

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SALMONELLA TYPHIMURIUM'DA *pagN* GENİNİN BİYOFİLM
OLUŞTURMA YETENEĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

Asiye Nur KARACA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SALMONELLA TYPHIMURIUM'DA *pagN* GENİNİN BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

Asiye Nur KARACA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, *pagN* geninin *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşunda biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile, *S. Typhimurium* 14028 suşunun *pagN* ve *seqA* geni mutantları kullanıldı. *S. Typhimurium* *pagN* ve *seqA* mutantında, doğal suşa oranla biyofilm oluşumunun istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ($p<0,05$). Doğal tip ve mutant suşların oluşturduğu biyofilm morfortipleri incelendiğinde; doğal tip suş 'rdar' morfortip gösterirken, *pagN* mutant suşunun ve *seqA* mutant suşunun ise, tam 'rdar' morfortipi olmayan, pdar benzeri 'ara morfortip' olarak adlandırdığımız biyofilm morfortipini gösterdiği saptandı. Bunun yanında, *pagN* geninin ve *seqA* 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 selüloz ürettiği belirlendi. Bu suşların yüzde otoagregasyon miktarları karşılaştırıldığında, doğal tipe kıyasla *seqA* mutantında otoagregasyon yeteneği bakımından azalma tespit edilirken *pagN* mutantının otoagregasyon yeteneğinde oransal olarak büyük bir azalma saptanmadı. Buna karşılık, doğal tip suşla ve *seqA* mutant ile kıyaslandığında *pagN* mutantının swimming hareket kabiliyeti önemli ölçüde azalırken swarming hareket yeteneğinde azalma tespit edilmedi. Ancak *seqA* mutantının her iki hareket kabiliyeti doğal suşa kıyasla büyük oranda azaldı. Caco-2 hücre hattındaki tutunma denemelerinde *pagN* ve *seqA* mutantının yüzde adezyon ve invazyon miktarları doğal tipe kıyasla anlamlı şekilde daha az olduğu ($p<0,05$) ve hatta *pagN* mutantının invazyon yeteneğini neredeyse tamamen kaybettiği saptandı.

Haziran 2024, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: *pagN*, *Salmonella* Typhimurium, biyofilm, fenotip

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT of *pagN* GENE on BIOFILM FORMING ABILITY in *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Asiye Nur KARACA

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, *pagN* and *seqA* gene mutants of strain *S. Typhimurium* 14028 were used to determine the effect of the *pagN* gene on the biofilm formation ability of *S. Typhimurium* ATCC 14028 strain. It was determined that biofilm formation was significantly reduced in *S. Typhimurium* *pagN* and *seqA* mutant compared to the wild strain ($p<0.05$). When the biofilm morphotypes formed by wild-type and mutant strains were examined, While the wild type strain showed the 'rdar' morphotype, it was determined that the *pagN* mutant strain and the *seqA* mutant strain showed the biofilm morphotype, which we call 'intermediate morphotype,' which is not the full 'rdar' morphotype. In addition, it was determined that the *pagN* gene and the *seqA* gene were effective on pellicle formation and structural properties of pellicles in *Salmonella*. It was determined that mutant strains produced less cellulose compared to the wild-type in solid and liquid culture media. When the percentage autoaggregation amounts of these strains were compared, a statistically significant decrease in autoaggregation ability was detected in the *seqA* mutant compared to the wild-type ($p<0.05$), while no significant decrease in the autoaggregation ability of the *pagN* mutant was detected ($p<0.05$). On the other hand, when compared to the wild-type strain and the *seqA* mutant, the swimming motility of the *pagN* mutant was significantly reduced, while no decrease in swarming motility was detected. However, both motility abilities of the *seqA* mutant were greatly reduced compared to the wild strain. In adhesion experiments on the Caco-2 cell line, it was determined that the percentage adhesion and invasion amounts of the *pagN* and *seqA* mutant were significantly less than the wild-type ($p<0.05$) and that the *pagN* mutant almost completely lost its invasion ability.

June 2024, 85 pages

Key Word: *pagN*, *Salmonella* Typhimurium, biofilm, phenotype

TEŞEKKÜR

Kendime inanmadığım zamanlarda bile bana inanan, her anlamda desteğini hissettiğim, genetiğin sonsuz dehlizlerinde bana boğulmamayı ve akıntıya karşı yüzmeyi öğreten, engin bilgisini paylaştığı sohbetlerinden inanılmaz keyif aldığım, kendisiyle çalışma şansına sahip olduğum için her daim mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Akçelik'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

İçinde yer almaktan her gün heyecan duyduğum bu çalışma alanına girebilmemin esas nedeni ve destekleyicisi olan, hoşgörüsü ve alçak gönüllüğüyle resmiyette olmasa da benim için her zaman bir eş danışman olan değerli hocam Doç. Dr. Nefise Akçelik'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Lisans eğitimimden bu yana hayatımın her alanında desteğini gördüğüm, bana mikrobiyolojinin temellerini öğreterek zihnimdeki ilk kıvılcımların oluşmasını sağlayan, her ilerlememi keyifle takip eden, güçlü kadın olmanın güzel örneklerinden olan canım Dr. Kübra Erkan Türkmen hocama (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü).

Adezyon ve invazyon denemeleri için bana laboratuvarını açan sayın Prof. Dr. Erkan Yılmaz (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) hocama ve bu denemeleri yapmamda bana yardımcı olan kendisinin öğrencisi ve benim ilk laboratuvar partnerim olan, akademik yolculuğumuzda hep omuz omuza olduğumuz değerli arkadaşım İlayda Engin'e,

Bakteriyel hareket denemelerimde bana yardımcı olan değerli ekip arkadaşım Elif Gamze Has'a, tez metnimin düzenlenmesi hususunda yardımlarıyla vakit kaybımı en aza indiren çalışma arkadaşım Tuba Nur Sürkaç'a, ayrıca hep birlikte geçirdiğimiz tüm güzel vakitler için Hale Elçin Latifi ve tüm Prokaryotik Genetik laboratuvarı üyelerine,

Hayatımın şahidi, motivasyon kaynağım, canım dostum İklim Evran'a, merhametle dolu biricik kardeşim Mehmet Efehan Karaca'ya, beni her tercihimde maddi ve manevi her anlamda destekleyen, öncelikleri olduğumu bildiğim, özverili ve fedakar canım annem Sevim Karaca'ya ve dünyaya adeta baba olmak için gelmiş canım babam Yaşar Karaca'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, “*Salmonella Typhimurium*’da *pagN* Geninin Biyofilm Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkisi (FYL-2023-2888)” adlı proje tarafından desteklenmiştir. Tez çalışmamı desteleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederim.

Bu tezi, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A Yurtiçi Genel Yüksek Lisans burs programı ile destekleyen TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Asiye Nur KARACA
Ankara, Haziran 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsi ve Sınıflandırılması.....	3
2.2 <i>Salmonella</i> Genel Özellikleri	5
2.3 Biyofilm Yapısı ve Oluşum Aşamaları	6
2.3.1 <i>Salmonella</i> biyofilm yapısı.....	10
2.3.2 <i>Salmonella</i> biyofilm regülasyonu	12
2.3.3 PhoPQ iki bileşenli regülatör sistemi	15
2.4 <i>Salmonella</i> Adezinleri	17
2.4.1 <i>Salmonella</i> 'nın fimbriyal adezinleri	18
2.4.1.1 Şaperon -yol gösterici (Şaperon – Usher) yolağı	18
2.4.1.2 Nükleasyon çökme (Nucleation Precipitation) yolağı	19
2.4.1.3 Tip IV fimbriya yolağı	20
2.4.2 <i>Salmonella</i> 'nın fimbriyal olmayan adezinleri.....	20
2.4.2.1 T1SS tarafından sekrete edilen adezinler	21
2.4.2.2 T5SS tarafından sekrete edilen adezinler	21
2.5 <i>Salmonella</i> İnvazinleri	22
2.5.1 T3SS bağımlı invazyon	23
2.5.2 Rck bağımlı invazyon.....	24
2.6 Bir Adezin ve İnvazin Olarak PagN	24
2.7 <i>pagN</i> Geni.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal	30
3.1.1 Bakteri kültürleri	30
3.1.2 Besiyerleri	30
3.1.3 Çözeltiler	34
3.1.4 Vektörler	37
3.1.5 Primerler	38
3.2 Yöntem	39
3.2.1 Lambda red genlerini kodlayan pKD46 plazmidinin <i>S. Typhimurium</i> 14028'e aktarılması.....	39
3.2.1.1 pKD46 plazmidinin izolasyonu	39
3.2.1.2 Elektrokompentan <i>S. Typhimurium</i> 14028 hücrelerinin hazırlanması	40
3.2.1.3 pKD46 plazmidinin elektroporasyon yoluyla <i>S. Typhimurium</i> 14028'e transformasyonu	40
3.2.2 Kloramfenikol gen kaseti insersiyonu ile <i>S. Typhimurium</i> 'da <i>pagN</i> geninin delesyonu	41

3.2.2.1 pKD3 plazmidinin izolasyonu	41
3.2.2.2 pKD3 plazmidinin <i>PvuI</i> enzimi ile restriksiyon kesimi	41
3.2.2.3 Kloramfenikol gen kasetinin Touchdown PZR ile çoğaltılması	42
3.2.2.4 <i>DpnI</i> restriksiyon enzimi ile PZR ürünlerinin kesimi	44
3.2.2.5 <i>S. Typhimurium</i> 14028+pKD46 suşunun elektrokompetan hale getirilmesi	44
3.2.2.6 Homolog kollara sahip kloramfenikol direnç kasetinin pKD46 plazmidi içeren <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşuna transformasyonu	45
3.2.2.7 <i>pagN</i> geni delesyonunun PZR ile doğrulanması.....	45
3.2.3 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşu ve bu suşun <i>seqA</i> ve <i>pagN</i> mutantlarının üreme eğrilerinin değerlendirilmesi.....	46
3.2.4 <i>pagN</i> geni açısından mutant <i>S. Typhimurium</i> suşunun biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi	47
3.2.4.1 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum kapasitesinin değerlendirilmesi	47
3.2.4.2 Kongo Kırmızısı (CR) agarda biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi	48
3.2.4.3 Kalkoflor Beyazı (CFW) içeren besiyerlerinde biyofilm yapısının değerlendirilmesi.....	48
3.2.4.4 Bakterilerin pelikül oluşturma özelliklerinin değerlendirmesi	49
3.2.5 Bakteriyel agregasyonun belirlenmesi	49
3.2.6 Swimming ve swarming hareketlerinin izlenmesi.....	50
3.2.7 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip mutantlarının hücre hattına tutunma denemeleri	50
3.2.7.1 Caco-2 hücrelerine bakteriyel adezyonun belirlenmesi	50
3.2.7.2 Caco-2 hücrelerine bakteriyel invazyonun belirlenmesi	51
3.2.8 Verilerin istatistikî analizi	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	52
4.1 Lambda Red Genlerini Kodlayan pKD46 Plazmidinin <i>S. Typhimurium</i> 14028'e Aktarılması	52
4.2 Kloramfenikol Gen Kaseti İnsersiyonu ile <i>S. Typhimurium</i> 'da <i>pagN</i> Geninin Delesyonu	53
4.3 <i>S. Typhimurium</i> 14028 Suşu ve Bu Suşun <i>seqA</i> ve <i>pagN</i> Mutantlarının Üreme Eğrilerinin Değerlendirilmesi.....	57
4.4 <i>pagN</i> Geni Açısından Mutant <i>S. Typhimurium</i> Suşunun Polistren Yüzeylerde Biyofilm Oluşum Kapasitesinin Değerlendirilmesi	58
4.5 Kongo Kırmızısı (CR) Agarda Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi	60
4.6 Kalkoflor Beyazı (CFW) İçeren Besiyerlerinde Biyofilm Yapısının Değerlendirilmesi	61
4.7 <i>Salmonella</i> Suşlarının Pelikül Oluşturma Özelliklerinin Değerlendirmesi	62
4.8 Bakteriyel Agregasyonun Belirlenmesi	63
4.9 Swimming ve Swarming Hareketlerinin İzlenmesi.....	64
4.10 Caco-2 Hücre Hattında Adezyon ve İnvazyon Denemeleri.....	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
Δ	Delta/Mutant
°	Derece
λ	Lambda
Ω	Ohm
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
Da	Dalton
g	Gram
Kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
pH	Hidrojen gücü – asitlik
rpm	Dakikadaki devir sayısı
V	Volt

Kısaltmalar

AHL	Asil homoserin Lakton
AMP	Amfisilin
atm	Atmosfer basınç
ATP	Adenozin Trifosfat

Caco-2	İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinomu
c-di GMP	Siklik-di Guanozin Monofosfat
CHL	Kloramfenikol
CO ₂	Karbondioksit
CR	Kongo kırmızısı
CUP	Şaperon Usher Yolağı
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit
ECM	Hücre Dışı Matriks
eDNA	Ekstraselüler DNA
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmüno-Sorbent Teknik
EPS	Hücre Dışı Polimerik Madde (Eksopolisakkarit)
GAP	GTPaz aktivasyon proteini
GSP	Genel Sekresyon Yolağı
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
KOB/mL	Mililitredeki Koloni Oluşturan Birimler
N/P	Nucleation Precipitation (Birleşme Çekirdeği Oluşturarak Çökme)
OD	Optik Dansite
pag	Pho activated gene (Pho tarafından aktive edilen gen)
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
prg	Pho repressed gene (Pho tarafından inaktive edilen gen)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCV	<i>Salmonella</i> Containing Vacuole (<i>Salmonella</i> İçeren Vakuol)
seqA	Sequestration A geni
SPI-6	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası-6
T1SS	Tip 1 Sekresyon Sistemi
T2SS	Tip 2 Sekresyon Sistemi
T3SS	Tip 3 Sekresyon Sistemi
T5SS	Tip 5 Sekresyon Sistemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Salmonella</i> taksonomisi	4
Şekil 2.2 Biyofilm aşamaları.....	7
Şekil 2.3 PhoP/PhoQ iki bileşenli sistemi düzenlenmesi.....	15
Şekil 2.4 PagN proteininin 3 boyutlu yapısı	25
Şekil 3.1 Red rekombinaz ifade vektörü pKD46 haritası	37
Şekil 3.2 Kloramfenikol direnç kaseti içeren pKD3 yardımcı vektör haritası.....	37
Şekil 4.1 pKD46 transformasyonu neticesi amfisilin içeren agardaki transformantlar ..	52
Şekil 4.2 Transformantlarda pKD46 plazmidi varlığının doğrulanması.....	53
Şekil 4.3 pKD3 plazmidi jel görüntüsü.....	53
Şekil 4.4 PvuI enzimi ile kesilip lineer hale getirilmiş pKD3 plazmidi	54
Şekil 4.5 Touchdown PZR ile çoğaltılan homolog kollara sahip kloramfenikol kaseti .	55
Şekil 4.6 <i>pagN</i> delesyonu neticesi kloramfenikol içeren LB agardaki transformantlar .	56
Şekil 4.7 <i>pagN</i> delesyonu için doğrulama	56
Şekil 4.8 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve mutantlarının logaritmik üreme eğrisi	57
Şekil 4.9 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve mutantlarının üreme eğrisi	58
Şekil 4.10 20 °C derecede zamana göre biyofilm miktarı.....	59
Şekil 4.11 28 °C derecede zamana göre biyofilm miktarı.....	60
Şekil 4.12 Kongo kırmızısı agarda biyofilm morfortipleri.....	61
Şekil 4.13 Kalkoflor beyazı içeren agarda selüloz bağlanma uygulaması.....	62
Şekil 4.14 Kalkoflor bağlama denemesi	62
Şekil 4.15 Doğal tip ve mutant suşların pelikül yapısı	63
Şekil 4.16 Doğal tip ve mutant suşların pelikül yapısının kristal viyole boyası ile boyanarak tespiti.....	63
Şekil 4.17 Doğal tip ve mutant suşların yüzde otoagregasyon miktarları.....	64
Şekil 4.18 Sıcaklığa bağlı swimming (yüzme) hareketi.....	65
Şekil 4.19 Sıcaklığa bağlı swarming (toplu göç) hareketi	66
Şekil 4.20 <i>Salmonella</i> doğal tip ve mutantların Caco-2 hücrelerine adezyonu	67
Şekil 4.21 <i>Salmonella</i> doğal tip ve mutantların Caco-2 hücrelerine adezyonu	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 (Miller's) Luria Bertani (LB) broth ve agar.....	30
Çizelge 3.2 Tuz içermeyen LB (LB ^{-NaCl}) broth.....	31
Çizelge 3.3 Kalkoflor beyazı (CFW) içeren tuzsuz LB broth ve agar	31
Çizelge 3.4 Kongo kırmızısı (CR) agar.....	32
Çizelge 3.5 Plate count agar	32
Çizelge 3.6 Swarming agar	33
Çizelge 3.7 Swimming agar	33
Çizelge 3.8 <i>Salmonella- Shigella</i> (SS) agar	34
Çizelge 3.9 1M L-Arabinöz stok çözeltisi	34
Çizelge 3.10 10X fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) stok çözeltisi	35
Çizelge 3.11 % 33'lük glasiyel asetik asit çözeltisi.....	35
Çizelge 3.12 % 95'lik metanol çözeltisi	35
Çizelge 3.13 % 0,1'lik kristal viyole çözeltisi	36
Çizelge 3.14 Amfisilin (AMP) stok çözeltisi (100 mg/mL)	36
Çizelge 3.15 Kloramfenikol (CHL) stok çözeltisi (20 mg/mL).....	36
Çizelge 3.16 Gentamisin (GEN) stok çözeltisi (50 mg/mL).....	36
Çizelge 3.17 Homolog bölge rekombinasyon primerleri	38
Çizelge 3.18 Doğrulama primerleri.....	38
Çizelge 3.19 <i>PvuI</i> RE reaksiyon karışımı	42
Çizelge 3.20 Touchdown PZR reaksiyon karışımı	43
Çizelge 3.21 Touchdown PZR Sıcaklık Döngüsü.....	43
Çizelge 3.22 <i>DpnI</i> RE reaksiyon karışımı.....	44
Çizelge 3.23 Doğrulama için PZR karışımı	46
Çizelge 3.24 Doğrulama için PZR sıcaklık döngüsü	46

1. GİRİŞ

Salmonella, insanlarda ve hayvanlarda bakteriyel enterik hastalıkların ana sebeplerinden birisidir. Enfeksiyon, kontamine yiyeceklerden veya içeceklerden ya da *Salmonella* ile enfekte olmuş insan veya hayvanlarla temas yoluyla yayılır. *Salmonella* konakları; memeliler, kuşlar, sürüngenler ve hatta bitkiler olabilirken çok değişken abiyotik çevrelerde, yüzeyle ilişkili kompleks bir komünite formu olan, biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde hayatta kalabilir. Biyofilm; bir yüzeye geri dönüşsüz olarak tutunmuş, ve kendi ürettikleri polisakkarit materyalden oluşan matriks ile çevrili mikrobiyal hücre topluluğudur (Costerton 1999, Donlan ve Costerton 2002). Biyofilm yapısında bulunan hücreler, aynı hücrelerin planktonik formuna göre UV radyasyonu, ekstrem sıcaklıklar, pH değişiklikleri, yüksek tuzluluk, yüksek basınç, yetersiz besin, çeşitli antibiyotikler ve antimikrobiyaller gibi zorlu çevre koşullarına daha dirençlidir (Yin vd. 2019). *Salmonella* kaynaklı enfeksiyonların ve endüstriyel kontaminasyonların bu bakterilerin planktonik değil, biyofilm formlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Biyofilm, genellikle antimikrobiyal ajanlarla tedavinin başarısız olmasının altında yatan neden olarak kabul edilir ve tüm kronik enfeksiyonların tahminen % 65-80'inin biyofilmle ilişkili olduğu düşünüldüğünden (Coenye 2013), bu bakteri ile mücadelede biyofilm formlarının esas alınması önem taşımaktadır. Biyofilmlerinin eradikasyonu için yeni yöntemler bulabilmek ancak biyofilme ilişkin yapıların ayrıntılı şekilde araştırılması ve tanımlanması ile mümkündür.

