yükseldi. 120. dakikadaki ölçüm zamanına dek bakteriyel üreme miktarı $5,3x10^8$ hücrede sabit kaldı. 180. dakikadaki bakteriyel üreme miktarı $2,6x10^8$ hücre ve 240. dakikadaki bakteriyel üreme miktarı $6x10^7$ hücre arttı. Doğal tip suş referans alınarak, tamamlama ve mutant suşlarının hidrojen peroksit ihtiva eden ortamdaki bakteriyel üreme miktarlarının yüzde değerleri belirlendi. Doğal tip (pBAD) suşunun hidrojen peroksit varlığındaki bakteriyel üreme miktarı 60., 120., 180. ve 240. dakikada sırasıyla % 91,32, % 95,66, % 69,23 ve % 61,67 oranında azaldı. Δ*dam* suşunun hidrojen peroksit varlığındaki bakteriyel üreme miktarı 60. ve 120 dakikada sırasıyla % 95,09 ve % 84,91 oranında azalma gösterirken, 180. ve 240. dakikalarda bakteriyel üreme miktarında sırasıyla % 346,2 ve % 888,3 oranında artış gösterdi. Δ*dam* (pBAD*dam*)

tamamlama suşunun 60. ve 120. dakikadaki hidrojen peroksit varlığındaki bakteriyel üreme miktarı sırasıyla % 69,81 ve % 24,53 oranında azalırken, 180. ve 240. dakikadaki bakteriyel üreme miktarı ise sırasıyla % 130,8 ve % 2450 oranında arttı. Δ*fimF* suşunun 60. dakikadaki hidrojen peroksit varlığındaki bakteriyel üreme miktarı % 18,87 oranında azalırken, 120., 180. ve 240. dakikadaki hidrojen peroksit varlığındaki bakteriyel üreme miktarı sırasıyla % 50,94, % 642,3 ve % 4617 oranında arttı. Δ*fimF* (pBAD*fimF*) suşunun hidrojen peroksit varlığında 60. ve 120. dakikadaki bakteriyel üreme miktarında sırasıyla % 36,11 ve % 5,66 oranında azalma saptanırken, 180. ve 240. dakikada sırasıyla % 1207 ve % 283,3 oranında artış olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

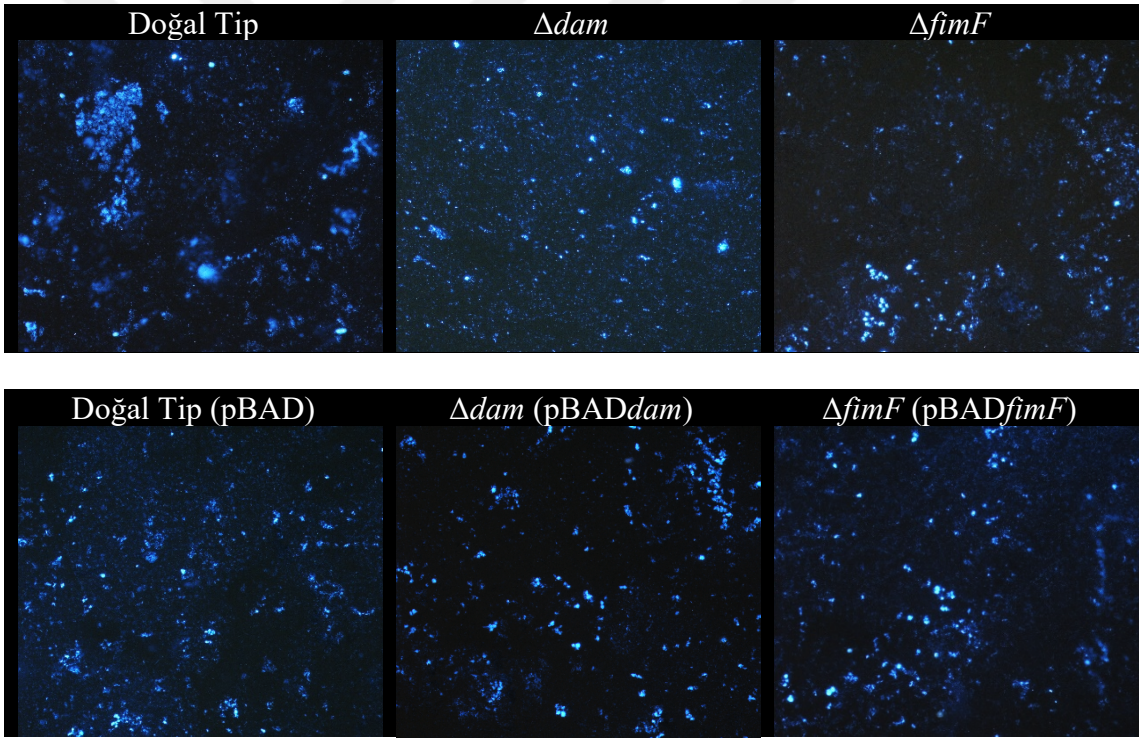


	Başlangıç	60. dakika	120. dakika	180. dakika	240. dakika
Doğal Tip	1,00E+06	5,30E+08	5,30E+08	2,60E+08	6,00E+07
Doğal Tip (pBAD)	1,00E+06	4,60E+07	2,30E+07	8,00E+07	2,30E+07
Δdam	1,00E+06	2,60E+07	8,00E+07	1,16E+09	5,93E+08
Δdam (pBADdam)	1,00E+06	1,60E+08	4,00E+08	6,00E+08	1,53E+09
ΔfimF	1,00E+06	4,30E+08	8,00E+08	1,93E+09	2,83E+09
ΔfimF (pBADfimF)	1,00E+06	5,00E+08	2,30E+08	3,40E+09	2,30E+08

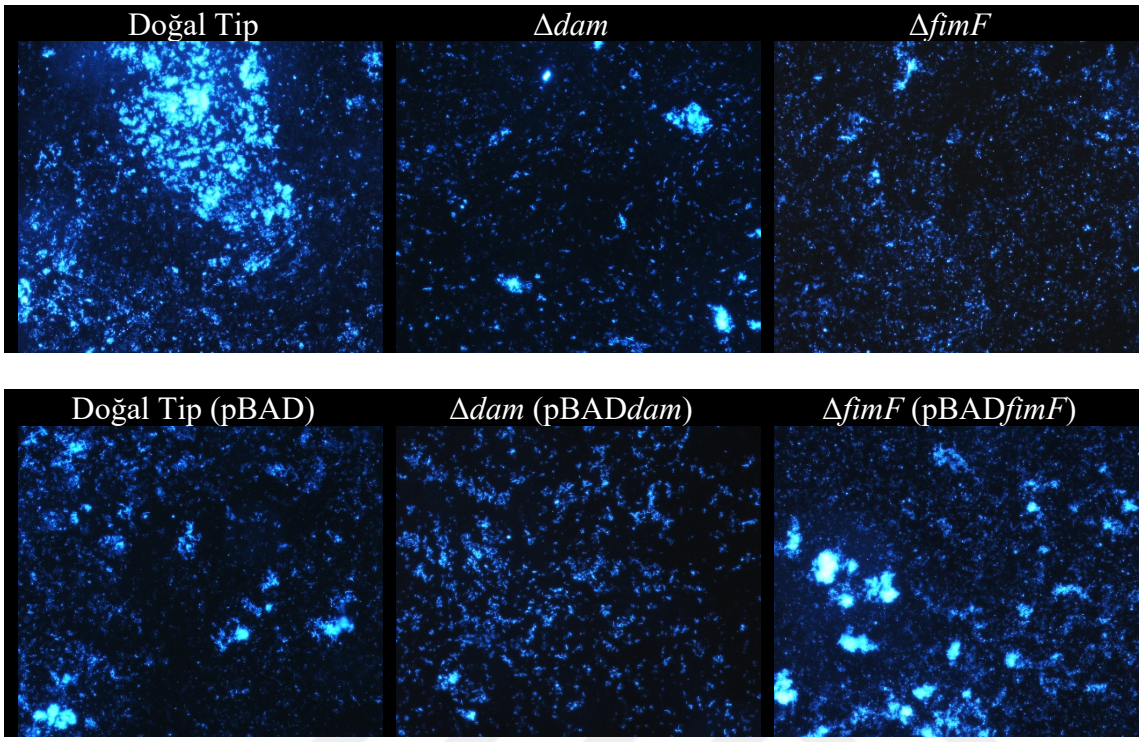
Şekil 4.10 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının 4mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ihtiva eden ortamda stres koşuluna verdikleri tepkilerin karakteristikleri