Salmonella, fakültatif intrasellüler yaşam şeklini benimsemiş bir bakteridir (Fields vd. 1986, Finiay ve Falkow 1989, Groisman ve Ochman 1997, Ibarra ve Steele Mortimer 2009) Dolayısıyla, *Salmonella* patojenitesinin esas özelliği, konak bariyerlerini aşma kapasitesi ve fagositik ve fagositik olmayan hücreleri işgal edebilme yeteneğidir (Wu 2015). Konak hücreye giriş ve intrasellüler yaşamın başlaması, *Salmonella*'nın çoğalması, yayılması ve diğer konaklara bulaşması için kritik bir aşama olduğu düşünülmektedir (Boumart vd. 2014). Bakteriyel patojenite ile ilgili genetik çalışmalar için bir model özelliği taşıyan bu mikroorganizmanın, konak hücrelere tutunmada ve hücreye girişte kullandığı mekanizmaların iyi tanınması önemlidir.

Bu tez çalışmasının konusu olan *pagN* geni *Salmonella*'nın hücrelere tutunmasında ve fagositik olmayan hücrelere invazyonunda rol alan bu yapılardan biri olan PagN proteinini kodlar. Bir dış membran proteini olan PagN bir adezin ve invazin olarak tanımlanmıştır (Lambert ve Smith 2008). PagN proteini *Salmonella* cinsi içerisinde yaygın ve sekans düzeyinde oldukça korunmuştur (Barilleau vd. 2021). Literatürde *pagN* geninin *Salmonella*'nın hayatta kalma, uyum sağlama ve rekabet becerilerinde ve dolayısıyla virülansın ve yayılımında için önemli olduğu gösterilmiştir (Conner vd. 1998, Lambert ve Smith 2008, Yang vd. 2013).

Daha önce laboratuvar ekibimiz tarafından yürütülen araştırmalarda, global bir regülatör olduğu tespit edilen *seqA* mutantlarında *pagN* geninin transkriptlerinin önemli ölçüde arttığı, RNA-seq analizleri sonucu belirlenmiştir (Has vd. 2023). Bu doğrultuda, *pagN* geninin biyofilm formasyonundaki rolünün araştırılmasının gerekliliği tarafımızca düşünülmüştür. Mevcut veriler ve var olan eksiklerden hareketle söz konusu genin *Salmonella* patojenitesinde önemli bir rol aldığı öngörülerek çalışmanın hipotezi oluşturulmuştur. Bu tez tamamıyla orijinal bir çalışma olup, *pagN* geninin *Salmonella* adezyon ve invazyonundaki rolünün bir global regülatör ile kıyaslamalı analizinin yanında, aşı ve antikor geliştirme ve biyofilm eradikasyon çalışmalarına yeni bir aday sunma potansiyeli ile de önem taşımaktadır.

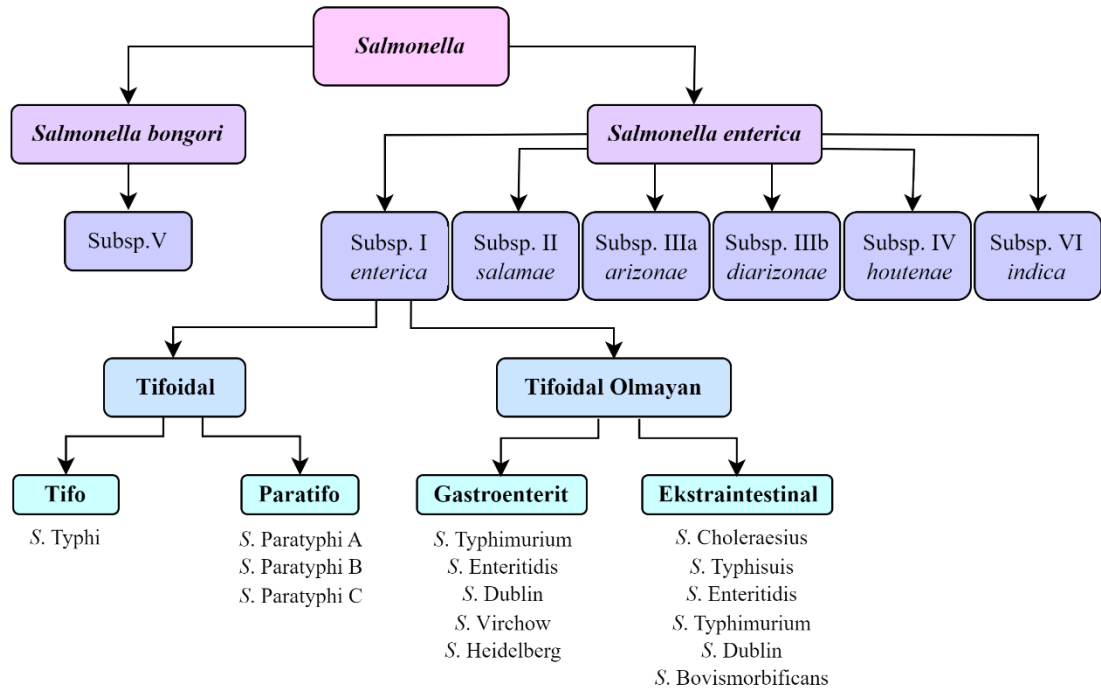
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsi ve Sınıflandırılması

Salmonella cinsi; konak çeşitliliği, virülansında rol oynayan genler ve hayatta kalabildiği koşullar nedeniyle gıda patojenleri arasında büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca dünya çapında ölüme neden olan, diyareyle ilerleyen rahatsızlıkların üçüncüsüdür (Ferrari vd. 2019). *Salmonella*, geniş çeşitlilik gösteren Gram negatif bakteri grubu *Proteobacteria* filumunun iyi bilinen patojenlerin büyük bir kısmını içeren *Gammaproteobacteria* şubesinde sınıflandırılır. *Enterobacteriaceae* familyasının, tipik ve çok sayıda virülans faktörüne sahip olması nedeniyle bakteriyel patojenite için genetik model olarak değerlendirilen önemli bir üyesidir.

Salmonella ilk kez 1880’li yıllarda gözlemlenmiştir. 1885 yılında hasta domuzdan izole edilen bir basil, Salmon ve Smith tarafından *Bacterium suipestifer* olarak isimlendirilmiştir (Tessari vd. 2012). Sonraki yıllarda bu bakteri türünün adı, Dr. Daniel Salmon’a ithafen *Salmonella Choleraesuis* şeklinde değiştirilmiştir. Bunu izleyen yıllarda, devamlı olarak farklı konaklardan ve farklı ortamlardan, yeni bir *Salmonella* türü veya varyetesi izole edilmiş ve tanımlanmıştır ve bu süreç halen devam etmektedir. Bu şekilde ilerleyen süreç, bu cinsin tanımlanması ve sınıflandırılması için yöntemler arayışını da beraberinde getirmiştir. Bugün geldiğimiz noktada, *Salmonella* cinsi, 16S rDNA analizine göre, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür altında sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1). *Salmonella enterica* türü, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olmak üzere altı alttür ile *Salmonella bongori* ise bir alttür ile sınıflandırılmaktadır. Bu alttürler biyokimyasal karakteristiklerine göre ayrılmış çok sayıda serovarı kapsamaktadır. Bu sınıflandırmaya göre % 99’u insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olan *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarları yol açtıkları rahatsızlıklara göre tifoidal ve tifoidal olmayan şeklinde iki grup altında toplanmaktadır. Bu serovarların ayrımı ise spesifik antiserumlar ile somatik (O), flagellar (H) ve kapsüller (Vi) antijenlerinin aglütinasyonuna dayanmaktadır. Bu şekilde oluşturulan Kauffman–White şemasına göre; O somatik antijen, lipopolisakkaritle ilişkili oligosakkarite dayalı şekilde tanımlanmaktadır. Yaklaşık olarak 60 adet O faktörü tanımlanmıştır (Lüderitz vd.

1966). H antijeni flagellar proteinlere dayanması nedeniyle hareketle ilişkilidir. Bu faktörler sayı ve harflerle temsil edilmektedir ve farklı kombinasyonlarını taşıyan çok sayıda serovar tanımlaması yapmak mümkündür. Bu yolla her bir serotip için bir antijenik formül oluşturulabilir. Vi antijeni ise virülansla ilişkilendirilmektir ve bu nedenle hastalık yapma kabiliyeti daha yüksek *Salmonella* türleri tarafından taşınmaktadır. Tüm bu teşhis yöntemleri ile şu an 2600'ü geçen *Salmonella* serovarı tanımlanmıştır.



Şekil 2.1 *Salmonella* taksonomisi

Geniş bir konak spektrumu olan bu cins, aynı zamanda serovarlarının adapte oldukları konaklar bakımından da gruplandırılabilir ve karakterize edilebilir (Agbaje vd. 2011). Bu gruplandırmaya göre; birinci grubu *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B*, *C* ve *S. Sendai* insan ve yüksek primatlara uyum sağlamış *Salmonellae* oluşturur. İkinci grup belirli hayvan türlerine adapte olmuş *Salmonella* serovarlarını içermektedir. Örnek olarak; *S. Dublin* sığırlara *S. Gallinarum* kümes hayvanlarına, *S. Abortusequi* atlara, *S. Abortusovis* koyunlara ve *S. Choleraesuis* domuzlara uyum sağlamıştır. Grup üç ise herhangi bir spesifik konağı olmayan ancak insanlarda ve çok sayıda hayvanda enfeksiyona neden olan *Salmonella* serovarlarını kapsar. Bunlar başlıca, bu tezinde konusu olan *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*'tir. Bu doğrultuda, *Salmonella enterica* subsp. I serogrubu

neredeyse tüm insan ve sıcak kanlı hayvanlardaki enfeksiyonlardan sorumludur. Diğer *S. enterica* serotipleri ve *S. bongori* genellikle soğuk kanlı hayvanlardan ve çevreden izole edilmektedir (Agbaje vd. 2011).

Bu cinsin en kalabalık grubunu yaklaşık 1600 serovar ile *Salmonella enterica* subsp. I oluşturmaktadır. Dolayısıyla, *enterica* alttürüne ait serovarların neden olduğu rahatsızlıkların halk sağlığı üzerinde bir yük olmasının yanı sıra ekonomik olarak etkileri de büyüktür. Bu serovarlardan tifoidal olanlar, tifoidal olmayanların aksine, insanı konak olarak belirlemiş ve tamamen adapte olmuştur. Tifo ve paratifoya neden olan serovarlar enterik ateşinin sorumlusudur ve bu sistematik hastalık dünya çapında çok fazla vaka ve ölümle sonuçlanmakta ve genellikle gelişmekte olan ülkelerde endemiler şeklinde seyretmektedir. Ancak tifoidal olmayan salmonelloz vakaları dünyanın her yerinde görülmekte ve nedeni olan serovarlar kimi zaman gastroenterite neden olmakta kimi zamansa bakteriyemi ve fokal sistemik enfeksiyonlarla ilerleyen ekstra intestinal hastalıklara yol açmaktadır. Bu serovarlardan bazılarının invazyon yetenekleri çok belirgindir ve bu da bazı sekonder veya koenfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır.

2.2 *Salmonella* Genel Özellikleri

Gram negatif olan bu bakteri basil şeklinde ve yaklaşık olarak 0,7 – 1,5 µm genişliğinde 2,0 – 5,0 µm uzunluğunda ve sporsuzdur (Özalp 2012, Tessari vd. 2012). *Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum* hariç peritriş flagella ile hareket ederler (Mølbak vd. 2006, Özalp 2012).

Yumurta ve kümes hayvanlarının eti *Salmonella* enfeksiyonlarının ana kaynağını oluşturmaktadır. Bunların yanında, kırmızı et, süt ve süt ürünleri, meyve ve sebzeler, hatta balıkçılık ürünleri de *Salmonella*'nın taşınmasına aracılık yapmaktadır. *Salmonella* ile enfekte olmuş hayvan etlerinin tüketilmesi salmonelloz vakalarının kaynaklarından biridir. *Salmonella*'nın genellikle, gıda üretiminin yapıldığı yüzeylerden bulaştığı kabul edilmektedir ancak ana bulaş yolu hayvan kaynaklı fekal kirlilik de olabilir. Bulaş yollarının dışında depolama sıcaklığı ve yetersiz pişirme gibi nedenler de salmonelloz vakalarına zemin oluşturmaktadır. Gıda zincirinde neden olduğu bu kontaminasyonlar

göz önüne alındığında bu bakterinin hayatta kalması ve üremesini sınırlayan ekolojik faktörler de önem kazanmaktadır. *Salmonella*'nın üremesi için en düşük sıcaklığın 7 °C olduğu belirtilmektedir, ancak 15 °C altında üreme düşüktür. Bunun yanında *S. Heidelberg* 5,3 °C'de üreyebilmesi ile bir istisnadır (Giaccone vd. 2011). Ayrıca *S. Typhimurium* 6,2 °C ve 45 °C aralığında yaşayabilmektedir ancak bu aralık dışı sıcaklıklar bu bakteri için bakterisidal bir etki göstermektedir (Gómez-Aldapa vd. 2012). Maksimum üreme sıcaklığı ise 49,3 °C'dir; bu eşik geçildiğinde, hücre duvarı bileşenlerinin denatürasyonu ve ısıya duyarlı enzimlerin inaktivasyonu nedeniyle *Salmonella* ölmeye başlar (Giaccone vd. 2011). Sonuç olarak, *Salmonella spp.* için optimum sıcaklık değeri 35 - 43 °C aralığındadır.

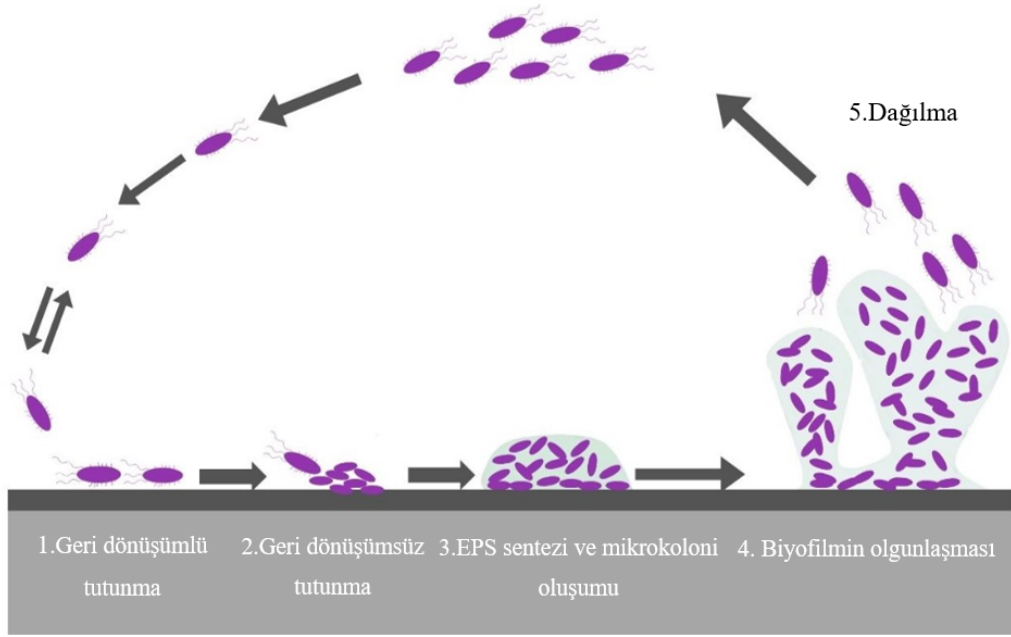
Salmonella için gerekli en düşük mevcut nem miktarı 0,94'tür (Giaccone vd. 2011, Gómez-Aldapa vd. 2012, Olgunoğlu 2012). *Salmonella* dehidrasyon koşullarında uzun süre hayatta kalabilmektedir. Bu çikolatanın da içinde olduğu tatlılardan kaynaklı gıda zehirlenmesi salgılarında tespit edilmiştir (Giaccone vd. 2011). Ayrıca yaşaması için maksimum tuz konsantrasyonu % 0,4 – 0,5 arasındadır (Olgunoğlu 2012). Tuz konsantrasyonunun % 3 ile % 4 arasında olduğu koşullarda ise *Salmonella* üremesi genellikle durur (Giaccone vd. 2011).