4.5 Cam Slaytlar Üzerinde Oluşturulan Biyofilm Yapılarının Selüloz İçeriğinin Tanımlanması

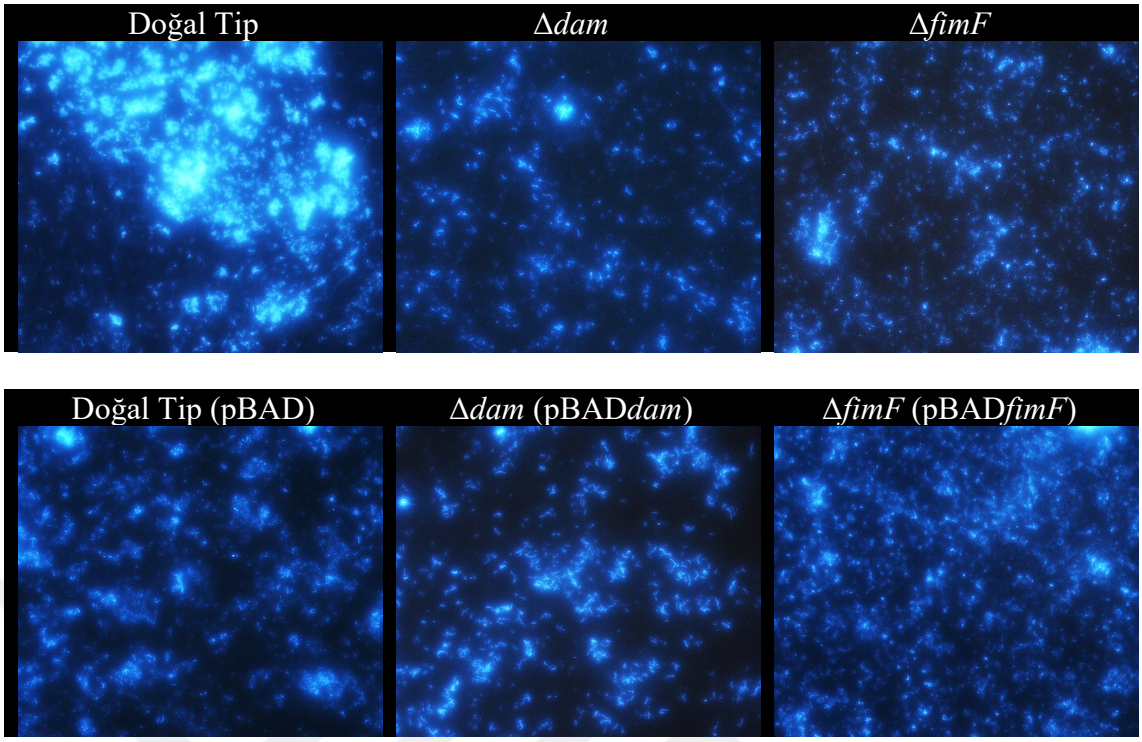
Kalkoflorlu tuzsuz LB besiyerinde, cam slaytlar üzerinde oluşturulan biyofilm yapılarının selüloz miktarlarının, kalkoflor ışıması esas alınarak tanımlanması amacıyla yapılan denemede, selüloz üretiminin en çok doğal tip suşta gerçekleştiği saptandı. Vektör ilavesi ile tekrar ifade edilmiş doğal tip (pBAD), Δ*dam* (pBAD*dam*) ve Δ*fimF* (pBAD*fimF*) suşlarında, doğal tip suştan çok az bir farklılık ile selüloz üretildiği belirlendi. Bu denemede, çalışılan tüm suşlarda selüloz üretiminin görüldüğü ancak *fimF* mutantında diğer suşlardan daha az miktarda selüloz üretildiği saptandı (Şekiller 4.11, 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.11 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu ve mutant suşlarının cam kuponlar üzerinde oluşturduğu pelikül yapısının kalkoflor bağlanma yeteneğinin 5x objektif altında floresan mikroskobu görüntüsü



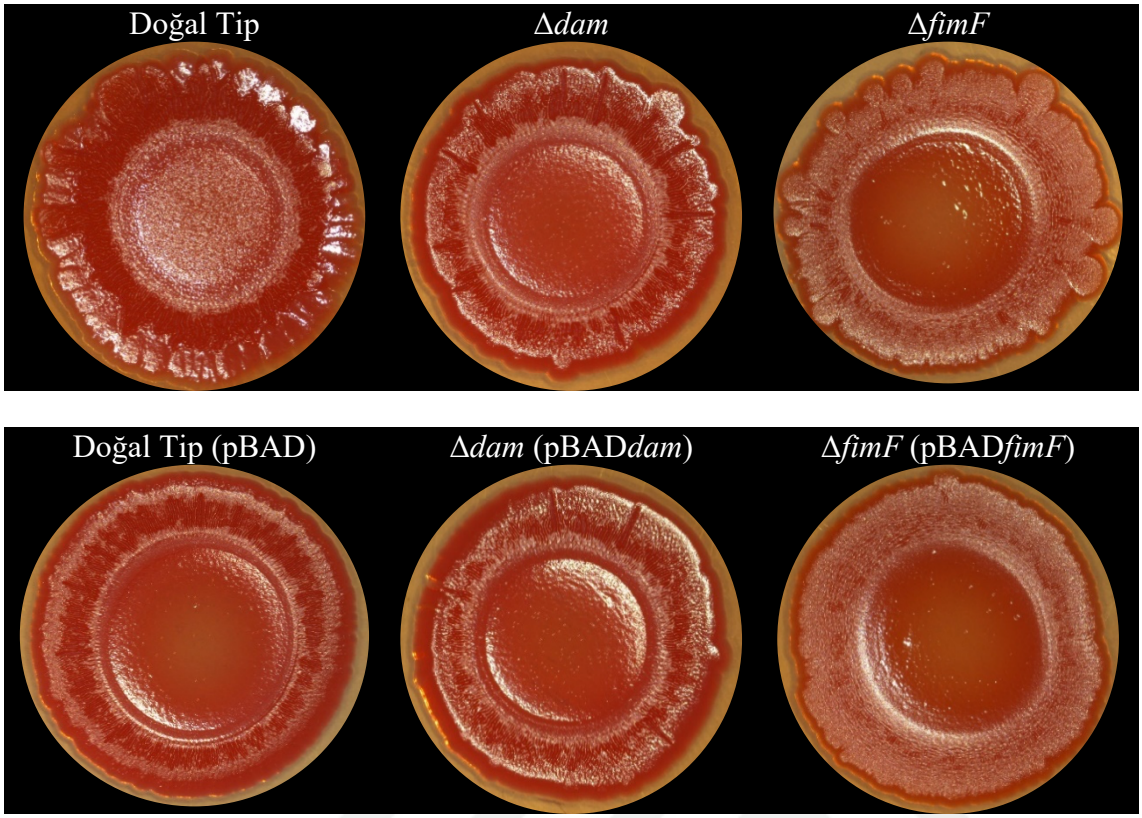
Şekil 4.12 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu ve mutant suşlarının cam kuponlar üzerinde oluşturduğu pelikül yapısının kalkoflor bağlanma yeteneğinin 20x objektif altında floresan mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.13 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suşu ve mutant suşlarının cam kuponlar üzerinde oluşturduğu pelikül yapısının kalkoflor bağlanma yeteneğinin 40x objektif altında floresan mikroskobu görüntüsü

4.6 Kongo Red İçeren LB^{-Nacl} Agar Besiyerinde Doğal Tip ve Onun Mutant Suşlarında Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

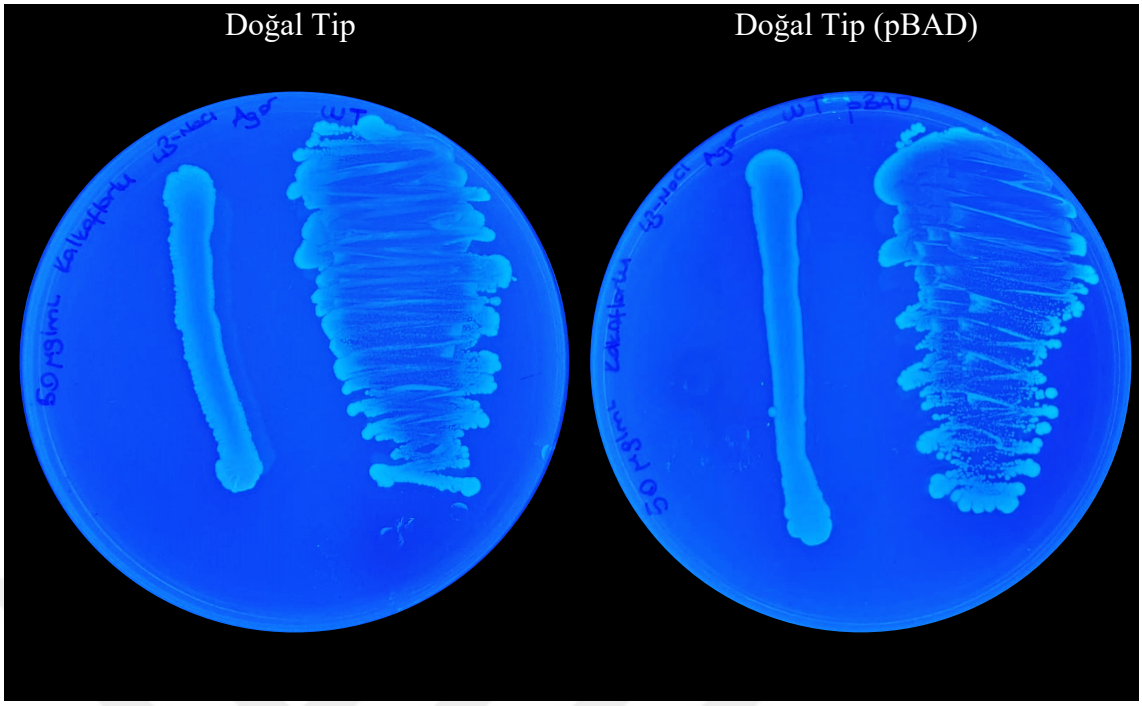
S. Typhimurium doğal tip ve mutant suşlarının Kongo red'li katı besiyerinde ürettiği biyofilm morfotipleri; biyofilm EPS yapısında ince agregatif fimbriya (kıvrımlı ya da curli fimbriya) ve selüloz bulunan 'rdar' (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran 'bdar' (kahverengi, kuru ve pürüzlü), sadece selüloz bulunan 'pdar' (pembe, kuru ve pürüzlü), ne kıvrımlı fimbriya ne de selüloz bulunan 'saw' (düz ve ıslak), şeklinde karakterize edilmiştir. *S.* Typhimurium doğal tip suşunun biyofilm morfotipi 'rdar', *S.* Typhimurium Δ*fimF* 'bdar', *S.* Typhimurium Δ*dam* tam 'rdar' morfotipi olmayan 'ara morfotip', *S.* Typhimurium doğal tip (pBAD) 'rdar', S. Typhimurium Δ*dam* (pBAD*dam*) 'rdar', *S.* Typhimurium Δ*fimF* (pBAD*fimF*) 'bdar' olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14).



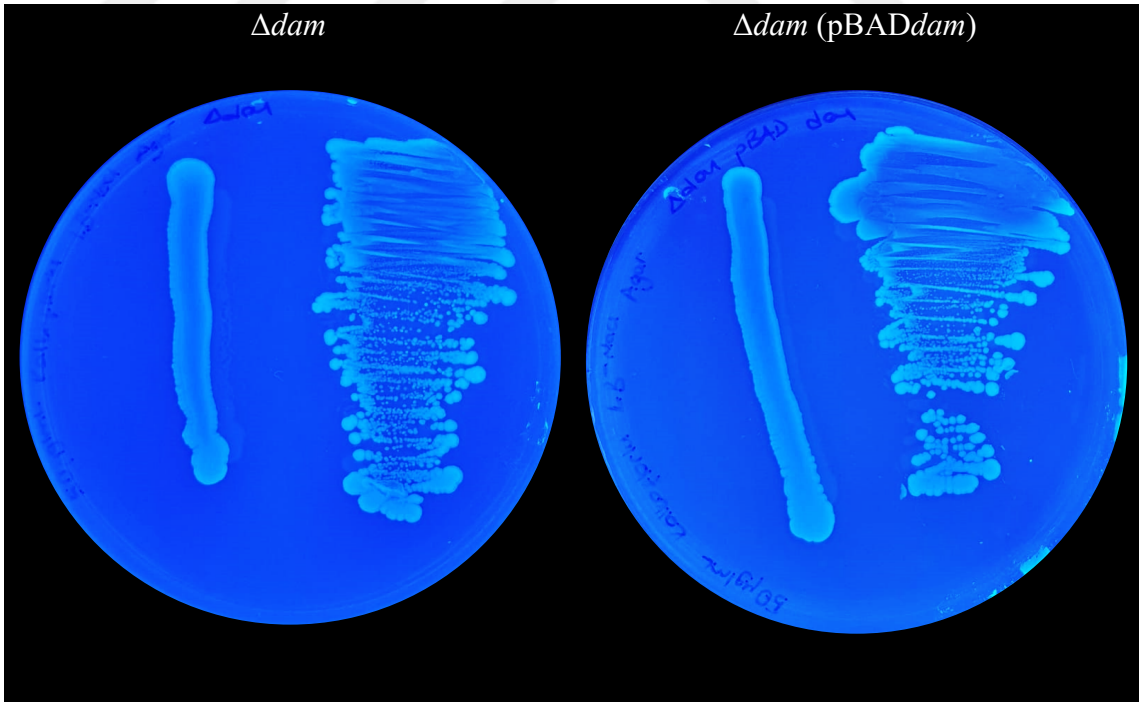
Şekil 4.14 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının kongo redli agar yüzeyde oluşturdukları biyofilm morfotiplerinin stereo mikroskop görüntüsü

4.7 Kalkoflor Bağlanma Denemesi

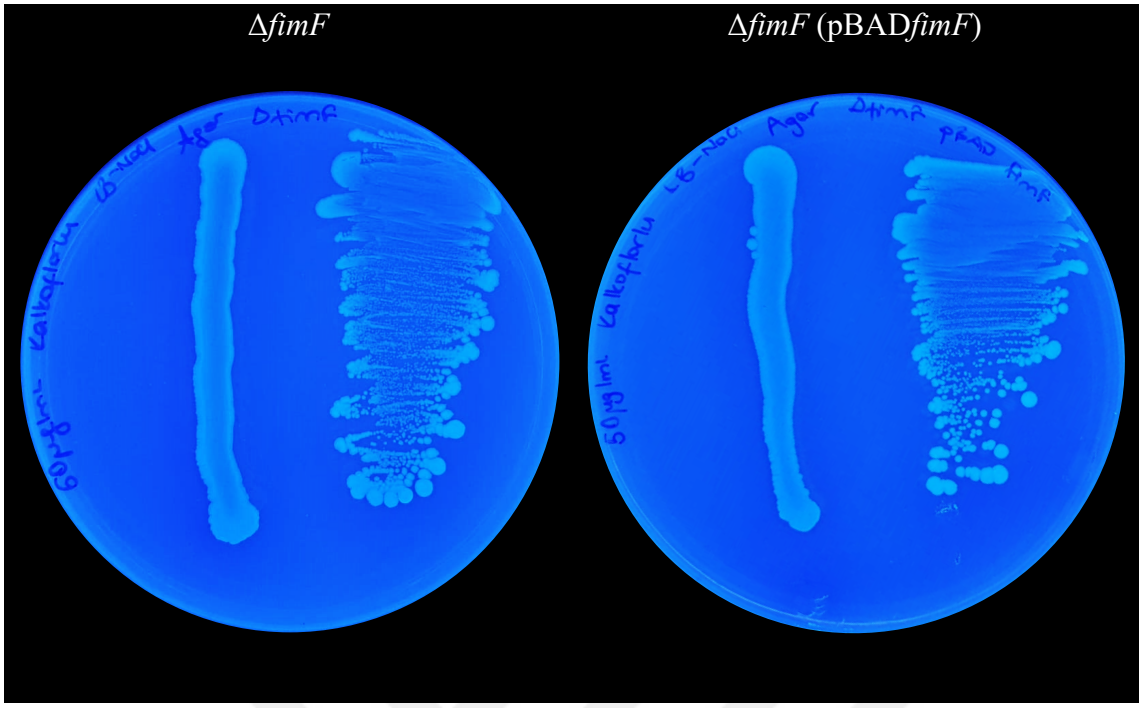
S. Typhimurium doğal tip ve mutant suşları, selüloz indikatörü olan kalkofloru içeren tuzsuz LB agar besiyerinde üretilmiştir. Selüloz üretiminin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen denemede, 366 nm UV ışık altında katı besiyerinde Petri plaklarında ve sıvı besiyerinde deney tiplerinde üreyen *S.* Typhimurium doğal suşu ve *dam* mutantı, selüloz üretiminden dolayı kuvvetli ışıma vermişlerdir. Tüm suşlar kendi aralarında ışıma kuvvetlerine göre kıyaslanacak olur ise doğal tip suş en yüksek ışımayı verirken en düşük ışıma veren suş *fimF* mutantı olmuştur (Şekiller 4.15, 4.16 ve 4.17).



Şekil 4.15 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve doğal tip pBAD suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin katı besiyerinde incelenmesi

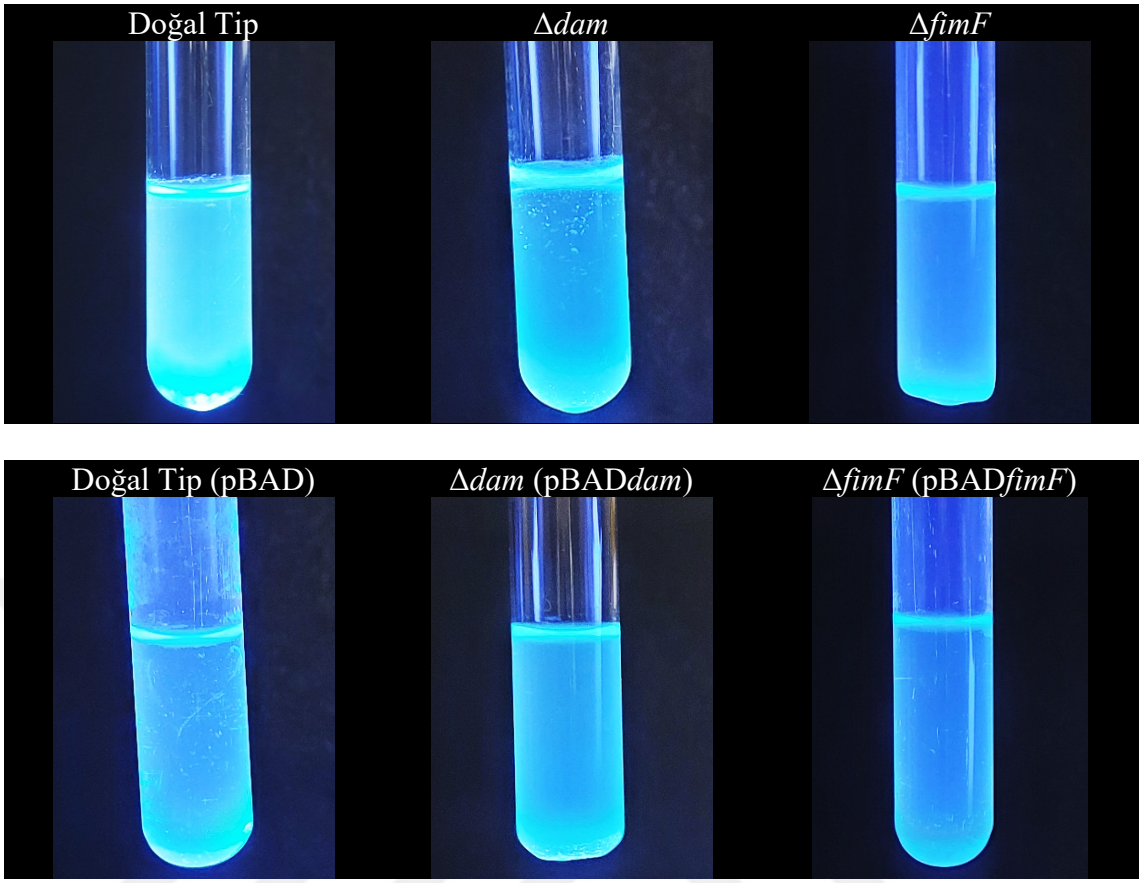


Şekil 4.16 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*dam* ve Δ*dam* (pBAD*dam*) suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin katı besiyerinde incelenmesi