Salmonella'nın yaşaması için maksimum asidik pH 3,8 olarak nitelendirilmektedir ancak bu asidin türüne bağlıdır (Giaccone vd. 2011). *Salmonella* asetik asit ve laktik asite hassastır; sitrik asite karşı görece direnç göstermektedir (Giaccone vd. 2011). Ayrıca bu patojenin mide asidinde hayatta kalarak bağırsağa geçmesi de minimum pH söz konusu olduğunda göz önünde bulundurulmalıdır. *Salmonella* 4,0 ila 9,5 pH aralığında üreyebilmektedir ancak en uygun pH, nötral pH civarı değerlerdir (Giaccone vd. 2011, Gómez-Aldapa vd. 2012).

2.3 Biyofilm Yapısı ve Oluşum Aşamaları

Biyofilmler; bir veya birden fazla türün oluşturduğu abiyotik ve biyotik yüzeylere tutunmuş ve kendileri tarafından sentezlenen bir ekstra polimerik matriks (EPS) ile sarılmış çok hücreli benzeri bir yaşam formu olarak tanımlanabilirler (Costerton 1999,

Donlan ve Costerton 2002, Hall-Stoodley vd. 2006, Stewart ve Franklin 2008, Homoe vd. 2009, Flemming ve Wingender 2010, Akçelik ve Akçelik 2022). In vitro ortamların aksine doğal ortamlarda, biyofilm neredeyse her zaman, belirli bir amaçla bir araya gelen ve ayrılan, genetik materyalini yüksek oranlarda paylaşan ve biyofilm içindeki tüm farklı nişleri paylaşan mikroorganizmaları barındıran çok türlü bir mikrobiyal topluluktur (Watnick ve Kolter 2000)



Şekil 2.2 Biyofilm aşamaları

Mikroorganizmalar, yaşayan dokularda, kalıcı katater ve hatta platin protezlerde, endüstriyel ya da içilebilir su sistemleri borularında veya doğal su ortamlarında biyofilm oluşturabilirler (Donlan 2001, Donlan 2002). İnsanlarda, tüm hastane enfeksiyonlarının % 65’den fazlasını biyofilm kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Consterton vd. 1999, Donlan 2001, Davies 2003, Douglas 2003, Ramage vd. 2006, Hall-Stoodley ve Stoodley 2009). Biyofilmlerin neden olduğu hastalıklar arasında diş çürümesi, diş eti çekilmesi, orta kulak iltihabı, kronik yaralar ve endokardit örnek olarak sıralanabilir (Hall-Stoodley vd. 2006, Ramage vd. 2006, Homoe vd. 2009, Percival vd. 2011).

Biyofilm oluşumu iyi tanımlanmış ve ayırt edilebilir aşamaları içermektedir. Bu aşamalar temelde, dönüşümlü ve dönüşümsüz tutunmayı içeren erken oluşum aşamaları daha sonra

hücre kümeleri ve mikrokolonilerin inşa edilmeye başlanmasıyla sınıflandırılan orta aşama veya olgunlaşma aşaması ve bu kolonilerin oluşturduğu üç boyutlu ve genellikle mantar şeklinde tanımlanan olgun biyofilm yapısı ve devamında biyofilmin dağılmasıyla sonlanan geç aşamalarıdır.

Biyofilm oluşumunun başlaması için bahsi geçen erken oluşum aşaması şarttır. Bu aşama temel olarak; mikroorganizmaların uygun yüzey bulmaları ve bu yüzeye, rastlantısal olan Brown hareketi ve çoğunlukla flagella aktivitesini rol oynadığı kemotaksis hareketleri aracılığıyla yaklaşılması ile başlar. Uygun mesafeye ulaşıncaya tutunma başlar. Mikroorganizmaların katı yüzeylere tutunmalarında farklı yaklaşımlar öne sürülmüştür. Bunlardan en çok kabul göreni ve geçerli olanı iki aşamadan oluşmaktadır (Marshall vd. 1971). İlk tutunmaya izin verecek kadar yakınlaşmış hücreler ile yüzey arasında Van der Waals güçleri, elektrostatik güçler ve hidrostatik etkileşimler kurulur ve böylece geri dönüşümlü bir tutunma meydana gelir. İkinci ve olmazsa olmaz aşama ise Dunne tarafından (2002) bakterilerin kendilerini ekzopolisakkarit üretimi ve/veya fimbriya gibi spesifik ligandların yüzeye kompleks oluşturmasıyla yüzeye kilitlenmeleri şeklinde tanımlanan geri dönüşümsüz tutunmadır. Tersinir tutunmadan geri dönüşümsüz tutunmaya geçişte, kovalent ve hidrojen bağlarının yanı sıra hidrofobik etkileşimler de dahil olmak üzere çeşitli kuvvetler söz konusudur (Palmer vd. 2007).

Geri dönüşümsüz tutunmadan sonra mikroorganizmalar kümelenerek kendi ürettikleri hücre dışı matriks ile sarılmış mikrokolonileri oluşturur. Hücre dışı matriksin sentezi, biyofilm oluşumu ve sürdürülmesi için kritiktir. Bu süreç, yüksek sıcaklık, besin kıtlığı, çok alkali veya asidik ortam, uzun süre UV maruziyeti, antibiyotikler, deterjanlar veya antimikrobiyallerin varlığı ile tetiklenir. Hücre dışı matriks yüksek oranda su ve polisakkaritleri, proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri içeren ekstra polimerik maddeden (EPS) oluşur (Flemming ve Wingender 2010). EPS'nin içeriği biyofilmi oluşturan mikroorganizmalara, etkilenen koparılma kuvvetine, sıcaklık ve besin varlığına göre değişiklik göstermektedir (Flemming ve Wingender 2010). EPS'nin şeker içeriği mikroorganizmalar arasında çeşitlilik gösterir. Örneğin, *E. coli* suşu için ana polisakkarit kolonik asit iken, *Pseudomonas aeruginosa* için aljinat, *Bacillus subtilis* için levan olan şeker *S. epidermidis* için ise N-asetil glukozamindir. İlk aşamalarda az miktarda olan EPS

üretimi biyofilm oluşum sürecinin ileri aşamalarında artar ve çevresel stres koşullarında bu kolonileri stabilize eden bir yapı görevi görür.

Farklı genlerin ekspresyonun biyofilm olgunlaşmasında rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalara örnek olarak Domka ve arkadaşları (2007) tarafından *E. coli* K12 bakterisi ile gerçekleştirilen analiz 4-24 saat aralığında % 7,7'den fazla genin indüklendiğini ve aynı zaman aralığında planktonik hücrelerde genomun % 2,7'sinin represe olduğu gösterilmiştir. Bu durum *E. coli* biyofilmine katılan hücrelerin planktonik hücrelerden metabolik olarak daha aktif olduğuna işaret etmektedir. Benzer bir çalışma ise biyofilmler için model sayılabilecek *P. aeruginosa* ile Waite ve arkadaşları (2005) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ise biyofilmin erken aşamaları sayılabilecek zaman aralıklarında ekspresyon artış gösterirken olgunlaşma olarak sınıflandırabileceğimiz zaman aralığında ekspresyon sabit kalmaktadır. Ancak diğer çalışmada da olduğu gibi biyofilmdeki gen ekspresyonu süspansyondan daha fazladır. Özetle tutunmadan sonra biyofilm oluşumunun başlaması ve olgunlaştırılması planktonik formdan farklı genlerin ifade olması veya bazılarının daha yüksek oranda ekspresyonu ile sağlanmaktadır dolayısıyla biyofilmin esasını genetik yeniden programlama oluşturmaktadır.

Bu paralelde, biyofilmin dağılmasında da bazı gen ifade değişiklikleri rol oynamaktadır. Organizmalar biyofilm yapısı içerisinde farklı konumlarda kalırlar ve besin, oksijen, atık ve özellikle ekstraselüler sinyal konsantrasyonu açısından farklı çevreler deneyimlerler ve bu durum çeşitli stres cevap faktörlerini indükler (Rumbaugh ve Sauer 2020). Bu cevaplardan en bilineni RpoS bağımlı genel stres cevabıdır. Özetle dağılma, biyofilmdeki canlı hücrelerin iç ve dış uyaranlara karşı fizyolojik olarak düzenlenmiş bir cevap olarak yapıdan ayrılmasıdır (Davies 2011). Yerel uyaranlarla sağlanan dağılma, organizmaların kendi sentezledikleri moleküller ve işaretlerle gerçekleştirilirken çevresel olarak indüklenen dağılma mevcut çevrede algılanan faktörler ve değişen çevreye cevaplarla sağlanır (Rumbaugh ve Sauer 2020). Tüm bu aşamalarda biyofilmin sıklık ve aktif bir süreç olması nedeniyle yapının arayüzünden ayrılmalar gerçekleşmektedir. Ancak dağılma esnasında orta tabakalarda gerçekleşen ayrılmalar, biyofilm yapısında boşluklara neden olabilir (Rumbaugh ve Sauer 2020). Ayrılan bu hücreler şartlar uygun olduğu takdirde yeni bir biyofilm döngüsü başlatabilirler (Şekil 2.2).

2.3.1 *Salmonella* biyofilm yapısı

Salmonella'nın oluşturduğu yüzeyle ilişkili komünite formu olan biyofilm, bu bakterinin konak içi ve konak dışı ortamlardaki direncinde ve hayatta kalmasında önemli rol oynar. *Salmonella*, çiftliklerde, mezbahalarda, gıda endüstrisindeki tezgahlarda, mutfak, tuvalet ve banyoda bulunan plastik, kauçuk, çimento, cam ve paslanmaz çelik gibi çok sayıda abiyotik yüzeyde biyofilm oluşturabilmektedir (Joseph vd. 2001, Prouty ve Gunn 2003, Stepanovic vd. 2004, Giaouris ve Nychas 2006, Arnold ve Yates 2009, Vestby vd. 2009). *Salmonella*'nın biyofilm oluşturabilme kabiliyeti, kuruma ve dezenfektanlara karşı bakteriyi daha dirençli bir hale getirir ve böylelikle esas konağına ulaşmaya dek bu yüzeylerde hayatta kalabilir. Bu abiyotik yüzeylerin yanında *Salmonella*'nın çok sayıda bitkinin, tohum, yaprak, kök ve hatta meyve kısımlarına kolonize olabildiği gösterilmiştir (Mahon vd. 1997, Campbell vd. 2001, Klerks vd. 2007). Bu durum bitkileri, *Salmonella*'nın konakları arasında yayılımı için bir tip vektör yapar. *Salmonella*'nın biyofilm oluşturduğu iyi bilinen diğer bir biyotik yüzey ise safra taşlarıdır. Tifo etkeni olan *S. Typhi*, makrofajlara invaze olarak bu hücreler aracılığıyla karaciğere taşınır ve oradan da vücuda yayılır (Tsolis vd. 2008). *S. Typhi* ile enfekte kişilerin yaklaşık % 5'i asemptomatik kronik taşıyıcı haline gelir (Steenackers vd. 2011). Bu asemptomatik taşıyıcılar tarafından *Salmonella*'nın yayılması, özellikle az gelişmiş ülkelerde gıda ve su kaynaklarını kirletebilir ve bu nedenle tekrarlayan *Salmonella* enfeksiyonlarının kaynağı olabilir.

Salmonella ekstraselüler matriks bileşenleri, biyofilmin oluşturulduğu çevre şartlarına göre çeşitlilik göstermektedir. Yapıdaki temel bileşenler curli fimbriya (*csgDEFG-csgBAC*) (Römling vd. 1998), BapA (*bapABCD*) (Latasa vd. 2005), selüloz (*bcsABZC-bcsEFG*) (Zohaj vd. 2001), O-Ag kapsülü (*yihU-yshA* ve *yihVW*) (Gibson vd. 2006), ve LPS'dir (de Rezende vd. 2005). Bunların yanında, Tip 1 fimbriya (*fim*), plazmiden kodlanan fimbriya (*pef*), uzun polar fimbriya (*lpf*), bovin kolonizasyon faktörü (*bcf*), Sth fimbria (*sth*), kolanik asit (*wca* ve *wza*, *wzb*, *wzc*), flagella ve Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS)'de yapıda rol alabilir (Prouty ve Gunn 2003). Bu bileşenlerin ifadesi, *Salmonella* türüne özeldir ve temas yüzeyinden etkilenir (Römling vd. 2003).

1980'lerin sonlarında *E. coli* suşlarında keşfedilen curli, yüzeylere tutunma, hücre toplanması, biyofilm oluşumu ve konak hücreye tutunma ve invazyonda önemli bir rol oynar (Barnhart 2006). *csgBAC* ve *csgDEFG* operonları tarafından kodlanır. *csgBAC* operonu, ana yapısal alt birim olan CsgA'yı ve CsgB'yi kodlar. *csgDEFG* operonu ise, curli fimbriya için gerekli olan aksesuar proteinleri kodlar (Collinson vd. 1996).

$\beta(1-4)$ -bağlı D-glikoz birimlerinden oluşan bir polisakkarit olan selüloz, *Salmonella* biyofilmlerinde sentezlenen önemli bir ekzopolisakkarittir. Curli ile birlikte üretimi, hidrofobik bir ağ ile kaplanmış, sıkı bir şekilde paketlenmiş hücrelerden oluşan bir matrisi inşa eder. Selüloz biyosentezi, selüloz üretimini aktive eden AdrA'nın transkripsiyonunu uyaran CsgD tarafından düzenlenir. AdrA, ya *bcs* operonları ile doğrudan etkileşime girerek ya da bis-3'-5'-siklik dimerik guanozin monofosfat (c-di-GMP) ile dolaylı etkileşime girerek selüloz üretimini aktive eder (García vd. 2004).

Biyofilm oluşumu için gerekli olan büyük bir hücre yüzeyi proteini olan BapA, *bapA* geni tarafından kodlanır ve Tip I Protein Sekresyon Sistemi (TISS) yoluyla sekrete edilir (Latasa vd. 2005). Ekspresyonu, *csgD*'nin etkisiyle, kıvrımlı fimbriya ve selülozu kodlayan genlerin ekspresyonuyla koordine edilir.

Salmonella, fimbriya ve selülozla ilişkili O kapsüller antijenini üretir. *yihU-yshA* ve *yihVW* operonları kapsül birleştirilmesi ve translokasyonundan sorumludur ve bu süreç yine CsgD tarafından regüle edilir. O antijeni tutunma ve çevresel kalıcılıkta önemli bir rol oynar (Barak vd. 2007).

Hücre dışı DNA (eDNA), *Salmonella* biyofilmlerinin bir matriks bileşenidir. Ancak *Salmonella*'nın abiyotik yüzeylerde biyofilm gelişimi sırasında engelleyici ve istikrarsızlaştırıcı bir etkiye sahip olabilir. Bu durum Özdemir ve arkadaşlarının (2018) bulguları arasında yer almaktadır. 17 farklı *Salmonella* serovarında, eDNA'nın, ilkin bakteriyel adezyonda, biyofilm yapısında ve olgun biyofilmlerdeki etkisini test etmek üzere yaptıkları çalışmada ilk tutunmada eDNA'nın bazı serovarlarda belirgin şekilde negatif bir etkiye sahip olduğu ve eDNA'nın bu inhibe ve stimüle edici etkisinin serovara bağlı olduğu gösterilmiştir.

Salmonella biyofilmlerinin yapısal bileşenleri ve sentezi çok karmaşık bir regülasyon ağı ile düzenlenmektedir.

2.3.2 *Salmonella* biyofilm regülasyonu

Salmonella'da biyofilm oluşumu öncelikle LuxR ailesinin bir üyesi olan CsgD proteini tarafından düzenlenir (Liu vd. 2014). CsgD, fosforilasyon için bir hedef olabilecek korunmuş bir aspartat (D59) içeren bir N-terminal alıcı alanına ve bir C-terminal LuxR benzeri sarmal-dönüş-sarmal DNA bağlanma motifine sahiptir. Fosforile edilmemiş CsgD, transkripsiyonu aktive etmek için doğrudan *csgBA* ve *adrA* promotor bölgelerine bağlanır (Zakikhany vd. 2010). OmpR, RpoS, RpoE, IHF, H-NS ve MlrA dahil birçok faktör *csgD*'nin promotor dizisine bağlanır ve transkripsiyonunu düzenler.

OmpR (dış membran proteini R) tanımlanan ilk karşı-etkili (trans-acting) regülatörlerden biridir ve *csgD* promotorunun regülasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Römling vd. 1998b). OmpR, EnvZ (membrana bağlı sensör kinaz) iki elemanlı regülasyon sisteminin ana bileşenleridir ve osmolarite ve pH gibi çevresel değişikliklere yanıt verebilir. *ompR* mutantlarının selüloz ve curli üretime yeteneğini kaybettiği dolayısıyla da biyofilm yapısı oluşturmamaları gözlemlenmiştir (Dong vd. 2011, Lu vd. 2012).

RNA polimerazın alternatif bir sigma faktörü olan RpoS, stresli koşullar altında bakteriyel dayanıklılık için kritik öneme sahiptir ve belirli *S. Typhimurium* suşlarında *csgD* promotorunun transkripsiyonel aktivasyonu için gereklidir (Römling vd. 1998). Hamilton ve arkadaşları (2009) *S. Typhimurium* *rpoS* regülununun % 25'inden fazlasının silikon ve kauçuk üzerindeki biyofilm hücrelerinde upregüle edildiğini bulmuştur. White ve arkadaşları (2010) ise *rpoS* transkripsiyonunun, *S. Typhimurium* doğal tip hücrelerinde *csgD* mutant hücrelerine kıyasla neredeyse üç kat daha yüksek olduğunu keşfetmiştir. Benzer şekilde, *S. Typhimurium* *rpoS* mutantları, CR (Kongo Kırmızısı) plakalarında değişmiş morfortipler gösterdiği ve safra taşları, cam ve polistiren gibi çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşumuyla ilgili sorunlar yaşadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Prouty ve Gunn 2003, Römling vd. 2003, Hamilton vd. 2009). Bu bulgular, karmaşık biyofilm ortamında hücrelerin hayatta kalmasında RpoS'nin önemini vurgulamaktadır.

Diğer bir düzenleyici olan RpoE, *Salmonella*'da ince agregatif fimbriyaların ekspresyonunda rol oynar ve bunun delesyon mutanlığı, önemli ölçüde azalmış miktarda *csgD* ekspresyonu ve bu ölçüde değişmiş biyofilm oluşumu gösterir (Huang vd. 2015).

Histon benzeri bir heterodimerik protein olan IHF, DNA'nın küçük oluşuna bağlanarak tanımlanmış bir DNA dizisi ile etkileşime girer. IHF mutantları değiştirilmiş ve azaltılmış biyofilm morfolojilerini gösterir (Gerstel vd. 2003). IHF, H-NS'nin aksine konsensüs dizilerine bağlanır ve DNA bükülmesinden sonra transkripsiyonun aktivasyonunu veya baskılanmasını kolaylaştırabilir (Steenackers vd. 2011). H-NS, intergenik *csgBAC* ve *csgDEFG* bölgelerinde AT açısından zengin bölgeleri bağlamayı tercih eder ve *csgD* promotorunu orta derecede aktive ederken aksine intergenik *csgB-csgD* bölgesinde AT açısından zengin kısımlara spesifik bağlanmasıyla baskılayıcı bir etki de göstermektedir (Gerstel vd. 2003).

MlrA, *S. Typhimurium*'un RpoS'ye bağımlı curli ve hücre dışı matris üretiminin pozitif düzenleyicisi olarak görev yapar. Dolayısıyla *mlrA* geninin inaktivasyonu curli üretiminin kaybıyla sonuçlanır (Brown vd. 2001).

Özetle, biyofilm oluşumunun düzenlenmesi, *csgD* promotor bölgesi ile etkileşime giren birden fazla protein ve faktörü içeren karmaşık bir süreçtir. Farklı *Salmonella* suşları farklı düzenleyici mekanizmalara sahip olabilir ve bu düzenleyici proteinlerdeki mutasyonlar biyofilm oluşumunu önemli ölçüde etkileyebilir. Ayrıca, CsgD sentezi, transkripsiyon sonrası seviyede, RNA şaperonu Hfq aktivitesi sonucu bozulmaya karşı korunan küçük RNA'lar (sRNA'lar) tarafından da düzenlenir. Bu sRNA'lar *csgD* gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyebilir, bu da mRNA'nın translasyonunun inhibisyonuna veya bozulmasına neden olabilir (Mika ve Hengge 2013).

Bunların yanında, c-di-GMP, bakterilerin hareketli, serbest yüzen bir durumdan sabit, biyofilm yaşam tarzına geçişinde çok önemli bir rol oynayan evrensel bir bakteriyel ikincil habercidir. Hücre içindeki yüksek c-di-GMP seviyeleri, hücre dışı matriksin üretimini ve biyofilm oluşumunu teşvik ederken, hareketliliği baskıladığı; düşük c-di-GMP seviyeleri matriks üretimini baskıladığı ve bireysel hücre hareketini aktive ettiği belirlenmiştir (Römling vd. 2005). *S. Typhimurium*'daki yüksek hücre içi c-di-GMP

seviyeleri, invazyonun engeller. Bu inhibisyon, ana biyofilm aktivatörü CsgD ve/veya BcsA'yı gerektirir. Bu nedenle c-di-GMP sinyali, biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde olduğu kadar, *Salmonella* ile konakçı arasındaki etkileşimin düzenlenmesinde de önemlidir (Ahmad vd. 2011).

Gamaproteobakteriler içinde korunan BarA/SirA iki bileşenli sistemi, *Salmonella*'nın virülansı, hareketliliği ve biyofilm oluşumunda rol oynayan diğer önemli küresel düzenleyici sistemdir (Teplitski vd. 2006). SirA, sensör kinaz BarA veya hücresel asetil fosfat tarafından fosforile edilen FixJ ailesinin (CsgD gibi) bir yanıt düzenleyicisidir (Altier vd. 2000). *Salmonella*'da safra tuzları ve kısa zincirli yağ asitleri BarA/SirA aracılı yanıtları etkiliyor gibi görünmektedir (Lawhon vd. 2002). Bu sistem, hareketlilik, karbon depolama, virülans, ikincil metabolizma ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli fenotipleri kontrol eden çok önemli bir düzenleyici sistemdir (Jonas vd. 2010).

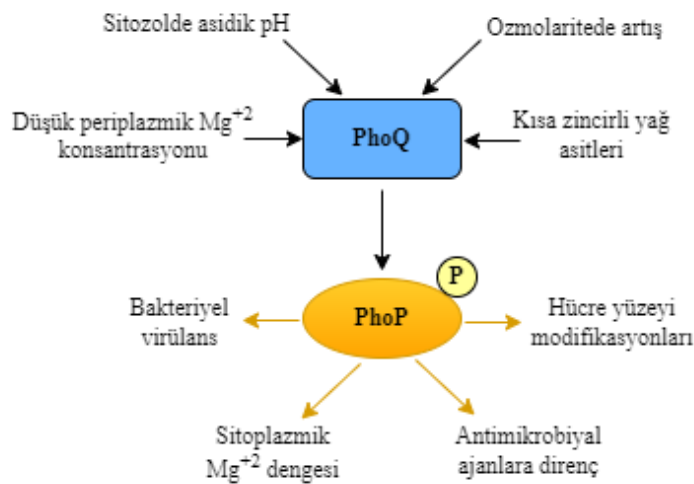
Diğer bir düzenleyici sistem ise RcsC–RcsD–RcsB sistemidir. Stres faktörleri ve belirli mutasyonlar tarafından etkinleştirilir. Aktivasyon, gen ekspresyonunda değişikliklere yol açarak kapsül sentezini teşvik eder ve flagella sentezi ve virülans genlerini baskılar (Mariscotti vd. 2009). *Salmonella* biyofilminin gelişimi RcsB'nin fosforilasyon durumuna bağlıdır. Fosforile edilmemiş RcsB, biyofilm matriks bileşiklerinin ekspresyonunu aktive ederken, fosforile edilmiş RcsB, CsgD ekspresyonunu baskılayarak biyofilm gelişimini inhibe eder. Bu baskılama sRNA RprA'nın birikmesine bağlıdır (Latasa vd. 2012).

Salmonella biyofilm yapısını düzenleyen diğer önemli bir regülatör ise Quorum Sensing (QS) sistemidir. *Salmonella*'da bu sistemin üç tipi bulunur bunlar; asil-homoserin lakton (AHL), otoindükleyici-2 (AI-2) ve otoindükleyici-3 (AI3-3). Bunlar biyofilm yapısının regülasyonunda rol oynarlar. İlk grupta olan AHL'lere cevap veren SdiA *Salmonella* biyofilm yapısında direkt rol almamakta ancak bu protein tarafından regül edilen genlerin biyofilm görev aldığı öngörülmektedir. Ancak ikinci sistemin bir parçası olan AI-2 sentezinde görev alan LuxS enzimi biyofilm regülasyonunda görev almaktadır. Bu genin insersiyonu dağılmış bir biyofilm yapısına neden olurken delesyonuyla biyofilm yapısı bozulmaktadır (Jesudhasan vd. 2010). Bu sistemin üçüncü parçası ise QseB/C iki

bileşenli regülatör sistemidir ve bu sistemin eksikliğinin biyofilm üretiminde düşmelerle sonuçlandığı gösterilmiştir (Ji vd. 2017).

2.3.3 PhoPQ iki bileşenli regülatör sistemi

Salmonella biyofilmlerinin karmaşık regülasyon sisteminin bir parçası olduğu bilenen diğer bir regülatör sistem ise PhoP-PhoQ iki bileşenli sistemidir ve bileşenleri, sırasıyla 224 ve 487 amino asitlik polipeptitlerdir (Miller 1991, Vécovi vd. 1994). *Salmonella*'daki PhoPQ regülasyon sistemi, hücre içi yanıt düzenleyici PhoP ve iç zarda yer alan sensör kinaz PhoQ'yu içeren iki bileşenli bir sistemdir (Kato ve Groisman 2008). *Salmonella* PhoP proteini, OmpR düzenleyici ailesinin bir üyesidir ve fosforilasyon yolu ile bir cevap düzenleyici işlevi görür. PhoQ ise kinaz ve fosfataz aktivitesine sahip iki işlevli bir proteindir (Kato ve Groisman 2008). Bu sistem, PhoQ'nun otofosforilasyonunu ve fosfatın PhoP proteinine transferini tetikleyen düşük Mg^{+2} konsantrasyonuyla etkinleştirilir (Vécovi vd. 1996, Castelli vd. 2000, Chamnongpol vd. 2003, Shin ve Groisman 2005). PhoPQ sistemi, düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, bazı antimikrobiyal peptidler, periplazmik domainde uzun zincirli doymamış yağ asitleri, sitoplazmada orta asidik pH ve transmembranda domainlerinde osmolaritedeki bir artış gibi çok fazla çevresel değişiklikle aktive edilir (Groisman vd. 2021, Şekil 2.3).



PhoQ sensörü siyahla gösterilen sinyallerle etkinleştirilir. PhoQ tarafından fosforilasyon üzerine, düzenleyici PhoP turuncu renkle gösterilen aktiviteleri kontrol eder (Groisman vd. 2021).

Şekil 2.3 PhoP/PhoQ iki bileşenli sistemi düzenlenmesi

PhoP/Q sistemi, H-NS, SlyA, Rcs, MgrB ve RstB dahil olmak üzere çeşitli hücrel düzenleyiciler tarafından transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel olarak düzenlenir (Tierrez vd. 2004, Navarre vd. 2005, Song vd. 2008, Lippa vd. 2009). Aynı zamanda PhoP/Q sistemi kendi transkripsiyonunu pozitif olarak regüle eder ve bunun *Salmonella* virülansı için kritik olduğu gösterilmiştir (Kato ve Groisman 2008).

Tanımlanmış PhoP regülunu tarafından düzenlenen genler için bazı prensipler ortaya konulabilir. İlk olarak PhoP-PhoQ regülatörü, Mg^{+2} sınırlandığı ortamlarda adaptasyona aracılık eder. İkincisi, PhoP-PhoQ birçok Gram-negatif türde virülansı yönetir. Üçüncüsü, PhoP tarafından düzenlenen genlerin çoğu türe özgüdür ve mikroorganizmaya benzersiz özellikler kazandırır. Ve dördüncüsü, PhoP-PhoQ, bakteri hücre zarındaki birçok bileşenin modifikasyonunu yönetir (Groisman 2001).

Genellikle, iki bileşenli sistemler ailesinin transkripsiyonel düzenleyicilerinin, kontrol ettikleri genlerin transkripsiyonunu aktive etmek veya bastırmak için belirli DNA dizilerine bağlandığı varsayılır (Véscovi vd. 1994). PhoP/PhoQ tarafından aktive edilen genlerin promotor bölgesinde, (T/G)GTTTA tekrarı içeren “pho kutusu” bulunur ve PhoP bu yolla ekspresyonu sağlar (Véscovi vd. 1994, Groisman 2001, Kato ve Groisman 2008). DNA'ya bağlandıktan sonra PhoP-P, PhoP ile aktive edilen genlerin (*pag*) transkripsiyonunu artırır ve PhoP ile repress edilen genlerin (*prg*) transkripsiyonunu azaltır (Yin vd. 2009, Groisman vd. 2021). PhoP tarafından aktive edilen genlerden birisi de bu tezin konusu olan *pagN* genidir. PhoP aktive edildikten sonra 120'den daha fazla genin ekspresyonunu hem doğrudan hem de dolaylı olarak kontrol eder. PhoP-PhoQ sistemi, *Salmonella* genomunda kodlanan açık okuma çerçevelerinin (ORF) yaklaşık % 1'ini oluşturan *Salmonella*'daki en az 40 proteinin ekspresyonunu yönetir (Groisman 2001). Bu genler, LPS modifikasyonu, magnezyum taşınması, epitel hücrelerine invazyonda ve makrofaj içi hayatta kalma gibi çeşitli işlevlerde rol oynar (Charles vd. 2009).

İç membran PhoQ sensör kinazın çevresel aktivasyonu, sitoplazmik cevap regülatörü olan PhoP'nin fosforilasyonunu artırır. Fosforile olmuş PhoP, dış membran proteinlerini kodlayan genleri, regülatörleri, intrasellüler Tip III Sekresyon Sistemi komponentlerini, sistolik pH için tampon görevi gören iç membran taşıyıcılarını ve dış membran bariyer

komponentlerini kovalent olarak modifiye eden enzimleri aktive ederken flagellar ve invazyonla ilişkili Tip III Sekresyon Sistemi efektörlerini kodlayan genleri baskılar (Dalebroux ve Miller 2014).

PhoPQ iki bileşenli regülatör sistemi tarafından ifadesi düzenlenen genlerin biyofilm oluşumuyla ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Adams vd. 2001, Prouty ve Gunn 2003, Park vd. 2015).

2.4 *Salmonella* Adezinleri

Adezinler, patojenik bakterilerin, kolonizasyonu ve yayılımı için kritik bir virülans faktörüdür (Hansmeier vd. 2017). Kolonizasyon, planktonik veya hücre agregatlarının adezyonu ile başlar. Abiyotik yüzeylere adezyon, spesifik olmayan etkileşimlerle yürütülebilirken biyotik yüzeylere adezyon, spesifik reseptör-ligand ilişkileri gerektirmektedir (Berne vd. 2015). Adezyonun ilk aşaması planktonik hücrelerle yüzeyin ya da substratın fiziksel veya kimyasal etkileşimidir (Hermansson 1999). Bu fizikokimyasal etkileşimler; kovalent bağlar, Van der Waals kuvveti, elektrostatik kuvvetler ve asit-baz etkileşimleridir. Güçlü tutunma, kovalent bağlar ve iyonik bağlarla gerçekleştirilebilir ancak hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri gibi zayıf bağlar yapıyı güçlendirebilir ya da çok sayıda ise güçlü tutunma sağlayabilir (Berne vd. 2015). Enterik bakterilerin intestinal bariyerdeki mukozal yüzeylere kolonizasyonu ve penetrasyonu için adezinler esastır (Bäumler vd. 1997). Hedeflenen hücre tipiyle ilkin etkileşime geçen adezinler, epitel hücrenin sinyal yollarının değiştirilmesi gibi konak-parazit ilişkilerinde önemli roller üstlenebilirler (Bäumler vd. 1997).

Salmonella bağırsağa geçtikten sonraki konak dokuya adezyonu patojenite için en önemli aşamadır. Patojen ve konak hücre arasındaki ilk sıkı bağlantı; biyofilm oluşumu, protein translokasyonu, hücreye giriş ve sonraki sistemik yayılma gibi ileriki fazların tetiklenmesi için ön aşamadır (Wagner ve Hensel 2011). *Salmonella*'nın yüzeylere tutunmasında çeşitli yapılar rol oynar. Bu adeziv yapılar fimbriyal ve fimbriyal olmayan adezinler olarak temel olarak iki grupta sınıflandırılır ve birleştirilme yollarına göre farklılaşırlar (Soto ve Hultgren 1999).

S. enterica, serotipine bağılı olarak, 13 kadar fimbriyal ve en az yedi fimbriyal olmayan adezin kodlayabilir (Hansmeier vd. 2017). Bu iki gruba ek olarak esas işlevlerinin yanında tutunmada da önemli rolleri olan bazı polisakkaritlerden bahsetmek de mümkündür.

2.4.1 *Salmonella*'nın fimbriyal adezinleri

Fimbriyalar, protein yapıdaki yüzey uzantılarıdır (Wagner ve Hensel 2011). Gram negatif bakteriler için önemli olan bu yüzey yapısı çeşitli çok sayıda alt ünitelerden oluşur ve spesifik interaksiyonlar ile reseptörlere tutunmayı sağlarlar (Amono 2010). Fimbriyal adezinlerin alt üniteleri, farklı sistemlerle birleştirilirler. Bunlar; şaperon – yer gösterici yolağı (CUP), ekstraselüler nükleasyon yolağı ve Tip II Sekresyon Sistemine benzer bir sistemle çalışan tip IV pili özel yolağıdır.