Şekil 4.17 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Δ*fimF ve* Δ*fimF (*pBAD*fimF*) suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin katı besiyerinde incelenmesi

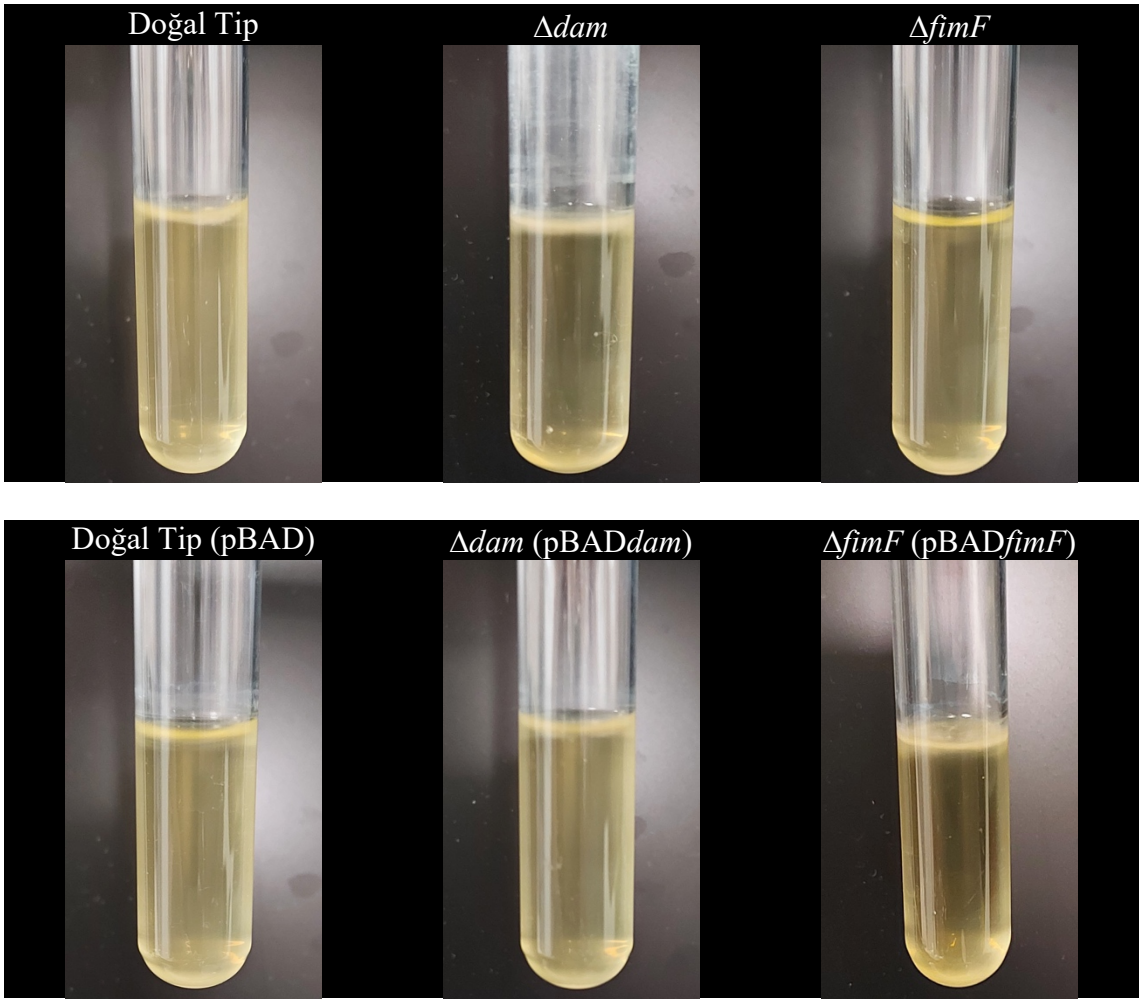
Kalkoflorlu tuzsuz LB sıvı besiyerinde incelenen *S.* Typhimurium doğal tip ve mutant suşlarının tamamının kuvvetli floresan ışıma verdiği ve dolayısıyla yüksek miktarda selüloz üretiminin varlığı saptanmıştır. Katı besiyeri ile yapılan denemede olduğu gibi, incelenen suşlardan yalnızca *fimF* mutantında diğer suşlara göre az miktarda ışıma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının UV ışık altında gösterdikleri floresan özelliğin sıvı besiyerinde incelenmesi

4.8 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Doğal Tip ve Mutant Suşlarının Pelikül Oluşturma Özellikleri

Selüloz üretimi arttıkça sıvı-hava ara fazında oluşturulan biyofilm yapıları (pelikül) sağlam fiziksel özelliklere sahiptir ve bu da pelikül yapılarını fiziksel dağıtıcı güçlere karşı stabil bir hale getirir. *S.* Typhimurium doğal tip ve mutant suşlarının incelendiği kongo red'li tuzsuz LB besiyerinde yapılan deneme sonucunda, 'rdar' morfotipe sahip olan doğal tip suşun rijit pelikül yapısına sahip olduğu ve 'bdar' morfotipe sağlam Δ*fimF* suşunun ise pelikül yapısı, çalkalama ve karıştırma gibi fiziksel etmenlere karşı kırılgan olduğu belirlenmiştir. Besiyerindeki turbitide değişimi, sıvı-hava ara fazında pelikül ve halka yapısının oluşması ve çalkalama ve karıştırma sonucunda pelikül yapısının dayanıklılığına göre yapılan gözlemler çizelge Şekil 4.19 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir.



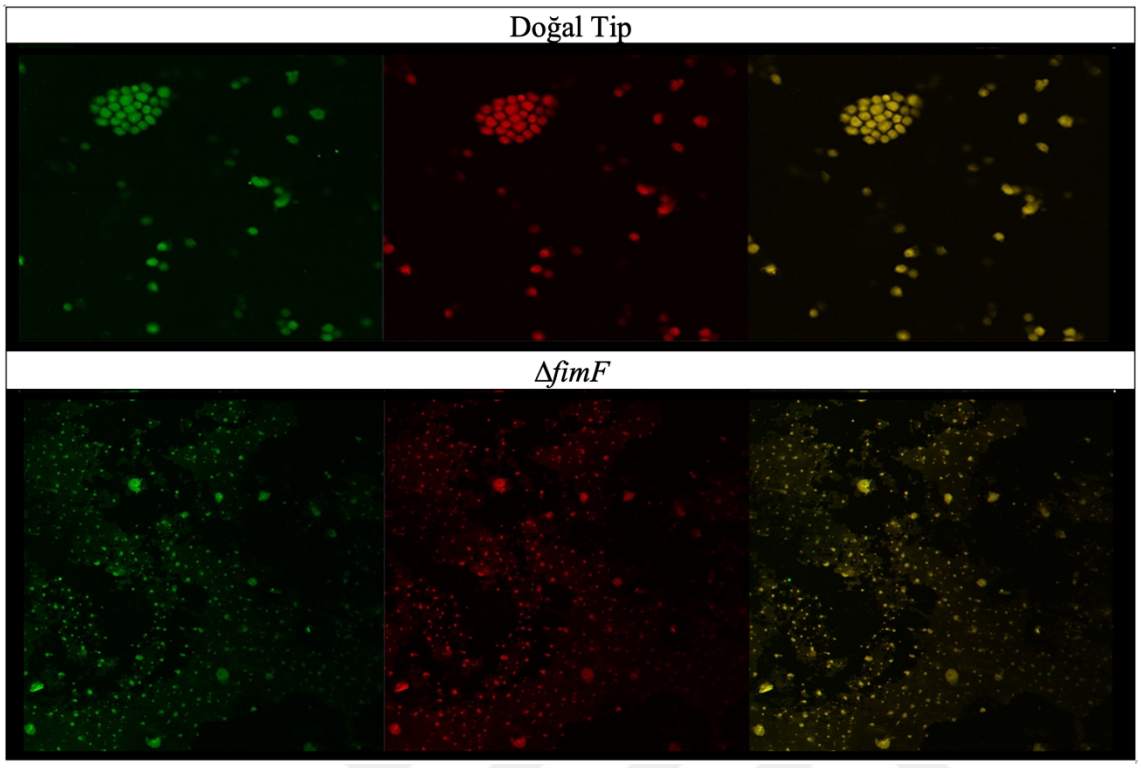
Şekil 4.19 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının tuzsuz LB besiyerinde pelikül oluşturma miktarları

Çizelge 4.1 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip ve mutant suşlarının oluşturduğu pelikül yapılarının özellikleri