Fimbriyal operonların dağılımı farklı serovarların çeşitli nişlere adaptasyonunu yansıtmaktadır. Fimbriyalar konakçı hücre bağlanmasında, kolonizasyonda ve biyofilm oluşumunda rol oynar.

2.4.1.1 Şaperon -yol gösterici (Şaperon – Usher) yolağı

Şaperon – yol gösterici yoluyla birleştirilen fimbriyal adezin alt üniteleri N- terminal sekresyon sekansı ile genel sekresyon yolağı (GSP) tarafından periplazmaya sektreye edilir, periplazmada, spesifik şaperonlarla interaksyona girerler ve bu yolla erken birleştirilme veya proteazlar tarafından degrade edilmeleri gibi istenmeyen durumlar engellenir. Aynı zamanda bu şaperonlar, fimbriyal alt üniteleri, bunların birleştirilmesini koordine eden dış membran proteinleri olan yol göstericiye iletir. Birleştirilmesi tamamlanmış fimbriyaların, distal alt üniteleri konakla etkileşime geçen reseptör bağlanma bölgesine sahiptir (Wagner ve Hensel 2011, Rehman vd. 2019).

Bu yolla birleştirilen *Salmonella* için önemli bir fimbriyal adezin tip 1 fimbriyaların bir üyesi olan mannoz duyarlı Fim fimbriyadır. Fim fimbriya, altı gen içeren bir operonda oluşan *fim* gen kümesi tarafından sentezlenir ve bundan bağımsız olarak bağımsız üç gen

tarafından regüle edilir (Zeiner vd 2012). Fimbrial uzantı; FimA, FimC ve FimD olmak üzere ana alt ünitelerinin kompozisyonlarından oluşur. Bu tip fimbriyanın en uç kısmında, konak hücre resptörlerine tutunmasıyla karakterize edilen FimH vardır (Duncan vd. 2005, Holden vd. 2007). Ek olarak, FimH aynı zamanda, a3b1 integrin alt üniteleri ve integral membran glikoproteini, uroplakin gibi diğer konak proteinlerine bağlanabilir (Amono 2010). Şaperon – yol gösterici yolağı ile birleştirilen bu fimbriya, bakterinin, konak mukozal yüzeylerine kolonizasyon, hava-sıvı arafazı gibi akış stresinin bulunduğu ortamlara dayanmasına sağlar. Aynı zamanda biyofilm formasyonunda da rol oynadığı gösterilmiştir (Berne vd. 2015). Bu açılardan tip 1 fimbriya, *Salmonella* virölansı için oldukça önemli bir faktördür.

Tip 1 fimbriyanın yanında şaperon- yol gösterici yolağı tarafından birleştirilen ve genellikle serovar spesifik pek çok başka fimbriya da bulunmaktadır. Örnek olarak; *bcf*, *sdj*, *sdl*, *lpf*, *sef*, *mrk*, *sib*, *pef*, *sdj* genleri tarafından sentezlenen fimbriyalar gibi çok sayıda fimbria mevcuttur (Dufresne ve Daigle 2017).

2.4.1.2 Nükleasyon çökme (Nucleation Precipitation) yolağı

Diğer bir birleştirme yolağı ise nükleasyon çökme yolağıdır. Curli fimbriya bu eşsiz yolla birleştirilir. Curli, otoagregasyonda, çeşitli yüzeylere adezyonda ve biyofilm yapısının oluşturulmasında *Salmonella* tarafından kullanılır. Curli, genellikle ince agregatif fimbriya olarak da isimlendirilen, 6–12 nm çapında ve çeşitli boylarda olabilen fimbriyadır (Berne vd. 2015). *Enterobacteriaceae* familyasında bazı bakteriler bu fimbriyaya sahiptir. Curli fimbriya alt üniteleri *csg* (curli subunit gene) genleri tarafından kodlanır. Bu fimbriyanın biyogenezi *csgBAC* ve *csgDEFG*'nin içinde olduğu çok sayıda operona bağlıdır. *csgBAC* operonu tarafından kodlanan proteinler fimbriyanın yapısal birimlerini oluştururken *csgDEFG* operonu düzenleyici görevindeki proteinleri kodlar (Evans ve Chapman 2014, Rehman vd 2019). CsgA dış membrana katlanmamış çözülebilir bir peptid olarak salınır ve bu protein curli fimbriyanın alt birimlerini oluşturur. CsgB ise çekirdekleyici görevindedir ve CsgA'nın amiloid halde hücre yüzeyini kaplamasını sağlar. CsgC ise bu alt ünitelerin sekresyonunda rol alan küçük bir periplazmik protein oksiredüktazdır. Nükleatör ve alt ünite bir lipoprotein olan por

formundaki CsgG ile dış mebrana sekrete olur. Aksesuar proteinler CsgE ve CsgF ile ise şaperon benzeri bir fonksiyonda davranarak curli fiberlerinin hücre yüzetine düzgün sekrete olmasını ve bağlanmasını sağlarlar. CsgD ise bir pozitif regülatördür ve biyofilm yapısındaki curli ve selüloz üretimini pozitif olarak regüle eder (Amano 2010, Evans ve Chapman 2014, Bhoite vd. 2019, Rehman vd 2019).

2.4.1.3 Tip IV fimbriya yolağı

Tip IV fimbriya ise *Salmonella* fimbriyal adezinlerinin diğer bir grubudur ve çok sayıda bakteriyel patojen bu fimbriyaya sahiptir (Rehman vd. 2019). Tip IV fimbriyalar, bakteriyel virölansla ilişkilendirilen ana adezinlerdir. *Salmonella*'da Tip IV fimbriya yolağı tam olarak karakterize edilememiştir. T4b fimbriya, insanlara adapte olmuş *S. Typhi*'de bulunur (Zhang vd. 2000). *S. Typhi*'deki PilE ve PilS pilus alt birimleri, GSP aracılığıyla periplazmaya taşınır ve iç membrana bağlanır ve N-terminal lider dizisi prepilin peptidazlar PilD ve PilU tarafından kesilir ve ATPaz aracılı pilus depolimerizasyonu gerçekleştirilir (Craig ve Li 2008).

2.4.2 *Salmonella*'nın fimbriyal olmayan adezinleri

Bu tip adezinler bakterilerde çok yaygındır ve büyük çeşitliliğe sahiptir. Fimbriyal olmayan adezinler; ototransporter adezinler, dış membran adezinleri ve Tip I Sekresyon Sistemi (T1SS) tarafından salgılanan büyük monomerik ve oligomerik yapıda, yüzey ilişkili proteinlerdir (Amano 2010, Wagner ve Hensel 2011). Fimbriyal olmayan adezinler, konak yüzeyine, kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler ile tutunmayı sağlar ve aynı zamanda hücre-hücre interaksyonu ve agregasyonda önemli rol oynar. Dahası bu tip adezinler biyofilm matriksi ve bakteri arasındaki ilişkinin kurulması için oldukça önemlidir (Berne vd. 2015). Bu adezinler konak yüzeyinde kollajen, laminin, elastin, proteoglikan, fibrinojen ve fibronektin gibi çok çeşitli ekstraselüler matriks elemanlarını tanıır (Amano 2010).

2.4.2.1 T1SS tarafından sekrete edilen adezinler

Tip I Sekresyon Sistemi, Gram negatif bakterilerde bulunan, çeşitli boyutlarda ve fonksiyonlardaki proteinlerin tek aşamada hücre dışına taşınmasını sağlayan bir translokatördür (Amano 2010). *S. enterica*'da bu sekresyon sistemi tarafından salgılanan, iki tip adezin tanımlanmıştır. Bunlar BapA ve SiiE'dir. Bu adezinler hücre dışına salgılanan *Salmonella* proteomunun en büyük proteinlerdir (Wagner ve Hensel 2011).

Bunlardan BapA (biofilm associated protein) bakteriyel zara bağlı, biyofilm ilişkili proteindir ve biyofilm formasyonun sürdürülmesi için diğer adezinlerle birlikte çalışır. BapA *S. enterica*'da biyofilm ve pelikül oluşumunu destekler ve artırır (Wagner ve Hensel 2011, Latasa vd. 2015). BapA, *bapA* geninin aşağı akışında yer alan tip I protein sekresyon sistemi (BapBCD) yoluyla salgılanır ve hücre yüzeyiyle gevşek bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur (Latasa vd. 2015). BapA'nın ekspresyonu, *csgD*'nin etkisi yoluyla, curli fimbriya ve selülozu kodlayan genlerle koordine edilir.

Buna karşılık SiiE serbesttir ve biyofilm yapısında önem arz eden bir rolü yoktur. Ancak konak-spesifik bir kolonizasyon faktörü olarak hizmet eder (Wagner ve Hensel 2011). *S. enterica*, polarize epitel hücrelerinin apikal tarafına yapışmak için SiiE'yi kullanır. Bu yakın temas, efektör proteinlerin *Salmonella* Patojenisite Adası 1 (SPI1) Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS) yoluyla translokasyonunun aracılık ettiği invazyon için gereklidir. SiiE'nin N-terminal kısmındaki spesifik alanların, bakteri yüzeyinde tutulmasını ve koordineli salınımı kontrol etmek için çok önemli olduğu bulunmuştur (Wagner vd. 2011, Barlag vd. 2015).

Bu açılarından, Tip I Sekresyon Sistemi, *Salmonella* adezyonu için önemli ve özgün proteinleri salgılaması özelliği nedeniyle patojenite için kritiktir.

2.4.2.2 T5SS tarafından sekrete edilen adezinler

Gram negatif bakterilerde gözlenen diğer bir fimbriyal olmayan adezin sınıfı ise Tip V Sekresyon Sistemi tarafından transloke edilen ototransporter proteinleridir. Bu tip

adezinler sitoplazmadan periplazmaya Sec-bağımlı mekanizma (genel sekresyon yolağı) aracılığıyla taşınır. Buradan dış membrana β -fiçısı formundaki kanallar aracılığıyla sekrete edilir. Bu açıdan Tip V Sekresyon Sistemi iki aşamalı bir işlem süreci izler (Berne vd. 2015). Bu proteinler ortak yapısal ve fonksiyonel özellikleri paylaşırlar. Sec-bağımlı sinyal peptidi görevi gören amino terminal (N terminal), proteinin işlevsel bölümü olan yolcu domaini, yolcu domainin sekresyonuna izin veren C terminal (karboksil terminal) kısımlarından oluşmaktadır (Amono 2010, Berne vd. 2015). Ototransporterlar üç farklı grupta temsil edilirler. Bunlar; monomerik ototransporterlar, trimerik ototransporterlar ve iki partnerli sekresyon sistemleri şeklindedir.

Salmonella'da Tip V Sekresyon Sistemi tarafından sekrete edilen üç farklı adezin bulunmaktadır. Bunlardan SadA, trimerik adezinler ailesi üyesi bir proteindir. Raghunathan ve arkadaşları (2011) SadA ekspresyonun; hücre agregasyonu, biyofilm formasyonu ve insan bağırsak epitel hücrelerine tutunmada artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Tip V Sekresyon Sistemi tarafından salgılanan protein ise intestinal adezyonda özellikle fibronektine bağlanmada görev alan monomerik ototransporter MisL'dir (Tükel vd. 2007). Diğer bir monomerik ototransporter olan ShdA, fibronektine bağlanmada heparini taklit eden ve onunla yarışan bir proteindir (Wagner ve Hensel 2011). Shd'nın *S. Typhimurium*'un fare çekumuna dayanmasında ve buraya kolonizasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (Kingsley vd. 2002).

2.5 *Salmonella* İnvazinleri

Başarılı bir enfeksiyonu başlatmak veya sürdürmek için bakteriler çok sayıda strateji geliştirmiştir. Bu stratejilerden birisi de invazyondur. İnvaziv bakteri, fagositik ve fagositik olmayan hücreleri, aktif bir şekilde kendinin hücre içine alınımı için indükler ve daha sonra içerisinde hayatta kalabileceği, bölünebileceği ve yayılabileceği korunmuş bir niş kurar (Cossart ve Sansonetti 2004).

Salmonella patojenitesinin esas özelliği; fagositik ve fagositik olmayan konak hücrelere giriştir (Boumart vd. 2014). *Salmonella* bir fakültatif intrasellüler patojendir ve hücreye girdikten sonra *Salmonella* İçeren Vakuol (SCV) olarak bilinen değiştirilmiş fagozom

içinde hayatta kalır (Bernal-Bayard ve Ramos-Morales 2018). Giriş ve intrasellüler yaşamın; *Salmonella*'nın çoğalması, yayılması ve diğer konaklara geçmesi için kritik olduğu düşünülmektedir (Boumart vd. 2014). Bu giriş iki tipte gerçekleşebilir. Bunlardan ilki, Tip III Sekresyon Sisteminin (T3SS) rol oynadığı tetikleyici (trigger) giriş mekanizmasıdır. İkinci tanımlanmış mekanizma ise, dış membran proteinlerinden olan Rck proteinin yönettiği fermuar (zipper) benzeri giriştir. Ayrıca fermuar tipi girişe benzer bir yol izlediği düşünlen ve bu tezin de konusu olan PagN aracılı giriş bulunmaktadır. *Salmonella* hem tetikleyici hem de fermuar benzeri giriş mekanizmasına sahip olduğu gösterilen ilk bakteridir (Boumart vd. 2014).

2.5.1 T3SS bağımlı invazyon

Tip III Sekresyon Sistemi çok sayıda Gram negatif patojen bakteriler tarafından efektör proteinleri enjekte etmek için kullanılan temas bağımlı taşıma sistemidir (Agbor ve McCormick 2011, Malik-Kale vd. 2011). Bu sistem, membrana bağlı enjektosom ve 800 Å-uzunluğunda konak hücreyle etkileşim için kullanılan iğne kompleksinde oluşan, 3,5 megadalton iğne benzeri yapıdır (Radics vd. 2014). Bu nano enjeksiyon sistemi 20-30 proteinden oluşur (Malik-Kale vd. 2011). Yatay gen transferi ile kazanılmış oldukları düşünülen *Salmonella* Patojenite Adası 1 ve 2 tarafından kodlanan iki farklı Tip III Sekresyon Sistemi vardır. Bu T3SS-1 ve T3SS-2 birlikte 30'dan fazla efektör proteini sitoplazmadan konak hücreye enjekte etmek için kullanılır (Radics vd. 2014). T3SS-1 kümesi, bağırsak epitel hücrelerine, M hücrelerine, bağırsak lümenine erken faz invazyondan ve ilkin inflamatuvar yanıttan sorumludur. Ancak T3SS-2 ilişkili geç enfeksiyon, konak fagositi içerisinde yaşamayı ve çoğalmayı içerir (Bao vd. 2020).

T3SS ile gerçekleştirilen giriş mekanizması tetikleyici mekanizmadır. Enjekte edilen efektör protein kokteyli ile direkt veya direkt olmayan şekilde “membran kırışması” olarak bilinen hücre iskeleti yeniden düzenlenmesini indükler (Boumart vd. 2014). Bu efektörlerden SipA ve SipC aktinleri paketler ve yönlendirir. SipB, SipC ve SipD bu efektörlerin taşınmasını sağlayan translokon komponentleridir (Zhang vd. 2008, Agbor ve McCormick 2011). SopE ve SopE2, Aktin İlişkili Protein 2/3 (Arp2/3) aracılığıyla aktin sitoiskeleti birleştirilmesini sağlayan Rho GTPazı aktive ederek sitoiskeleti

düzenler. SopE ve SopE2 aynı zamanda, fonksiyonu Rho GTPaz'la benzer olan Rac-1 ve Cdc42 gibi çeşitli substratları aktive eder (Zhang vd. 2008, Agbor ve McCormick 2011). Bu efektörler aracılığıyla *Salmonella* kendi girişini indükler. Bu aşamadan sonra GTPaz aktivasyon proteini (GAP), SptP, Rac-1 ve Cdc42'yi inaktive ederek konak hücre iskeletinin eski haline dönmesini sağlar ve bu şekilde giriş tamamlanmış olur (Zhang vd. 2008, Agbor ve McCormick 2011).

T3SS fakültatif intraselüler bir patojen olan *Salmonella*'nın virülansı için oldukça önemlidir ancak yokluğunda invazyonu sürdürmek için çalışan başka mekanizmalar olduğu da gösterilmiştir.

2.5.2 Rck bağımlı invazyon

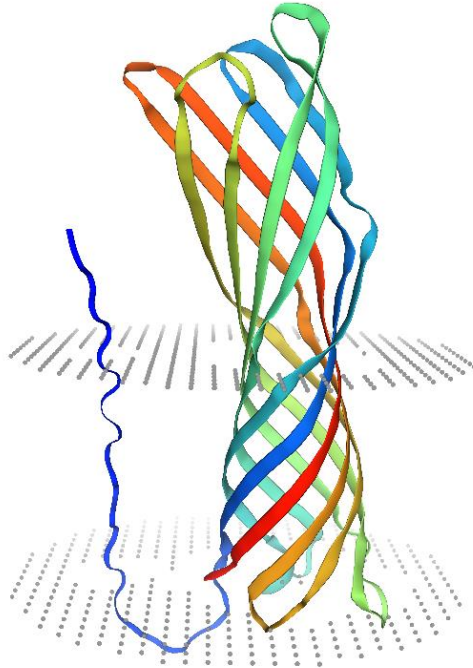
Murray ve Lee tarafından (2000) *Salmonella*'da Tip III Sekresyon Sistemi rol almaksızın bakteriyel girişin gerçekleşebileceği gösterilmiştir. Bu giriş yollarından birisi Rck invasinidir. Rck virülans plazmidi üzerinde bulunan *rck* geni tarafından kodlanan, 19-kDa bir dış membran proteinidir (Rosselin vd. 2010). Bu gen *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* gibi konak spesifik olmayan serovarlarda çok korunmuştur ve *S. Dublin*'de bu geni bulundurabilir ancak diğer serovarlarda tespit edilememiştir (Boumart vd. 2014). N-asil homoserin lakton, *rck* geninin ifadesini destekler ve bakterinin içeri alımını artırır (Hume vd. 2017). Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR) Rck proteini için bağlanma noktası görevi gördüğü düşünülmektedir. Bağlanma EGFR kalıntılarının otofosforilasyonunu tetikler (Hume vd. 2017). Daha sonra hem Rac1 hem de kinaz Akt'nin aktivasyonu, sınıf I PI3K tirozin kinazlar tarafından gerçekleştirilir (Boumart vd. 2014, Hume vd. 2017). Tüm bunlar aktin yeniden düzenlenme hareketliliğine yol açar. Bu şekilde fermuar tipi giriş mekanizması ile invazyon gerçekleşir.

2.6 Bir Adezin ve İnvazin Olarak PagN

Salmonella'da *pagN* geni tarafından kodlanan PagN, 239 aminoasit içeren ve moleküler ağırlığı 25,708 Da olan bir dış membran proteinidir. Sinonim ismi ise iVI-A'dır. Ayrıca *S. Typhi*'de bu protein bazı kaynaklarda T2942 olarak da isimlendirilmektedir (Hume vd.

2017). Bu protein; *Salmonella* tür, alttür ve serotip seviyesinde oldukça korunmuştur ve bu seviyelerde allelik özgüllük gösterir (Barilleau vd. 2021). Bu korunmuşluk düzeyi, PagN proteininin, özellikle *Salmonella* patojenitesi açısından önemli olduğuna işaret edebilir. *Salmonella*'ya özgün olduğu bilinen bu protein *Salmonella* varlığının erken tespiti için de kullanılabilir. Öyle ki Hou ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan çalışmada ördeklerde ELISA ile *Salmonella* tanısı için PagN proteini bir antijen olarak kullanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Bu protein, patojenik *E. coli* adezin ve invazinleri olan Hek ve Tia ile % 54 benzerlik göstermektedir (Lambert ve Smith 2008). Bu homoloji PagN'in bir adezin ve invazin olabileceği fikrini doğurmuştur. Bu fikirden yola çıkarak Lambert ve Smith'in gerçekleştirdikleri deneyde (2008); PagN eksprese eden bakterilerin yaklaşık % 60'nın hücrelere invaze olduğu ve kontrole göre 27 kat daha invaziv oldukları gözlemlenmiştir. Buna ek olarak; güçlü bir aktin polimerizasyon inhibitörü olan sitokalsin D ile muamele edilmiş hücre hattında indüklenabilir bir promotora bağlı *pagN* genine sahip *E. coli* suşunun invazyonu gerçekleştirmediği sonucu elde edilmiştir. Dolayısıyla PagN aracılı invazyon için aktin polimerizasyonu gerekli olduğu kanıtlanmıştır.



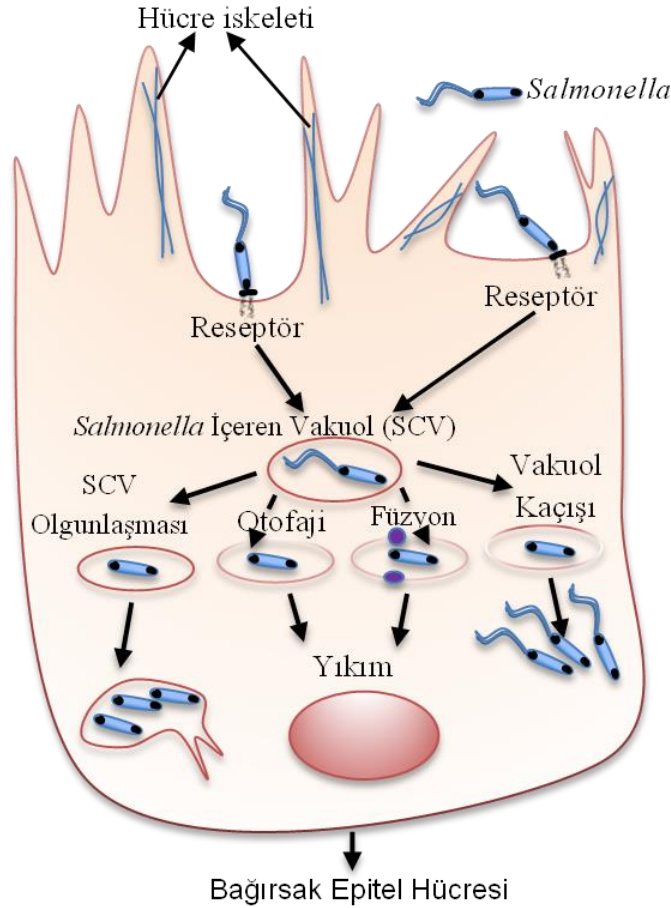
Şekil 2.4 PagN proteininin 3 boyutlu yapısı (SWISS-MODEL kullanılarak yapılmıştır)

PagN proteinin ikincil yapısı 4 ilmekten oluşmakta ve 8 β ipliği içermektedir bu ipliklerin dönüşleriyle bu proteinin ana yapısını olan β -fiçisi konformasyonunu oluşturulmaktadır (Şekil 2.4). PagN proteinde ilk üç ilmeğin delesyonu sonucu invazyon % 98 oranında, dördüncü ilmeğin delesyonu sonucu ise % 94 oranında bakteriyel invazyon düşüşüne neden olmaktadır (Lambert ve Smith 2009). Bu da PagN aracılı invazyon için proteinin 4 ilmeğinin de gerekli olduğunu göstermektedir. Wu ve arkadaşlarının (2020) gerçekleştirdikleri deneyde *S. Typhi*, *S. Typhimurium* ve *S. diarizonae* PagN sekanslarında farklı ilmek ve bölgelerde bir aminoasit düzeyinde farklılıkların invazyon ve adezyon düzeyinde değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir.

Çoğu bakteriyel patojen, tutunma reseptörü olarak konak proteoglikanlarını kullanır. Bu doğrultuda Lambert ve Smith'in (2009) gerçekleştirdikleri çalışmada; glikozaminoglikan üretme yeteneği azaltılmış hücre kültürüne *Salmonella* invazyonunda ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum epitel hücrelere, PagN bağımlı invazyon için glikosile edilmiş proteoglikanların gereklilik olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca çalışmanın devamında ortama heparin eklenmesinin invazyonu % 90 oranında engellediği ortaya konmuştur. Bu sonuç doğrultusunda; heparan sülfat proteoglikan (HSPG), PagN proteini için bir reseptör görevi görmektedir kanısına varılmıştır. Barilleau ve arkadaşları da (2021) bu bilgiyi doğrulamaktadır ancak HSPG'nin bir koreseptör görevi gördüğü ve β 1 integrinle birlikte internalizasyonu tetiklediğini düşünmektedirler. Bununla beraber epitel hücrelerinin yüzeyindeki ana proteoglikan olan sindekan-1 tutunmada rol oynuyor olabilir (Lambert ve Smith 2009, Barilleau vd. 2021)

PagN aracılı invazyon, fermuar benzeri giriş ile gerçekleşmektedir. Barilleau ve arkadaşları (2021) Rck gibi PagN aracılı invazyona yol açan sinyal iletiminde sınıf I PI 3 kinazlara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, inhibitör genistein ile muamele edilmiş hücrelerde PagN tarafından indüklenen invazyon seviyesinin önemli ölçüde azaldığını göstererek, PagN aracılı invazyon için tirozinin fosforilasyonunun gerekli olduğunu vurgulamışlardır. Hala belirsiz olmasına karşın mevcut bilgiler PagN aracılı giriş mekanizmasının Rck'ye benzer bir yolak kullandığına işaret etmektedir. Fermuar mekanizmasındaki ilk adım, *Salmonella*'nın hedeflediği hücrelerin yüzeyinde yer alan reseptörlerle (Rck için EGFR veya PagN için proteoglikan/ β 1 integrin) doğrudan

etkileşimdir. Bu etkileşim, aktin polimerizasyonu, membranın yeniden düzenlenmesi ve bakterilerin bir vakuol içerisine girmesiyle sonuçlanır. Tüm bunlara rağmen *Salmonella*'nın hücre içi davranışı hala belirsizliğini korumaktadır (Ménard vd. 2022, Şekil 2.5).



Şekil 2.5 PagN bağımlı invazyon mekanizması (Ménard vd. 2022)

2.7 *pagN* Geni

pagN geni *Salmonella* cinsi içinde oldukça yayındır. Barilleau ve arkadaşlarının (2021) *S. bongori* ve *S. enterica* türleri ve *S. enterica* alt türlerinden oluşan geniş çaplı veri seti üzerinden gerçekleştirdikleri araştırmada; test edilen genomlardan % 99,6'sı *pagN* geni açısından pozitif olduğunu bulmuşlardır. Petano-Duque ve arkadaşları (2023) tarafından yapılan çalışmada ise, soğuk kanlı sıcak kanlı hayvanlardan ve insanlardan izole edilen

31 *Salmonella enterica* serotipinin % 54,84'nün *pagN* geni açısından pozitif olduğu gösterilmiştir.

pagN geni, PhoP tarafından aktive edilen genler (PhoP-activated genes) olarak ifade edilen *pags* arasındadır. Özetle; *pagN* aktivasyonu, PhoP/PhoQ iki komponentli transkripsiyon regülasyon sistemine bağlıdır. Öte yandan, PagN proteininin ekspresyonuna ilişkin olarak, PhoP/PhoQ iki bileşenli sisteminin orta derecede asidik pH, kalsiyum veya magnezyum iyonlarından yoksunluk veya aktive eden anti-mikrobiyal peptidlerin varlığı gibi kısıtlayıcı bir ortama bağlı olması dışında çok az şey bilinmektedir.

pagN geni, spesifik sentizom 7 genomik adasında bulunur ve çoğu serotip bu gene sahiptir (Barilleau vd. 2021). Diğer invazyonla ilişkili operonların aksine *pagN* geni monosistron olarak transkribe edilir. Daha önce *S. enterica* sentizom 7 genomik adası (SCI) olarak bilinen SPI-6, 47 kb'lik bir adadır ve transkripsiyonel düzenleyici *sinR* ile birlikte *pagN* ve *safABCD* fimbriyal kümesi gibi adezin ve invasin genlerini içerir (Mulder vd. 2012, Ray vd. 2022). Sentizom 7 genomik adası, mozaik yapıda bir bölge özelliği gösterir. *pagN*, *saf* (*Salmonella* atypical fimbria) operonu yakınında ve bir transkripsiyon regülatörü kodladığı düşünülen *sinR* genin 336 bç aşağı akışında yer alır ve ters yönde kodlanır (Gunn vd. 1998, Folkesson vd. 1999). Bu bölgenin G+C oranı, *Salmonella* genomuna (% 52) göre düşüktür (Conner vd. 1998, Folkesson vd. 1999). Bu durum, söz konusu bölgenin yatay gen transferi ile alınmış olabileceğine işaret etmektedir.

S. Typhimurium serovarında SCI adası 47 kb uzunluğundadır ve Shine Dalgarno sekansı içermesi muhtemel 37 ORF'yi barındırır (Folkesson vd. 2002). Bu genomik ada, sitoplazma dışında konumlandığı tahmin edilen proteinleri kodlar. Proteinler, çoğu Gram negatif bakteride bu ada tarafından kodlanan ve ökaryotik hücrelerle yakın etkileşime geçebilen, immün yanıtı manipüle edebilen ve bir sekresyon formu veya biyosentez sistemi olabilen proteinlere benzerdir (Folkesson vd. 1999). *Salmonella* sentizom 7 genomik adasının tamamen silinmesi ile oluşturulan bir mutantın, ökaryotik hücrelere giriş yeteneğinin bozulduğu saptanmıştır. Dolayısıyla bu ada *Salmonella*'nın ekolojisini ve yaşayış şeklini etkilemektedir (Folkesson vd. 1999). Folkesson ve arkadaşlarının (2002) yaptığı diğer bir çalışmada SCI'nin silinmesi, PagN ekspresyonu ile

tamamlanamayan HEp-2 hücrelerine girişte yaklaşık % 50'lik bir azalmayla sonuçlanmıştır. Ancak *safABCD* veya *sinR* ile tamamlama bu çalışmada yapılmamıştır. Yapılan bir çalışmada, benzer şekilde, *pagN* (iviVI-A) gen bölgesinin delesyonu ile oluşturulan mutantların, esas suşla karşılaştığında hayatta kalma, uyum sağlama ve rekabet becerilerinde düşüş gözlemlenmiştir (Conner vd. 1998). *pagN* mutantları ile gerçekleştirilmiş diğer deneylerde de paralel sonuçlar gözlemlenmiştir. Örneğin Yang ve arkadaşlarının (2013) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, doğal tip ve $\Delta pagN$ *Salmonella* suşları ile enfekte edilmiş fareler hastalık süreleri bakımından karşılaştırıldığında, *pagN* açısından mutant *Salmonella* suşu ile enfekte edilmiş olanların hastalık süresinin daha kısa olduğu ve bu farelerin % 80'inin iyileşerek deney boyunca yaşamaya devam ettiği gözlenmiştir. Bu da *pagN* geninin *Salmonella* virölansı için önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde Lambert ve Smith (2008), *S. Typhimurium* *pagN* delesyonunun enterositlere bakteriyel invazyonun düşmesine neden olduğundan bahsetmiştir. Bu durum *Salmonella*'nın epitel hücrelere girişi ve intrasellüler yaşamının başlaması açısından *pagN* geninin önemli genlerden biri olduğunu göstermektedir. *pagN* geninin maksimum ekspresyonu intrasellüler halde iken gözlenmiştir (Conner vd. 1998, Heithoff vd. 1999). Ayrıca Kocerka ve arkadaşları (2024) tarafından BALB/c fareleri ile yapılan çalışmada *pagN* geninin, tifo benzeri modelde çekum dışında dalak ve karaciğer gibi organlarda, enfeksiyonun ilerleyen saatlerinde, yoğun bir şekilde transkribe edildiği tespit edilmiştir. Bu durum sistemik enfeksiyonun oluşturulmasında *pagN*'nin diğer invazin genlerinden daha önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Yapılan tez çalışmasında kullanılan, *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu ve bu suşun *seqA* geni bakımından mutantı ve yapılan manipölasyonlar için gerekli vektörleri taşıyan *E. coli* suşları, Prokaryotik Genetik Laboratuvarı (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü) kültür koleksiyonundan sağlandı. *S. Typhimurium* doğal tip suş, LB broth besiyerine ve bu suşun *seqA* mutantı için ise bu üreme ortamına kloramfenikol (20 µg/mL) ilave edilmiş besiyerine inoküle edildi ve 200 rpm çalkamalı inkübatörde 37 °C’de geliştirildi. Bu tezde kullanılan vektörlerden biri olan pKD3 plazmidini taşıyan *E. coli* suşu kloramfenikol (20 µg/mL) ilave edilmiş LB broth besiyerinde, pKD46 plazmidi taşıyan *E. coli* suşu ise amfisilin (100 µg/mL) ilave edilmiş LB broth besiyerinde üretildi. Bakteriler, LB ortamlarına % 60 gliserol ilave edilerek oluşturulmuş stok çözeltiler şeklinde -80 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2 Besiyerleri

Bu tez çalışmasında kullanılan besiyeri içerikleri aşağıda yer almaktadır.

Çizelge 3.1 (Miller’s) Luria Bertani (LB) broth ve agar

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	5,0 g/L
Pepton (Kazeinden)	10,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Agar	15,0 g/L

Bileşenleri Çizelge 3.1'deki gibi olan hazır dehidre besiyerinden (Condalab) 25 g tartılarak 1 litre distile suda çözündürüldü. Hazırlanan besiyerinin oda sıcaklığında pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı. Sıvı besiyerleri 5 mL olacak şekilde tüplere dağıtıldıktan sonra katı besiyerleri agar ilavesinin ardından $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Katı besiyerleri soğutulduktan sonra gerekiyorsa uygun hacimde antibiyotik ilavesi yapıldı ve petri plaklarına 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.2 Tuz içermeyen LB (LB^{-NaCl}) broth

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	5,0 g/L
Pepton (Kazeinden)	10,0 g/L

Çizelge 3.2'deki bileşenler 1 litre distile suda çözündürüldü. Hazırlanan besiyerinin oda sıcaklığında pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı. Sıvı besiyerleri 5 mL olacak şekilde cam tüplere eşit miktarlarda bölünmesinin ardından, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilizasyon işlemine tabii tutuldu.