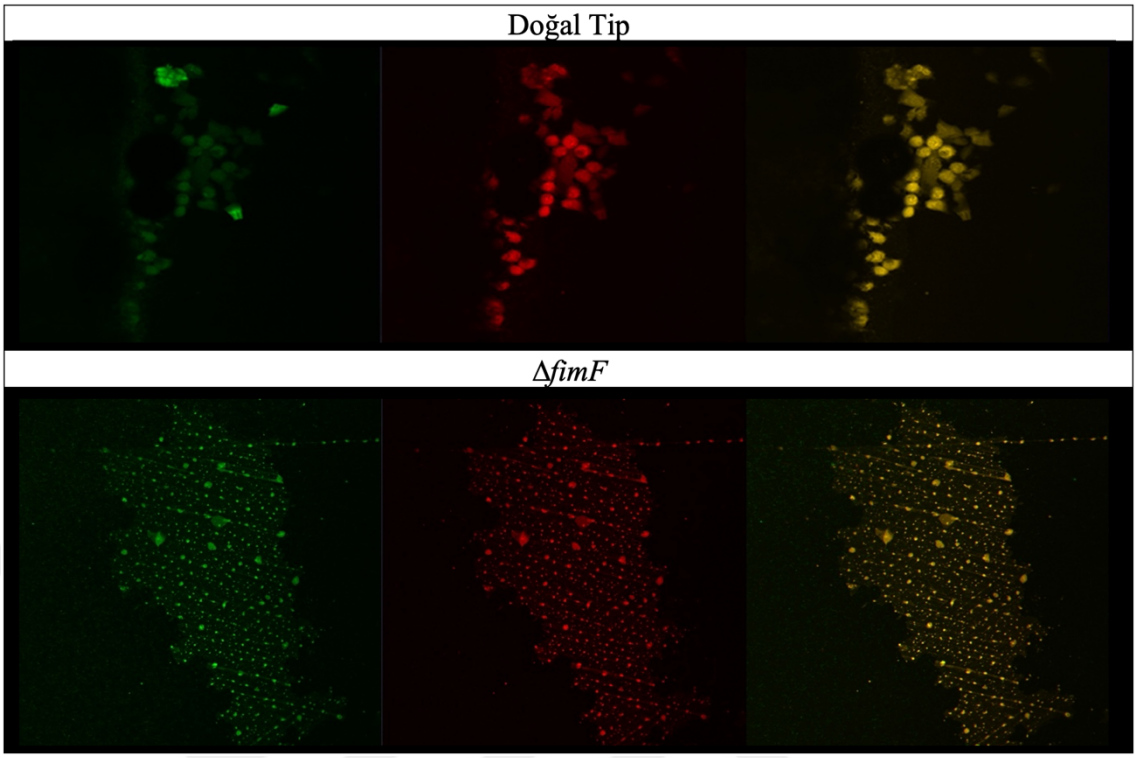
Bakteri Kültürleri	**Besiyerindeki turbitide (bulanıklık)**	**Sıvı-hava ara fazında oluşan pelikül yapısı**	**Sıvı-hava ara fazında oluşan halka yapısı**	**Pelikül yapısının dayanıklılığı**
Doğal Tip	Yoğun (+)	Var (Rijit)	Var	Var (+++)
Doğal Tip (pBAD)	Yoğun (+)	Var (Rijit)	Var	Var (+++)
Δ*dam*	Yoğun	Var (Kırılgan)	Var	Var (++)
Δ*dam* (pBAD*dam*)	Yoğun (+)	Var (Rijit)	Var	Var (+++)
Δ*fimF*	Yoğun	Var (Kırılgan +)	Az	Var (+)
Δ*fimF*(pBAD*fimF*)	Az	Var (Kırılgan +)	Var	Var (+)

4.9 *S.* Typhimurium ATCC 14028 Doğal Tip ve *fimf* Mutant Suşunda Caco-2 Ve HEp-2 Hücrelerine Bakteriyel Aderansın Değişimi

fimF mutantının ökaryotik hücre hatlarına tutunması, doğal tip suş ile karşılaştırmalı bir şekilde incelendiğinde; hem Caco-2 ve hem de Hep-2 hücre hatlarına tutunmanın önemli ölçüde düştüğü saptanmıştır (Şekiller 4.20 ve 4.21).



Şekil 4.20 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suş ve *fimF* mutantının Caco-2 hücrelerine aderansı



Şekil 4.21 *S.* Typhimurium ATCC 14028 doğal tip suş ve *fimF* mutantının HEp-2 hücrelerine aderansı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

S. Typhimurium'da mannoz duyarlı olarak karakterize edilen tip 1 fimbriyanın konak ökaryot hücrelere tutunmada önem taşıdığı çeşitli araştırma grupları tarafından saptanmıştır (Duguid ve Campbell 1969, Old ve Payne 1971, Nuccio ve Bäumler 2007). *S.* Typhimurium tip 1 fimbriyal gen (*fim*) kümesi altı genden meydana gelmektedir (*fimAICDHF*) ve bu genler söz konusu bakterinin genomunda operon halinde organize olmuştur. Bu operonun regülasyonu ise *S*. Typhimurium genomunda buluna üç bağımsız gen tarafından kontrol edilmektedir (*fimZ, fimY ve fimW*) (Swenson vd. 1994, Tinker ve Clegg 2001, Clegg ve Hughes 2002, Yeh vd. 2002, Saini vd. 2009). Fimbriyal uzantı, esas olarak birden çok parçadan oluşur. Tip 1 fimbriyanın ana yapısal alt birimi FimA'nın kopyaları, FimC ve FimD proteinleri tarafından birleştirilmektedir (şaperon/usher proteinler). Fimbriyalara adezif (tutunma) özelliğini kazandıran alt ünite ise fimbriyaların ucunda bulunan FimH adezin proteinidir (Kisiela vd. 2011). *E. coli'*deki FimI ile çok yakın ilişkili bulunan, *Salmonella* FimI proteininin de bu organizmada *E. coli*'de olduğu gibi kesin rolü henüz tanımlanamamıştır. Ancak FimI proteinini kodlayan genin delesyonu halinde *E. coli'*de tip 1 fimbriya üretemeyen mutantların oluştuğu belirlenmesine rağmen, söz konusu genin *S.* Typhimurium'da delesyonu aynı sonucu doğurmamıştır (Valenski vd. 2003). Diğer yandan *S.* Typhimurium'un FimF proteininin genetik ve amino asit seviyesinde *E. coli* FimF proteini ile çok az benzerliğe sahip olmasına rağmen, fimbriyal alt birimlerin birleşmesinde *E. coli* FimF ve FimG proteinlerinde olduğu gibi adaptör (alt birimlerin bağlanma adaptasyonunu sağlayan) protein olduğu öngörülmektedir. Bu öngörünün yegane dayanağı korunmuş amino asit dizilerinin benzer adaptör proteinlerle aynı bölgede yer almasıdır (Blanco vd. 1997, Thanassi vd. 1998, Lane ve Mobley 2007, Nuccio ve Bäumler 2007). *Salmonella* dışında, *E. coli* de birçok patojen ile yürütülen çalışmalarda FimF proteininin de dahil olduğu adaptör proteinlerin fimbriya üretimi için zorunlu olmadığı, ancak söz konusu adaptörlerin üretilmediği mutantlarda fimbriyal tutunmanın ya ortadan kalktığı ya da azaldığı tespit edilmiştir (Lindberg vd. 1984, Russell ve Orndorff 1992). Russell ve Orndorff (1992) bu konuda yürüttükleri öncü çalışmalarda *E. coli* adaptör proteinlerini kodlayan *fimF* ve *fimG* mutantlarının elektron mikroskobunda fenotiplerini tanımlamıştır. *fimF* geninin delesyonu sonucunda fimbriya miktarında azalma saptanmıştır. Aynı

yöntemle mutant edilen *fimG* geninde ise fimbriya uzunluğunda artış gözlenmiştir. Araştırmacılar daha sonra bu iki genin ikili mutantını hazırlamış ve tekli mutantlarla karşılaştırmasını yapmıştır. Δ*fimF:fimG* ikili mutant geni, Δ*fimG* mutant geninden daha uzun fimbriya fenotipi gösterirken aynı zamandan Δ*fimF* mutant geninden de daha az miktarda fimbriya üretimi olduğu bildirilmiştir. Tüm bu veriler *fimF* geninin ve dolayısıyla onun kodladığı FimF proteininin uç adezinlerin fimbriyal yapıya ilavesinde adaptör görev aldıklarına ve onların yokluğunda adezin bağlanma aktivasyonunun sağlanamadığına işaret etmektedir. Diğer yandan, yine *E. coli*'nin de dahil olduğu birçok patojene ait tip 1 fimbriya adaptör proteinleri ile yürütülen çalışmada, adaptör alt birimlerin sadece N terminal uçlarının fimbriyal alt ünitelerin ilavesinde adaptör görevi üstlendiği ileri sürülmüştür (Kloppsteck vd. 2016). Tüm bu literatür verileri *Salmonella*'da fonksiyonu en az bilinen tip 1 fimbriya alt ünitesinin FimF olduğuna, korunmuş seri özelliklerinden hareketle de muhtemelen bu alt ünitenin bir adaptör alt ünite olduğuna işaret etmektedir. Ancak bu öngörülere ait *Salmonella*'da herhangi bir deneysel veri bulunmamaktadır. Bu esas doğrultusunda kurgulanan tez çalışmamızda tip 1 fimbriyanın FimF alt ünitesinin biyofilm yapıları esas alınarak, fonksiyonel analizinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada tüm *fimF* geni mutantı insersiyona uğratılmış mutantı yanında, *fimF* geninin sadece 5' ucundaki 151 bç uzunluktaki bölgenin pBAD vektörünün arabinoz promotoru önüne klonlanmış konstraktını taşıyan *S.* Typhimurium suşunun da kullanılması, *fimF* geninin tanımlanacak fonksiyonunun, literatür verilerinde olduğu gibi, bu proteinin N terminal bölgesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek amacını taşımaktaydı. Bu çalışmada *dam* (DNA denin metilaz geni) mutantı ise, Oğuz vd. (2022) tarafından yürütülen çalışmada *fimF* geninin *dam* mutantında ekspresyon oranının önemli ölçüde düştüğünün tespit edilmesidir. Bu bulgu, *fimF* geninin fonksiyonu yanında regülasyon karakteristikleri hakkında da bilgi sahibi olmak için *dam* mutantının çalışmaya dahil edilmesi fikrini doğurmuştur.