Çizelge 3.3 Kalkoflor beyazı (CFW) içeren tuzsuz LB broth ve agar

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	5,0 g/L
Pepton (Kazeinden)	10,0 g/L
Kalkoflor beyazı	0,04 g/L
Agar	15,0 g/L

Çizelge 3.3'de verilen bileşenler en son kalkoflor boyası eklenerek 1 litre distile suda homojen hale gelene kadar karıştırılarak çözündürüldü ve pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ olacak şekilde ayarlandı. Sıvı besiyerleri deneye göre uygun hacimde olacak şekilde tüplere paylaştırıldıktan sonra, katı besiyerleri ise agar ilavesinin ardından $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Katı besiyerleri petri plaklarına 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.4 Kongo kırmızısı (CR) agar

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	5,0 g/L
Pepton (Kazeinden)	10,0 g/L
Kongo Kırmızısı	0,04 g/L
Agar	15,0 g/L

Çizelge 3.4’de verilen bileşenler en son Kongo kırmızısı boyası eklenerek 1 litre distile suda çözdürüldü ve pH 'sı ayarlandı. Agar ilavesinin ardından 1 atm basınçta 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyonun ardından besiyerleri petri plaklarına 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.5 Plate count agar

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	2,5 g/L
Pepton (Kazeinden)	5,0 g/L
D (+) Glukoz	1,0 g/L
Agar	14,0 g/L

Bileşenleri Çizelge 3.5’teki gibi olan hazır dehidre besiyerinden (Merck) 22,5 g tartılarak 1 litre distile suda çözüldü. Hazırlanan besiyerinin oda sıcaklığında pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ değerine ayarlandı ve otoklav aracılığıyla sterilize edildi. Besi ortamları soğutulduktan sonra petri plaklarına 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.6 Swarming agar

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	5,0 g/L
Pepton (Kazeinden)	10,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
D (+) Glukoz	5 g/L
Agar	5 g/L

Çizelge 3.6'deki bileşenler 1 litre distile suda tamamen homojen olacak şekilde ısıtılarak çözdürüldü. Hazırlanan besiyerinin oda sıcaklığında pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ değerine ayarlandı. 121 °C' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Besiyerleri soğutulduktan sonra petri plaklarına 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.7 Swimming agar

İçerik	Miktar (g/L)
Maya ekstraktı	5,0 g/L
Pepton (Kazeinden)	10,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Agar	3 g/L

Çizelge 3.7'deki bileşenler 1 litre distile suda tamamen homojen olacak şekilde ısıtılarak çözdürüldü. Hazırlanan besiyerinin oda sıcaklığında pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ değerine ayarlandı. 121 °C' de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Besiyerleri soğutulduktan sonra petri plaklarına 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.8 *Salmonella- Shigella* (SS) agar

İçerik	Miktar (g/L)
Peptonlar	10,0 g/L
Laktoz	10,0 g/L
Ox bile	8,5 g/L
Sodyum sitrat	10,0 g/L
Tiyosülfat	8,5 g/L
Amonyum demir (III) sitrat	1,0 g/L
Parlak yeşili	0,0003 g/L
Nötral kırmızı	0,025 g/L
Agar	12,0 g/L

Hazır besiyerinden (Merck) 60,0 g tartılarak şekilde 1 L distile su içinde tamamıyla çözülünceye kadar manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak eritildi ve steril petri kutularına 20'şer mL döküldü.

3.1.3 Çözeltiler

Çizelge 3.9 1M L-Arabinoz stok çözeltisi

İçerik	Miktar (g)
L-Arabinoz	1.5013 g
dH ₂ O	8,5 g

Çizelge 3.9'da bileşimi verilen çözelti karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra 0,22 µm por çapında şırınga filtreden geçirilerek steril şekilde oda sıcaklığında saklandı.

Çizelge 3.10 10X fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) stok çözeltisi

İçerik	Miktar (g)
NaCl	80,1 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KCl	2 g
KH ₂ PO	2,7 g

Çizelge 3.10’da verilen tuzlar 800 mL distile su içerisine eklenerek çözdürüldü. Çözeltinin pH’sı 7,2 - 7,4 aralığında olacak şekilde ayarlandı ve son hacim 1 litre ayarlanarak otoklavda sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklanan stok PBS çözeltisi seyreltilerek kullanıldı.

Çizelge 3.11 % 33'lük glasiyel asetik asit çözeltisi

İçerik	Miktar (mL)
Glasiyel Asetik Asit	33 mL
dH ₂ O	67 mL

Çözelti, Çizelge 3.11’da verildiği miktarlarda karıştırıldı ve oda sıcaklığında ışık geçirmeyen bir şişede saklandı.

Çizelge 3.12 % 95'lik metanol çözeltisi

İçerik	Miktar (mL)
Metanol	95 mL
dH ₂ O	5 mL

Çözelti, Çizelge 3.12’de verilen miktarlarda karıştırılarak hazırlanarak kullanıldı.

Çizelge 3.13 % 0,1'lik kristal viyole çözeltisi

İçerik	Miktar
Kristal viyole	0,1 g
dH ₂ O	100 mL

Çizelge 3.13'te verildiği miktarlarda karıştırılarak hazırlanan boya çözeltisi 0,45 µm por çapında şırınga filtreden geçirilerek kullanıldı.

Çizelge 3.14 Amfisilin (AMP) stok çözeltisi (100 mg/mL)

İçerik	Miktar
Amfisilin tuzu	1 g
dH ₂ O	10 mL

Amfisilin tuzu, su içerisinde çözdürüldükten sonra 0,45 µm por çapında şırınga filtreden geçirildi ve antibiyotik çözeltileri tüplere bölünerek -20 °C'de stoklandı.

Çizelge 3.15 Kloramfenikol (CHL) stok çözeltisi (20 mg/mL)

İçerik	Miktar
Kloramfenikol	0,20 g
Etanol	10 mL

Kloramfenikol, etanol içerisinde çözdürüldükten sonra 0,22 µm por çapında şırınga filtreden geçirildi ve antibiyotik çözeltileri tüplere bölünerek -20 °C'de stoklandı.

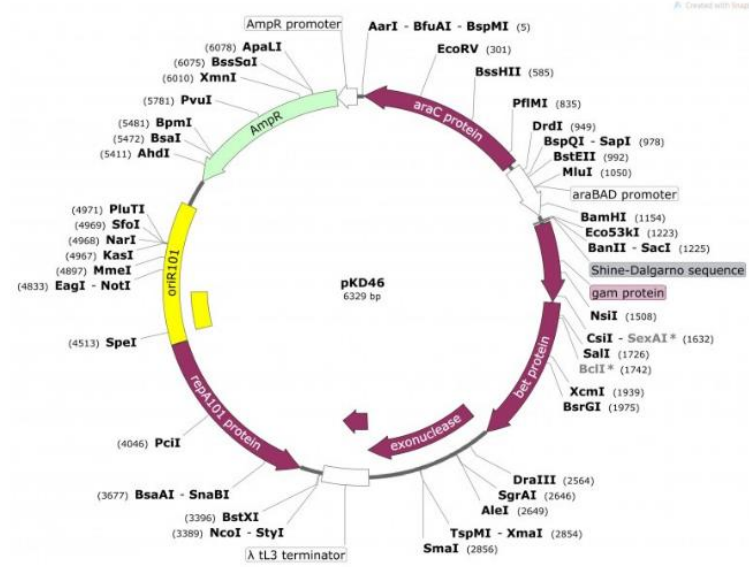
Çizelge 3.16 Gentamisin (GEN) stok çözeltisi (50 mg/mL)

İçerik	Miktar
Gentamisin Sülfat Tuzu	0,50 g
dH ₂ O	10 mL

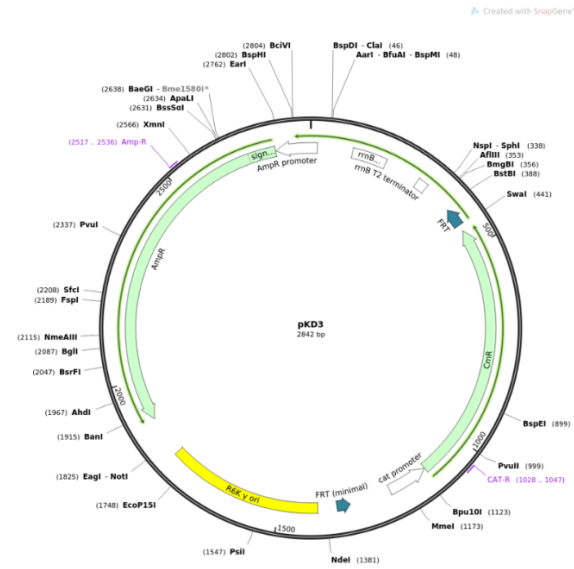
Gentamisin sülfat tuzu, su içerisinde çözdürüldükten sonra 0,22 µm por çapında şırınga filtreden geçirildi ve antibiyotik çözeltileri tüplere bölünerek -20 °C'de stoklandı.

3.1.4 Vektörler

Bu tez çalışmasında kullanılan plazmidlerin haritası aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.1 Red rekombinaz ifade vektörü pKD46 haritası



Şekil 3.2 Kloramfenikol direnç kaseti içeren pKD3 yardımcı vektör haritası

3.1.5 Primerler

Bu tez çalışmasında kullanılan primerler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.17 Homolog bölge rekombinasyon primerleri

	Primer Dizisi (5'–3')
F1	TCTGAAATGAAAACTTTTTCGCAGTCTGCATCATTCCCCTTGTGGTA GCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
R1	TTAAAAGGCGTAAGTAATGCCGAGCATGAAGTCATTGGAGGCAGCCT TTGATGGGAATTAGCCATGGTCC

Çizelge 3.17'de pKD3 plazmidinde bulunan kloramfenikol direnç kasetinin aşağı ve yukarı akışında bulunan, dizi spesifik rekombinasyon için gerekli, flippaz (FLP) tanıma hedef (FRT) bölgelerine homolog kolları olacak şekilde bir primer çifti tasarlandı. Altı çizili kısımlar FRT bölgelerinin eşleniği iken diğer kısımlar silinmesi hedeflenen *pagN* geni ile homologdur.

Çizelge 3.18 Doğrulama primerleri

	Primer Dizisi (5'–3')
F2	TTGTGGTAGCGTGTAGGCT
R2	GGCAGCCTTTGATGGGAATT

Yapılan delesyonun doğrulanması amacıyla Çizelge 3.18'deki primer çifti kullanıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Lambda red genlerini kodlayan pKD46 plazmidinin *S. Typhimurium* 14028'e aktarılması

Gerçekleştirilen çalışmada, *S. Typhimurium* *pagN* geninin silinmesi amacıyla Datsenko ve Wanner (2000) tarafından ortaya konulmuş olan kromozomal genlerin bozulmasında kullanılan bir çeşit dizi spesifik rekombinasyon yöntemi takip edilmiştir. Bu yöntem gerektiren rekombinasyon için indüklenebilir bir promotor altında lambda fajı Red rekombinaz genleri gerekmektedir. Bu amaçla tasarlanmış, arabinoz promotoru ile indüklenebilir lambda Red genlerini kodlayan, sıcaklığa duyarlı ve amfisilin direnç kaseti içeren pKD46 plazmidi tez çalışmasında kullanıldı.

3.2.1.1 pKD46 plazmidinin izolasyonu

Sıcaklığa duyarlı pKD46 vektörüne sahip *E. coli* suşu, 100 µg/mL amfisilin içeren LB broth ortamına % 1 inokülasyon hacminde aktarıldı ve 30 °C derecede 18 saat boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde amfisilin içeren LB agar ortamına çizgi ekim yöntemiyle ekildi ve 30 °C derecede gecelik inkübasyona bırakıldı. Buradan alınan tek koloni ile yeniden amfisilin içeren LB broth besiyerinde inoküle edildi ve 30 °C derecede 18 saat boyunca çalkalamalı şartlarda inkübe edildi.

Plazmid izolasyonu, QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN/Germnay) kiti kullanarak gerçekleştirildi. İzolasyon ve pürifikasyon aşamaları boyunca üretici firma tarafından tarif edilen protokol aşamaları takip edildi. İzolasyon sonrasında elde edilen plazmid DNA'ların miktar ve saflık ölçümü Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) cihazı yardımıyla belirlendi. Bu cihazın kılavuzunda belirtilği gibi absorbans 260/280 nm değeri 1,8-2,0 aralığında ve 260/230 nm değeri 2,0-2,2 aralığında olan DNA'lar saf olarak değerlendirildi. Saflığı belirlenen plazmid DNA'lar % 7 konsantrasyonundaki agaroz jelde 80 V sabit akımda 1 saat boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Süre bitiminde plazmid DNA'lar Etidyum bromür çözeltisiyle muamele

edilerek işaretlendi. Ardından 366 nm dalga boyunda ultraviyole (UV) ışıktaki (SmartView Pro 1100 Imager System, Taiwan) ile görüntülendi.

3.2.1.2 Elektrokompentan *S. Typhimurium* 14028 hücrelerinin hazırlanması

Tek koloniden aktifleştirilmiş 18 saatlik *S. Typhimurium* 14028 aktif kültüründen 500 µL alınarak 50 mL LB broth besiyerine inoküle edildi. Belli zaman aralıklarıyla optik yoğunluğu (OD₆₀₀) takip edildi. Kültürün optik yoğunluğu 0,5 değerine ulaşınca inkübasyon sonlandırılarak kültür 1 mL'lik porsiyonlar şeklinde santrifüj tüplerine bölündü. Bu tüpler 20 dk boyunca buz üstünde bekletildi ve bundan sonraki tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Süre bitiminde hücreler 4 °C'de 10000 rpm'de 2 dk boyunca çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırılarak, pelet hücrelere zarar vermeyecek şekilde yavaş hareketlerle, 1 mL soğuk steril distile su ile yıkanarak dağıtıldı. Ardından hücreler 20 dk boyunca 10000 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutuldu ve bu yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı. Son santrifüj işlemi sonrası pelet 100 µL su içerisinde süspanse edildi.

3.2.1.3 pKD46 plazmidinin elektroporasyon yoluyla *S. Typhimurium* 14028'e transformasyonu

Elektrokompentan hale getirilmiş *S. Typhimurium* hücreleri bekletilmeden 2 mm genişliğinde örnek haznesine sahip elektroporasyon kuvvetlerine alındı. Konsantrasyonları 1 ng, 10 ng ve 100 ng olacak şekilde hazırlanmış pKD46 plazmidini her örnekten iki tekrar olacak şekilde bu kuvvetlere eklendi. Negatif kontrol için elution buffer kullanıldı. Bu işlemler sırasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. 25 µF 200 ohm rezistansa ayarlanmış Gene Pulser Xcell Electroporation System cihazıyla (Bio-Rad, USA) kompetan hücre ve plazmid DNA karışımını içeren elektroporasyon kuvvetlerine 2500 V değerinde elektrik akımı uygulandı. Kuvvetlere önceden ısıtılmış 1 mL LB broth besiyeri ilave edildi ve pipetle karıştırıldı ardından şırınga ile tüm içerik steril cam tüplere alınarak 2 saat boyunca 30 °C'de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda inkübe edildi. Ardından bu kültürlerden 100 µL alınarak amfisilin içeren (100 µg/mL) LB agar plakalarına yayma ekim yapıldı. Bu plakalar 30 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün koloniler seçilerek çoğaltıldı. Bu bakterilerden plazmid izolasyonu ile doğrulama yapıldı.

3.2.2 Kloramfenikol gen kaseti insersiyonu ile *S. Typhimurium*'da *pagN* geninin delesyonu

Çalışmanın devamında Datsenko ve Warner (2000) tarafından önerildiği gibi temel strateji, kromozomal diziyi, bu dizi ile homolog uzantılara sahip primerler kullanılarak PZR yoluyla amplifiye edilen seçilebilir bir antibiyotik direnç geniyle yer değiştirmektir. Bu amaçla pKD3 plazmidi, kloramfenikol direnç kaseti için kalıp olarak kullanıldı.

3.2.2.1 pKD3 plazmidinin izolasyonu

Yardımcı pKD3 vektörüne sahip *E. coli* suşu, 20 µg/mL kloramfenikol eklenmiş LB broth ortamına inoküle edildi ve 37 °C derecede 18 saat boyunca çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kloramfenikol içeren LB agar ortamına çizgi ekim yöntemiyle ekildi ve 37 °C derecede gecelik inkübasyona bırakıldı. Buradan alınan tek koloni ile yeniden amfisilin içeren LB broth besiyerinde inoküle edildi ve 37 °C derecede 18 saat boyunca çalkalamalı şartlarda inkübe edildi.

Plazmid izolasyonu, QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN/Germnay) kiti kullanarak gerçekleştirildi. İzolasyon ve pürifikasyon aşamaları boyunca üretici firma tarafından tarif edilen protokol aşamaları takip edildi. İzolasyon sonrasında elde edilen plazmid DNA'ların miktar ve saflık ölçümü Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) cihazı yardımıyla belirlendi. Saflığı belirlenen plazmid DNA'lar % 7 agaroz jelde 80 V akımla 1 saat boyunca elektroforez işlemine tabii tutuldu. Süre bitiminde plazmid DNA'lar Etidyum bromür çözeltisiyle muamele edilerek işaretlendi. Ardından ultraviyole (UV) ışıktaki görüntülendi.

3.2.2.2 pKD3 plazmidinin *PvuI* enzimi ile restriksiyon kesimi

Yardımcı pKD3 plazmidinin kesilmesinde kullanılan *PvuI* enzimi ve bu enzimin tampon çözeltileri Thermo Scientific/ABD firmasından sağlandı. Reaksiyon karışımlarında ve koşullarında bu firma tarafından önerilen parametreler takip edildi.

Çizelge 3.19 *PvuI* RE reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	16 µL
10X Tampon R	2 µL
pDNA (0.5-1 µg/µL)	1 µL
<i>PvuI</i> RE enzimi	1 µL
Toplam	20 µL

Karışımı içeren tüpler yavaşça karıştırıldı ve spin santrifüj cihazında birkaç saniye döndürüldü ardından 16 saat 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde tüpler 20 dakika boyunca 80 °C’de bekletilerek enzimlerin inaktivasyonu sağlandı. Kesilmiş örnekler High Pure PCR product purification (Roche) kiti kullanılarak saflaştırıldı. Kesim ürünleri % 7’lik agaroz jelde 80 V akımda 1 saat yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenerek büyüklük tayini yapıldı ve saflığı nanodrop aracılığıyla kontrol edildi.