Bu doğrultuda yürüttüğümüz deneysel çalışmalarda *dam* ve *fimF* geni mutantlarında biyofilm oluşumunun istatistiki açıdan çok anlamlı ($p<0,01$) düzeylerde düşüşü her iki genin ve dolayısı ile de kodladıkları proteinlerin *Salmonella'*da planktonik (tek hücreli) formdan stres koşullarında teşvik edilen biyofilm formuna geçişte kritik rollere sahip

olduğuna işaret etmektedir. *dam* mutantının teşvik edilebilen arabinoz promotoru önünde *dam* geni içeren pBAD vektörü aktarılarak tamamlanması halinde dam mutantının yol açtığı biyofilm defektinin restore edilememesi ise, muhtemelen söz konusu promotordan Dam ekspresyonunun normal suştan çok yüksek gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır. Zira Dam ekspresyonunun çok yüksek olduğu koşullarda, bu proteinin 5'GATC3' serilerine bağlanma ilgisinin substrat konsantrasyonundan kaynaklanan yarışmacı inhibisyonu nedeni ile düştüğü ve aşırı eksprese edilen konstraktlarda da *dam* mutant fenotipinin ortaya çıktığı belirlenmiştir (Chatti vd. 2008, Chatt vd. 2014, Aya Castaneda vd. 2015). Diğer yandan *fimF* geni N terminal bölgesinin arabinoz promotoru önüne klonlandığı PBAD vektörünün, *fimF* mutantına aktarılması halinde, doğal tip suştaki kadar olmasa da istatistiki açıdan anlamlı bir düzeyde ($p<0.05$) biyofilm fenotipinin restore edilmesi, bu bölgenin söz konusu proteinin adaptör fonksiyonunu taşıyan bölgesi olduğunun güçlü bir kanıtı olarak görünmektedir. FimF proteininin detaylı domain analizleri ve fonksiyonel tamamlama çalışmaları ile bu verinin kanıtlanması özellikle *Salmonella* aşı geliştirme programları için önemli bir epitop sunma potansiyeli taşımaktadır.

Doğal tip suşa oranla, tüm mutantlar ve konstraktlarda oksidatif stres koşullarına direncin artması literatür verilerinin aksine (H´ebrard vd. 2009, Henard vd. 2010, Calderón vd. 2011, Chatti vd. 2012, Morales vd. 2012, Hahn vd. 2021, Kim vd. 2021) ne tip 1 fimbriyanın ve ne de dam metilaz enziminin stres yanıtında pozitif bir rolünün olmadığını kanıtlamaktadır. Bunun temel nedeni Dam metilaz enziminin ve FimF proteininin yokluğunu *Salmonella* hücrelerinin kritik bir içsel stres koşulu olarak algılaması ve stres koşullarına güçlü yanıtlar oluşturmasıdır. Zira hem Dam metilaz enzimi ve hem de tip 1 fimbriya, *Salmonella*'nın patojenitesi ve virülanslığında kritik rollere sahiptir (Balbontín vd. 2006, Chatti vd. 2012, Kisiela vd. 2013, Giacomodonato vd. 2014, Kuźmińska-Bajor vd. 2015, Grzymajlo vd. 2017, Kolenda vd. 2019, Kuan vd. 2019, Guo vd. 2020, Mannan vd. 2020, Bourgeois vd. 2022).

dam mutantında katı ve sıvı ortamlarda temel biyofilm morfotipi değişmemesine rağmen, katı ortamlarda tam rdar morfotipi olmayan ara biyofilm morfotiplerinin, sıvı ortamlarda ise fiziksel koşullara dayanıklılığı düşmüş pelikül yapılarının oluşturulması, bu mutantta EPS ana bileşenlerinden biri olan selüloz üretiminin azalması olarak değerlendirilmiştir.

Selüloz üretimi yanında, katı agarda yürütülen biyofilm morfotiplendirme testlerinde de açıkça görüldüğü üzere kıvrımlı (curli) fimbriya üretiminin de *fimF* mutantında önemli ölçüde düşmesinin, bu mutantın ürettiği biyofilm ve pelikül yapısının stabilitesini yüksek düzeyde bozan ana unsurlar oluğuna işaret etmektedir. Doğal gen ile tamamlama yapılan konstraktlardan sadece *fimF* konstraktında bozulan biyofilm morfotiplerinin restore edilememesi, muhtemelen konstraktlarda tam *fimF* geni yerine *fimF* geninin sadece bir kısmının bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda son olarak, doğal suş ile *fimF* mutantının CaCo-2 ve Hep-2 hücrelerine tutunma karakteristikleri konfokal mikroskopi yöntemi ile incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda da *fimF* geni delesyonlu mutantta, ökaryotik hücre hatlarında tutunmanın büyük oranda düşme gösterdiği saptanmıştır. Bu durum; *fimF* geni delesyonu sonucunda FimH adezin alt ünitesinin yapıya ilave edilmediğinin ya da düşük düzeyde ilave edildiğinin, bir başka deyişle FimF alt ünitesinin adaptör protein görevi gördüğünün, bugüne kadar *Salmonella*'da elde edilen yegane deneysel kanıtını oluşturmaktadır. Diğer yandan *dam* mutantında da *S.* Typhimurium'un ökaryotik hücrelere tutunmasının kritik seviyede düşmesinin olası moleküler mekanizması, büyük olasılıkla Oğuz vd. (2022) tarafından *dam* mutantlarında belirlenen *fimF* geninin transkripsiyonunun kritik düzeylerde düştüğü yönündeki bulgularla ilişkilidir. Özetle *dam* mutantında bu fenotip, *dam* mutantının *fimF* geni transkripsiyonunu negatif yönde regüle etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Tip 1 fimbriya operonu üzerinde *dam* geni ya da onun kodladığı proteinin doğrudan ya da dolaylı etkisinin moleküler düzeyde tanımlanması, bu konuda yürütülecek ileri çalışmaların temel hareket noktasını oluşturmalıdır.

KAYNAKLAR

Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., & Isaacson, R. E. 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. Infection and Immunity, 71(11), 6446–6452.

Amano, A. 2010. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. Periodontology 2000, 52(1), 12–37.

Archer, D. L. 1996. Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. Trends in Food Science & Technology, 7(3), 91–95.

Aya Castañeda, M., Sarnacki, S. H., Noto Llana, M., López Guerra, A. G., Giacomodonato, M. N., & Cerquetti, M. C. 2015. Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. International journal of food microbiology, 193, 15–22.

Balbontín, R., Rowley, G., Pucciarelli, M. G., López-Garrido, J., Wormstone, Y., Lucchini, S., García-Del Portillo, F., Hinton, J. C., & Casadesús, J. 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Journal of bacteriology, 188(23), 8160–8168.

Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. 2006. Curli biogenesis and function. Annual Review of Microbiology, 60, 131–147.

Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. Advances in Experimental Medicine and Biology, 412, 149–158.

Baxter, M. A., & Jones, B. D. 2005. The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. Infection and Immunity, 73(3), 1377–1385.

Beachey, E.H. 1981. Bacterial Adherence: Adhesin Receptor Interaction Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surface. The Journal of Infectious Diseases, 143, 325-345.

Bergerat, A., & Guschlbauer, W. 1990. The double role of methyl donor and allosteric effector of S-adenosyl-methionine for Dam methylase of *E. coli*. Nucleic acids research, 18(15), 4369–4375.

Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Mora, A., Balsalobre, C., Muñoa, F., Juárez, A., & Blanco, J. 1997. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Research in microbiology*, *148*(9), 745–755.

Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emody, L., Polen, T., Rachel, R. 2005. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli.* Microbiology, 151: 3287–3298.

Boddicker, J. D., Ledeboer, N. A., Jagnow, J., Jones, B. D., & 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(5), 1255–1265.

Bouckaert, J., Mackenzie, J., de Paz, J.L, Chipwaza, B., Choudhury, D., Zavialov, A., Mannerstedt, K., Anderson, J., Pierard, D., Wyns. L. 2006. The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven and quasi-independent of *Escherichia coli* pathotypes. Molecular Microbiology, 61:1556–1568.

Bourgeois, J. S., Anderson, C. E., Wang, L., Modliszewski, J. L., Chen, W., Schott, B. H., Devos, N., & Ko, D. C. 2022. Integration of the *Salmonella* Typhimurium Methylome and Transcriptome Reveals That DNA Methylation and Transcriptional Regulation Are Largely Decoupled under Virulence-Related Conditions. mBio, 13(3), e0346421.

Boyd, E. F., & Hartl, D. L. 1999. Analysis of the type 1 pilin gene cluster *fim* in *Salmonella*: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions. Journal of bacteriology, 181(4), 1301–1308.

Branchu, P., Bawn, M., & Kingsley, R. A. 2018. Genome Variation and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathovariants. Infection and Immunity, 86(8), e00079-18.

Brown, E. W., Bell, R., Zhang, G., Timme, R., Zheng, J., Hammack, T. S., & Allard, M. W. 2021. *Salmonella* Genomics in Public Health and Food Safety. EcoSal Plus, 9(2), eESP00082020.

Calderón, I. L., Morales, E., Caro, N. J., Chahúan, C. A., Collao, B., Gil, F., & Saavedra, C. P. 2011. Response regulator ArcA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium downregulates expression of OmpD, a porin facilitating uptake of hydrogen peroxide. Research in Microbiology, 162(2), 214–222.

Campbell, J. L., & Kleckner, N. 1990. *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. Cell, 62(5), 967–979.

Campos-Galvão, M. E., Ribon, A. O., Araújo, E. F., & Vanetti, M. C. 2016. Changes in the *Salmonella enterica* Enteritidis phenotypes in presence of acyl homoserine lactone quorum sensing signals. Journal of Basic Microbiology, 56(5), 493–501.

Castelijn, G. A., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. 2012. Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. Biofouling, *28*(1), 51–63.

Chatt, A., Aloui, M., Tagourti, J., Mihoub, M., & Landoulsi, A. 2014. Novobiocin sensitivity of *Salmonella* typhimurium *dam* and/or *seqA* mutants. Polish journal of microbiology, 63(1), 51–56.

Chatti, A., Daghfous, D., & Landoulsi, A. 2008. Effect of repeated in vivo passage (in mice) on *Salmonella typhimurium dam* mutant virulence and fitness. Pathologie Biologie, 56(3), 121–124.

Chatti, A., Messaoudi, N., Mihoub, M., & Landoulsi, A. 2012. Effects of hydrogen peroxide on the motility, catalase and superoxide dismutase of *dam* and/or *seqA* mutant of *Salmonella* typhimurium. World journal of microbiology & biotechnology, 28(1), 129–133.

Clegg, S., & Hughes, K.T. 2002. FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. 184: 1209 –1213.

Clouthier, S. C., Collinson, S. K., White, A. P., Banser, P. A., & Kay, W. W. 1998. tRNA(Arg) (*fimU*) and expression of SEF14 and SEF21 in *Salmonella* Enteritidis. Journal of Bacteriology, 180, 840–845.

Colgan, A. M., Kröger, C., Diard, M., Hardt, W. D., Puente, J. L., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., & Hinton, J. C. 2016. The Impact of 18 Ancestral and Horizontally Acquired Regulatory Proteins upon the Transcriptome and sRNA Landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Public Library of Science Genetics, 12(8), e1006258.

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(3), 662–667.

Collinson, S. K., Doig, P. C., Doran, J. L., Clouthier, S., Trust, T. J., & Kay, W. W. 1993. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. Journal of Bacteriology, 175(1), 12–18.

Collinson, S. K., Emödy, L., Müller, K. H., Trust, T. J., & Kay, W. W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. Journal of Bacteriology, 173(15), 4773–4781.

Crawford, R. W., Reeve, K. E., & Gunn, J. S. 2010. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. Journal of Bacteriology, 192(12), 2981–2990.

Crump, J.A., Luby, S.P., Mintz, E.D. 2004. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ. May;82(5):346-53.

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8(9), 881-890.

Duguid, J. P., Campbell, I. 1969. Antigens of the type-1 fimbriae of *Salmonellae* and other enterobacteria. J. Journal of Medical Microbiology, 2(4): 535–553.

Duguid, J.P. 1959. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. The Journal of General Microbiology, 21:271–286

Feutrier, J., Kay, W. W., & Trust, T. J. 1986. Purification and characterization of fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. Journal of Bacteriology, 168(1), 221–227.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews. Microbiology, 14(9), 563–575.

Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8(9): 623-33.

García-Del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., & Casadesús, J. 1999. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(20), 11578–11583.

Giacomodonato, M. N., Llana, M. N., Castañeda, M., Buzzola, F., García, M. D., Calderón, M. G., Sarnacki, S. H., & Cerquetti, M. C. 2014. Dam methylation regulates the expression of SPI-5-encoded sopB gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbes and infection, 16(8), 615–622.

Giacomodonato, M. N., Sarnacki, S. H., Llana, M. N., & Cerquetti, M. C. 2009. Dam and its role in pathogenicity of *Salmonella enterica*. Journal of Infection in Developing Countries, 3(7), 484–490.

Gonzalez-Escobedo, G., & Gunn, J. S. 2013. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes regulated during biofilm formation on cholesterol gallstone surfaces. Infection and Immunity, 81(10), 3770–3780.

Gossert, A. D., Bettendorff, P., Puorger, C., Vetsch, M., Herrmann, T., Glockshuber, R., & Wüthrich, K. 2008. NMR Structure of the *Escherichia coli* Type 1 Pilus Subunit FimF and Its Interactions with Other Pilus Subunits. Journal of Molecular Biology, 375(3), 752–763.

Grzymajlo, K., Kuzminska-Bajor, M., Jaworski, J., Dobryszycki, P., & Ugorski, M. 2010. The high-adhesive properties of the FimH adhesin of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis are determined by a single F118S substitution. Microbiology, 156(6),1738–1748.

Grzymajlo, K., Ugorski, M., Suchanski, J., Kedzierska, A. E., Kolenda, R., Jarzab, A., Biernatowska, A., & Schierack, P. 2017. The Novel Type 1 Fimbriae FimH Receptor Calreticulin Plays a Role in *Salmonella* Host Specificity. Frontiers in cellular and infection microbiology, 7, 326.

Guo, Y., Gu, D., Huang, T., Cao, L., Zhu, X., Zhou, Y., Wang, K., Kang, X., Meng, C., Jiao, X., & Pan, Z. 2020. Essential role of *Salmonella* Enteritidis DNA adenine methylase in modulating inflammasome activation. BMC microbiology, 20(1), 226.

Hahn, M. M., González, J. F., & Gunn, J. S. 2021. *Salmonella* Biofilms Tolerate Hydrogen Peroxide by a Combination of Extracellular Polymeric Substance Barrier Function and Catalase Enzymes. Frontiers in cellular and infection microbiology, 11, 683081.

Hammar, M., Bian, Z., & Normark, S. 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(13), 6562–6566.

Hancox, L. S., Yeh, K.S., & Clegg, S. 1997. Construction and characterization of type 1 non fimbriate and non-adhesive mutants of *Salmonella* Typhimurium. Federation of European Microbiological Societies Immunology & Medical Microbiology, 19(4), 289–296.

Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, A. W., Itoh, K., Ohno, H. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. Nature, 462(7270), 226–230.

Hébrard, M., Viala, J. P., Méresse, S., Barras, F., & Aussel, L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. Journal of bacteriology, 191(14), 4605–4614.

Henard, C. A., Bourret, T. J., Song, M., & Vázquez-Torres, A. 2010. Control of redox balance by the stringent response regulatory protein promotes antioxidant defenses of *Salmonella*. *The Journal of biological chemistry*, *285*(47), 36785–36793.

Herman, A., Serfecz, J., Kinnally, A., Crosby, K., Youngman, M., Wykoff, D., & Wilson, J. W. 2016. The Bacterial *iprA* Gene Is Conserved across Enterobacteriaceae, IsInvolved in Oxidative Stress Resistance, and Influences Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology, 198(16), 2166 2179.

Herman, G. E., & Modrich, P. 1981. *Escherichia coli* K-12 clones that overproduce dam methylase are hypermutable. Journal of Bacteriology, 145(1), 644–646.

Herman, G. E., & Modrich, P. 1982. *Escherichia coli* dam methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. The Journal of Biological Chemistry, 257(5), 2605–2612.

Hsu, C. Y., Wu, Y. L., Lin, H. C., Lin, M. Y., Chou, S. H., Shiau, C. W., & Chiu, H. C. 2021. A Novel Dibenzoxazepine Attenuates Intracellular *Salmonella* Typhimurium Oxidative Stress Resistance. Microbiology spectrum, 9(3), e0151921.

Jakomin, M., Chessa, D., Bäumler, A. J., & Casadesús, J. 2008. Regulation of the *Salmonella enterica* std fimbrial operon by DNA adenine methylation, SeqA, and HdfR. Journal of bacteriology, 190(22), 7406–7413.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association, 81(1), 7–11.

Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N., & Hultgren, S. J. 1995. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(6), 2081–2085.

Kim, J.S., Liu, L., & Vázquez-Torres, A. 2021. The DnaK/DnaJ chaperone system enables RNA polymerase-DksA complex formation in *Salmonella* experiencing oxidative stress. mBio.03443-20.

Kisiela, D. I., Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., Paul, S., Weissman, S. J., Medenica, I., Clegg, S., & Sokurenko, E. V. 2013. Evolutionary analysis points to divergent physiological roles of type 1 fimbriae in *Salmonella* and *Escherichia coli*. mBio, 4(2), e00625-12.

Kisiela, D. I., Kramer, J. J., Tchesnokova, V., Aprikian, P., Yarov-Yarovoy, V., Clegg, S., & Sokurenko, E. V. 2011. Allosteric catch bond properties of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of biological chemistry*, *286*(44), 38136–38147.

Kisiela, D., Laskowska, A., Sapeta, A., Kuczkowski, M., Wieliczko, A., & Ugorski, M. 2006. Functional characterization of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Microbiology (Reading, England), 152(Pt 5), 1337–1346.

Kloppsteck, P., Hall, M., Hasegawa, Y., & Persson, K. 2016. Structure of the fimbrial protein Mfa4 from *Porphyromonas gingivalis* in its precursor form: implications for a donor-strand complementation mechanism. Scientific reports, 6, 22945.

Kolenda, R., Ugorski, M., & Grzymajlo, K. 2019. Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask. Frontiers in Microbiology, 10, 1017.

Korhonen, T.K., Lounatmaa, K., Ranta, H., Kuusi, N. 1980. Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. Journal of Bacteriology, 144:800–805

Kuan, N. L., & Yeh, K. S. 2019. Arginine within a specific motif near the N-terminal of FimY is critical for the maximal production of type 1 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. MicrobiologyOpen, 8(9), e00846.

Kuźmińska-Bajor, M., Grzymajło, K., & Ugorski, M. 2015. Type 1 fimbriae are important factors limiting the dissemination and colonization of mice by *Salmonella* Enteritidis and contribute to the induction of intestinal inflammation during *Salmonella* invasion. Frontiers in microbiology, 6, 276.

Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., & Franco, C. M. 2018. Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. Food Control, 90, 1–9.

Lane, M.C., & Mobley, H.L. 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney Int. 72:19 –25.

LaPointe, C. F., & Taylor, R. K. 2000. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. The Journal of Biological Chemistry, 275(2), 1502–1510.

Ledeboer, N. A., Frye, J. G., McClelland, M., & 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(6), 3156–3169.

Leusch, H. G., Drzeniek, Z., Markos-Pusztai, Z., & Wagener, C. 1991. Binding of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to members of the carcinoembryonic antigen family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. Infection and Immunity, 59(6), 2051–2057.

Lindberg, F.P., Lund, B., & Normark, S. 1984. Genes of pyelonephritogenic *E. coli* required for digalactoside-specific agglutination of human cells. EMBO J. 3:1167–1173.

Mannan, T., Rafique, M. W., Bhatti, M. H., Matin, A., & Ahmad, I. 2020. Type 1 Fimbriae and Motility Play a Pivotal Role During Interactions of *Salmonella* typhimurium with Acanthamoeba castellanii (T4 Genotype). Curren microbiology, 77(5), 836–845.

McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Wilson, R. K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature, 413(6858), 852–856.

Monsieurs, P., De Keersmaecker, S., Navarre, W. W., Bader, M. W., De Smet, F., McClelland, M., Fang, F. C., De Moor, B., Vanderleyden, J., & Marchal, K. 2005. Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Journal of Molecular Evolution, 60(4), 462–474.

Morales, E. H., Calderón, I. L., Collao, B., Gil, F., Porwollik, S., McClelland, M., & Saavedra, C. P. 2012. Hypochlorous acid and hydrogen peroxide-induced negative regulation of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium *ompW* by the response regulator ArcA. BMC Microbiology, 12(1), 63.

Nair, S., Patel, V., Hickey, T., Maguire, C., Greig, D. R., Lee, W., Godbole, G., Grant, K., & Chattaway, M. A. 2019. Real-Time PCR Assay for Differentiation of Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonella*. Journal of Clinical Microbiology, 57(8), e00167-19.

Nuccio, S.P., Baumler, A.J. 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(4):551– 575.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual review of microbiology, 54, 49–79.

Oğuz, S. K., Has, E. G., Akçelik, N., & Akçelik, M. 2022. Phenotypic Impacts and Genetic Regulation Characteristics of the DNA Adenine Methylase Gene (*dam*) in *S.* Typhimurium Biofilm Forms. Research in microbiology, 103991. Advance online publication.

Old, D.C., & Payne, S.B. 1971. Antigens of the type-2 fimbriae of salmonellae: "cross-reacting material" (CRM) of type-1 fimbriae. J. Med. Microbiol. 4:215–225.

Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., & Williams, D. W. 2011. Introduction to Biofilms. Biofilms and Veterinary Medicine, 41–68.

Pratt, L.A., Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology, 30:285–293.

Puorger, C., Eidam, O., Capitani, G., Erilov, D., Grütter, M. G., & Glockshuber, R. 2008. Infinite kinetic stability against dissociation of supramolecular protein complexes through donor strand complementation. Structure (London, England : 1993), 16(4), 631–642.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry, 7(4), 493–512.

Rehman, T., Yin, L., Latif, M. B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., Huang, X., Abaidullah, M., Guo, H., & Ouyang, P. 2019. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. Microbial Pathogenesis, 137, 103748.

Rodrigues, D. F., & Elimelech, M. 2009. Role of type 1 fimbriae and mannose in the development of *Escherichia coli* K12 biofilm: from initial cell adhesion to biofilm formation. Biofouling, 25(5), 401–411.

Rosen, D.A., Pinkner, J.S., Walker, J.N., Elam, J.S., Jones, J.M., Hultgren, S.J. 2008. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. Infection and Immunity, 76: 3346–3356.

Roy, P. K., Ha, A. J., Mizan, M., Hossain, M. I., Ashrafudoulla, M., Toushik, S. H., Nahar, S., Kim, Y. K., & Ha, S. D. 2021. Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. Poultry Science, 100(7), 101209.

Römling, U., & Rohde, M. 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* typhimurium on the community level. FEMS microbiology letters, 180(1), 91–102.

Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. Journal of Bacteriology, 180(3), 722–731.

Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., & Reinköster, J. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* typhimurium regulates at least two independent pathways. Molecular microbiology, 36(1), 10–23.

Russell, P. W., & Orndorff, P. E. 1992. Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. Journal of Bacteriology, 174(18), 5923–5935.

Saini, S., Pearl, J. A., & Rao, C. V. 2009. Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type 1 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology, 191(9), 3003–3010.

Seong, H. J., Han, S. W., & Sul, W. J. 2021. Prokaryotic DNA methylation and its functional roles. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 59(3), 242–248.

Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., & Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella* enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. Molecular microbiology, 43(3), 793–808.

Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L., & Svabić-Vlahović, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in applied microbiology, 38(5), 428–432.

Su, L.H., Chiu, C.H. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Medical Journal, May-Jun;30(3):210-9.

Sürkaç, T. N., & Akçelik, M. 2022, August. Relationship Between sRNA And Biofilm Formation. In Proceedings Of Iv. International Agricultural, Biological & Life Science Conference Agbiol 2022(P. 579).

Swenson, D.L., Kim, K.J., Six, E.W., & Clegg, S. 1994. The gene *fimU* affects expression of *Salmonella* Typhimurium type 1 fimbriae and is related to the *Escherichia coli* tRNA gene *argU*. Mol. Gen. Genet. 244:216 –218.

Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. 2013. In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. Journal of Medical Microbiology, 62(Pt 4), 637–649.

Tavendale, A., & Old, D. C. 1985. Haemagglutinins and Adhesion of *Escherichia Coli* To Hep2 Epithelial Cells. Journal of Medical Microbiology, 20(3), 345–353.

Tavendale, A., Jardine, C. K., Old, D. C., & Duguid, J. P. 1983. Haemagglutinins and adhesion of *Salmonella* Typhimurium to HEp2 and HeLa cells. Journal of Medical Microbiology, 16(3), 371–380.

Teplitski, M., Al-Agely, A., & Ahmer, B. 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology (Reading, England), 152(Pt 11), 3411–3424.

Thanassi, D.G., Saulino, E.T., & Hultgren, S.J. 1998. The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:3146 –3151.

Thankavel, K., Shah, A. H., Cohen, M. S., Ikeda, T., Lorenz, R. G., Curtiss, R., 3rd, & Abraham, S. N. 1999. Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella* Typhimurium type 1 fimbriae. The Journal of Biological Chemistry, 274(9), 5797–5809.

Threlfall, E.J. 2002. Antimicrobial Drug Resistance in *Salmonella*: Problems and Perspectives in Food- and Water-Borne Infections. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 26, 141-148.

Tinker, J.K., & Clegg, S. 2001. Control of FimY translation and type 1 fimbrial production by the arginine tRNA encoded by *fimU* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol. Microbiol. 40:757–768.

Uğur, S., Akçelik, N., Yüksel, F. N., Taşkale Karatuğ, N., & Akçelik, M. 2018. Effects of *dam* and *seqA* genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. Pathogens and global health, 112(7), 368–377.

Valenski, M.L., Harris, S.L., Spears, P.A., Horton, J.R., & Orndorff, P.E. 2003. The product of the *fimI* gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis. J. Bacteriol. 185:5007–5011.

Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. 2019. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. Frontiers in Chemistry, 7, 824.

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.

Wagner, C., & Hensel, M. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 715, 17–34.

Wang, K. C., Hsu, Y. H., Huang, Y. N., Lin, J. H., & Yeh, K. S. 2014. FimY of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium functions as a DNA-binding protein and binds the fimZ promoter. Microbiology. Res. 169, 496–503.

Wang, K.C., Hsu, Y.H., Huang, Y.N., & Yeh, K.S. 2012. A previously uncharacterized gene *stm0551* plays a repressive role in the regulation of type 1 fimbriae in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. BioMed Central Microbiology, 12:111.

Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. 2018. Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. EcoSal Plus, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0007 2017.

White, A. P., Collinson, S. K., Banser, P. A., Gibson, D. L., Paetzel, M., Strynadka, N. C., & Kay, W. W. 2001. Structure and characterization of AgfB from *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae. Journal of Molecular Biology, 311(4), 735–749.

White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Banser, P.A., Kay, W.W. 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Journal of Bacteriology, 185:5398–5407.

Wright, K.J., Seed, P.C., Hultgren, S.J. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cell Microbiology, 9:2230–2241.

Yeh, K. S., Tinker, J. K., & Clegg, S. 2002. FimZ binds the *Salmonella* Typhimurium *fimA* promoter region and may regulate its own expression with FimY. Microbiology and Immunology, 46(1), 1–10.

Zeiner, S. 2012b. Type 1 Fimbrial Structure and Regulation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Ph.D. thesis, University of Iowa, Iowa City.

Zeiner, S. A., Dwyer, B. E., & Clegg, S. 2012a. FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infection and Immunity, 80(9), 3289–3296.