3.2.2.3 Kloramfenikol gen kasetinin Touchdown PZR ile çoğaltılması

Kesilerek doğrusal hale getirilmiş pKD3 plazmidi kloramfenikol direnç kaseti Touchdown (TD) PZR metodu kullanılarak çoğaltıldı.

Çizelge 3.20 Touchdown PZR reaksiyon karışımı

İçerik	Miktar (µL)
Nükleaz içermeyen su	39,5 µL
Dream Taq tampon çözeltisi (10X)	5 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
İleri primer (10 mM)	1 µL
Geri primer (10 mM)	1 µL
Dream Taq DNA polimeraz	0,5 µL
DNA (100 ng /µL)	2 µL
Toplam	50 µL

Bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı ile Çizelge 3.21’de verilen amplifikasyon koşullarında kloramfenikol direnç kaseti çoğaltıldı.

Çizelge 3.21 Touchdown PZR Sıcaklık Döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	20	20
Bağlanma	70 - 60*	45	
Uzama	72	90	
Denatürasyon	94	20	20
Bağlanma	60	45	
Uzama	72	90	
Son uzama	72	300	1

* Her döngüde sıcaklık 0,5 °C derece azalmaktadır.

PZR ardından ürünler High Pure PCR product purification (Roche) kiti kullanılarak saflaştırıldı. Ürünler % 1’lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülendi.

3.2.2.4 *DpnI* restriksiyon enzimi ile PZR ürünlerinin kesimi

PZR'dan sonra kalıp DNA'yı tamamen ayırmak için DNA'yı metillenmiş bölgelerden kesen *DpnI* enzimi ile kesim gerçekleştirildi. Kesim reaksiyonu Çizelge 3.21'deki gibidir. *DpnI* enzimi ve bu enzimin tampon çözeltileri Thermo Scientific/ABD firmasından sağlandı.

Çizelge 3.22 *DpnI* RE reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	16 µL
10X Tampon R	2 µL
pDNA (0.5-1 µg/µL)	1 µL
<i>DpnI</i> RE enzimi	1 µL
Toplam	20 µL

Karışımı içeren tüpler yavaşça karıştırıldı ve spin santrifüj cihazında birkaç saniye döndürüldü ardından 16 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde tüpler 20 dakika boyunca 80 °C'de bekletilerek enzimlerin inaktivasyonu sağlandı. Kesilmiş örnekler High Pure PCR product purification (Roche) kiti kullanılarak saflaştırıldı. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenerek büyüklük tayini yapıldı ve saflığı nanodrop aracılığıyla kontrol edildi. Nanodrop yardımıyla elde edilen ürün miktarı kontrol edildi.

3.2.2.5 *S. Typhimurium* 14028+pKD46 suşunun elektrokompetan hale getirilmesi

pKD46 aktarılmış *S. Typhimurium* 14028 suşu stoktan 100 µg/mL amfisilin içeren LB broth ortamına inoküle edilerek 30 °C derecede 18 saat boyunca inkübe edilerek aktifleştirildi. Buradan çizgi ekim yöntemi ile amfisilin içeren LB agara ekildi 30 °C'de bir gece inkübe edildi ardından buradan alınan tek koloni ile yeniden sıvıya ekim yapıldı. 18 saat inkübasyonun ardından 500 µL amfisilin ilave edilmiş 50 mL LB besiyerine % 1 oranında inoküle edildi. Kültürün optik yoğunluğu (OD₆₀₀) 0,1 değerine ulaşınca 1 M L-

Arabinoz stoğundan son hacim 10 mM olacak şekilde ortama eklendi bu sayede pKD46 üzerinde bulunan arabinoz promotoruna bağlı λ red genleri indüklendi. İnkübasyona devam edildi ve optik yoğunluk 0,4-0,5 aralığına ulaşınca kültür santrifüj tüplerine bölündü.

3.2.2.6 Homolog kollara sahip kloramfenikol direnç kasetinin pKD46 plazmidi içeren *S. Typhimurium* 14028 suşuna transformasyonu

Bu tüpler buz üstünde 20 dk bekletildi. Hücreler 4 °C’de 10000 rpm’de 2 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Pelet hücrelere zarar vermeden steril saf su ile çözdürüldü ve 10000 rpm’de 20 dk boyunca santrifüj işlemine tabii tutuldu. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Son aşamada pelet 50 µL su içerisinde süspanse edildi ve elektroporasyon kuvvetlerine alındı. Kuvetlere 5 pg ile 0,5 µg aralığındaki değerlerde tamamen saflaştırılmış lineer DNA eklendi. 25 µF 200 ohm rezistansa ayarlanmış Gene Pulser Xcell Electroporation System cihazıyla (Bio-Rad, USA) kompetan hücre ve lineer DNA karışımını içeren elektroporasyon kuvvetlerine 2500 V değerinde elektrik akımı uygulandı. Kuvetlere önceden ısıtılmış 1 mL LB broth besiyeri ilave edildi ve pipetle karıştırıldı ardından şırınga ile tüm içerik steril cam tüplere alınarak 2 saat boyunca 37 °C’de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda inkübe edildi. Ardından bu kültürlerden 100 µL alınarak kloramfenikol içeren (10 ve 25 µg/mL) LB agar plakalarına yayma ekim yapıldı. Bu plakalar 37 °C’de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün koloniler seçilerek çoğaltıldı.

3.2.2.7 *pagN* geni delesyonunun PZR ile doğrulanması

Seçilen kolonilerden, GenJET Genomic DNA Purification (Thermo) kiti ile genomik DNA izolasyonu ve pürifikasyonu yapıldı. Çizelge 3.22’de verilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve tüpler spin santrifüj cihazında kısa süre döndürüldü.

Çizelge 3.23 Doğrulama için PZR karışımı

İçerik	Miktar (µL)
Taq DNA polimeraz tamponu (10X)	2,5 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
İleri primer (10 mM)	1,25 µL
Geri primer (10 mM)	1,25 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
Taq DNA polimeraz	0,125 µL
Nükleaz içermeyen su	12,875 µL
DNA	2 µL
Toplam	25 µL

Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) Çizelge 2.34'teki döngü sayısı ve sıcaklık uygulamalarıyla gerçekleştirildi.

Çizelge 3.24 Doğrulama için PZR sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	20	30
Bağlanma	51,6	45	
Uzama	72	90	
Son uzama	72	300	1

Reaksiyon bitiminde, PZR ürünleri, % 1'lik agaroz jele yüklendi ve 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülendi.

3.2.3 S. Typhimurium 14028 suşu ve bu suşun *seqA* ve *pagN* mutantlarının üreme eğrilerinin değerlendirilmesi

LB agar ortamında üretilmiş bakterilerinin tek kolonileri alınarak 5 mL LB broth besiyerine inoküle edildi. Bu aşamalarda mutantlar için her zaman 20 µg/mL son hacimde

kloramfenikol eklemesi yapıldı. 18 saat boyunca 37 °C derecede çalkamalı koşullarda üretilen kültürden, 50 mL LB sıvı besiyerine 1/100 oranında inoküle edildi ve 37 °C 200 rpm çalkamalı koşullarda inkübasyona konuldu. Saatlik zaman aralıklarıyla optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümü yapılarak bir grafik oluşturuldu. Yine bu zaman dilimlerinde kültürlerden alınan porsiyonlar, PBS içerisinde seri dilüsyonun işlemine tabi tutuldu ardından Plate Count Agara (PCA) 100 µL hacimde yayma ekim ile inoküle edildi. 37 °C derecede 12 saat inkübasyonun ardından petri plakalarında oluşan koloniler sayıldı. Bu deney 3 teknik tekrar şeklinde gerçekleştirildi. Hesaplamalar için aşağıdaki formül kullanıldı. Optik yoğunluk ve koloni oluşturan birimlerin ilişkisi lineer regresyonla analiz edildi.

$$\log \text{KOB/mL} = \frac{\text{Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Ekilen kültür hacmi (mL)}}$$

3.2.4 *pagN* geni açısından mutant *S. Typhimurium* suşunun biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

Bir adezin olan *PagN* proteinini kodlayan *pagN* geninin silinmesinin *S. Typhimurium* biyofilm oluşturma kapasitesini ve biyofilm morfolojisini nasıl değiştireceği bu tezin esas sorusunu oluşturmaktadır. Biyofilm yapısındaki değişikliklerin izlenmesi ve tespitine ilişkin deneyler yapıldı. Bu denemelerde, *S. Typhimurium* 14028 suşu ve bu suşun *seqA* ve *pagN* genleri açısından mutantları, stoktan alınarak LB broth besiyerine (mutantlar için 20 µg/mL kloramfenikol içeren) inoküle edilerek 37 °C’de 18 saat boyunca 200 rpm çalkamalı koşullarda inkübe edildi. Ardından tuz içermeyen LB broth (LB^{-NaCl}) ortamına pasajlanarak üretildi.

3.2.4.1 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum kapasitesinin değerlendirilmesi

Biyofilm oluşum deneyleri, 96 kuyulu polistiren mikrotitre plakaları içerisinde tuz içermeyen LB broth besiyeri ortamında kantitatif olarak gerçekleştirildi. Belirtildiği gibi hazırlanan aktif kültürlerin optik yoğunluğu (OD₆₀₀) besiyeri ile seyreltilerek 0,2 değerine ayarlandı. Bu kültürlerden 30 µL alınarak 100 µL tuzsuz LB içeren kuyulara aktarıldı. Her deneme deseni 3 teknik tekrar olacak şekilde ayarlandı. Ardından statik koşullarda

24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat boyunca 20 ve 28 °C derecede inkübe edildi. Her inkübasyon süresi bitiminde besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyular tutunmayan hücreleri de uzaklaştırmak adına 3 defa steril 140 µL PBS tamponu ile yıkandı. Oda sıcaklığında kurtulan plaka kuyularına 140 µL % 95 metanol çözeltisi eklendi ve 10 dakika bekletilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Metanolün ortamdan uzaklaştırılmasından sonra tamamen kurutulmuş kuyulardaki sabitlenen biyofilm yapısı kristal viyole (% 0,1) ilavesinin ardından boyanmak üzere ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Matrikse bağlanmayan boyanın ortamdan uzaklaştırılması için iki kez distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelere tutunan boyayı çözmek amacıyla kuyulara 130 µL glasiyal asetik asit (% 33) aktarıldı ve plakalar takriben 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresini takiben biyofilme tutunan boyanın optik yoğunluğu, Elisa okuyucu (Biorad, California, ABD) ile ölçülerek (OD₅₉₅) belirlendi. Denemeler 2 deney tekrarı olacak şekilde kurgulandı.

Hesaplama, her bir deney grubu için saptanan optik yoğunluk değerlerinin ortalamasının, negatif kontrol (kör) optik yoğunluk değerlerinin ortalamasından çıkarılmasıyla gerçekleştirildi (Stepanovic vd. 2000).

3.2.4.2 Kongo Kırmızısı (CR) agarda biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi

S. Typhimurium 14028 ve bu suşun mutantlarının biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi amacıyla Kongo kırmızı (40 µg/mL) içeren besiyeri kullanıldı. Tuz içermeyen LB broth besiyerinde üretilen gecelik kültürlerden 20 µL alınarak Kongo kırmızısı katı besiyeri üzerine damlatma ekim yapıldı. Plakalar 20 °C’de 8 gün inkübe edildi. Agar üzerinde oluşan koloniler, renk ve yapı açısından incelenerek değerlendirildi. Deneme deseni en az 3 teknik tekrar ve 2 deney tekrarı olacak şekilde planlandı (Ahmad vd. 2016).

3.2.4.3 Kalkoflor Beyazı (CFW) içeren besiyerlerinde biyofilm yapısının değerlendirilmesi

Kalkoflor beyazı içeren sıvı ve katı besiyerlerinde, biyofilmin yapısal özellikleri değerlendirildi. Aktif kültürden kalkoflor boyası içeren (40 µg/mL) besiyerine ekim

yapıldı. Sıvı ortamdaki denemeler için 4,5 mL olacak şekilde hazırlanmış kalkoflor boyası içeren tuzsuz LB ortamına 500 µL aktif kültürden inoküle edildi. Deneme deseni en az 3 teknik tekrar 2 deney tekrarı olacak şekilde hazırlandı. Plaklar ve tüpler 20 °C derecede statik koşullarda 8 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 366 nm UV ışık altında (Biometra TI 2, USA) incelendi (Ahmad vd. 2016).

3.2.4.4 Bakterilerin pelikül oluşturma özelliklerinin değerlendirilmesi

Doğal tip ve mutant *S. Typhimurium* şuşlarının, sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma özelliklerinin incelenmesi için tuz içermeyen LB broth besiyeri 4,5 mL hacimlerde hazırlandı. Bu tüplere 500 µL aktif kültürlerden ilave edildi. Tüpler 20 °C derecede statik koşullarda 8 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde bakteriler pelikül oluşturma ve pelikül dayanıklılığı açısından değerlendirilerek kıyaslandı. Daha sonra tüpler boşaltılıp 2 defa distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutuldu ve kristal viyole (% 0,1) çözeltisi ile 10 dk boyunca boyandı.

3.2.5 Bakteriyel agregasyonun belirlenmesi

Agregasyon denemesi için *S. Typhimurium* doğal tip ve mutant şuşları LB broth besiyerinde üretildikten sonra durağan fazdayken santrifüj tüplerine alındı ve tüpler 10000 Xg'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatantın ortamdan uzaklaştırılmasının ardından peletler iki defa PBS ile yıkandı. Kültürlerin optik yoğunlukları (OD₆₀₀) 0,2 değerine ayarlandı ve 20°C'de statik koşullarda inkübe edildi. Her bir şuş için 3 teknik tekrar 2 deney tekrarı olacak şekilde deneme deseni izlendi. 0, 2, 4, 20 ve 24. saatlerde 600 nm'de optik yoğunluk değeri ölçülerek kaydedildi. Yüzde agregasyon katsayıları aşağıdaki formülle belirlendi (Merino vd. 2019).

$$\text{Agregasyon Katsayısı} = [(OD_0 - OD_t) / OD_0] \times 100$$

OD₀: İnkübasyondan önce ölçülen değer

OD_t: Her bir inkübasyon periyodunda ölçülen değer

3.2.6 Swimming ve swarming hareketlerinin izlenmesi

S. Typhimurium doğal tip ve mutant suşlarının flagella dönmesiyle desteklenen bireysel hareketi olan swimming ve yine flagella tarafından desteklenen çok hücreli bir yüzey hareketi olan swarming hareketleri incelendi. Swimming hareketi için % 0,3 oranında agar içeren yarı katı bir besiyeri kullanıldı. Swarming için ise % 0,5 agar ve kümesel kemotaksi hareketi için % 0,5 glukoz içeren besiyeri kullanıldı. Çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş gecelik kültür ortamından alınan tek koloniler bu besiyeri ortamlarının tam ortasına bırakıldı (Ahmad vd. 2016). Plakalar 20, 28 ve 37 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta 12 saat inkübe edildi. Her deney grubu için 3 paralel ekim yapıldı ve deney 2 kez tekrarlandı.

3.2.7 *S. Typhimurium* doğal tip mutantlarının hücre hattına tutunma denemeleri

S. Typhimurium doğal tip ve mutant suşlarının insan epitel hücrelerine adezyon ve invazyon kabiliyetinin belirlenmesi ve kıyaslanması amacıyla insan kolon hücre hattı Caco-2 kullanıldı. Denemelerden önce Caco-2 hücreleri, % 10 fetal sıgır serumu (FBS), antibiyotik ile desteklenmiş Dulbecco Modifiye Eagle Ortamında (DMEM) rutin olarak üretildi. Kültürler, nemlendirilmiş % 5 CO₂ atmosferinde 37 °C'de inkübe edildi. Adezyon ve invazyon analizleri için hücreler, 24 kuyulu hücre kültür plakalarına ekildi. Kültür ortamı iki günde bir değiştirildi. Denemeler 3 teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu denemelerde Gagnon vd (2013) tarafından tarif edilen protokol takip edildi.

3.2.7.1 Caco-2 hücrelerine bakteriyel adezyonun belirlenmesi

Aktif kültürler 8000 Xg'de 5 dakika boyunca santrifüjleme yoluyla geri kazanıldı, iki kez steril PBS yıkandı ve DMEM ortamında 2x10⁷ KOB/ml⁻¹ konsantrasyonunda süspansiyon edildi. Bakteriyel süspansiyonlar (kuyu başına 130 µL) doğrudan yıkanmış bağırsak epitel hücrelerinin üstüne ilave edildi ve 90 dakika boyunca 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tutunmayan bakteriler, hücre kültürlerinin

iki kez PBS ile yıkanması yoluyla uzaklaştırıldı. Tutunan bakterilere sahip hücreler, 250 µL tripsin-EDTA ile 37 °C'de 10 dakika boyunca muamele edildi, ardından tripsin reaksiyonunu durdurmak için 250 µL FBS içeren besiyeri ilave edildi. PBS'de seri 10 kat seyreltme yapıldı ve SS agar ortamına yayma ekim yapıldı. Deney grupları 3 teknik tekrar olacak şekilde hazırlandı. Gecelik inkübasyonun ardından koloniler sayıldı.

3.2.7.2 Caco-2 hücrelerine bakteriyel invazyonun belirlenmesi

Adezyon denemesi için tarif edildiği gibi hazırlanan bir bakteriyel süspansiyon 2 defa PBS ile yıkanmış Caco-2 hücreleri üzerine uygulandı ve 37 °C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi. Enfekte olmuş hücreler, kuyu başına 150 µg ml⁻¹ gentamisin içeren 250 µL DMEM eklenmeden önce iki kez PBS ile yıkandı ve hücre dışı hücreleri öldürmek için 37 °C'de 60 dakika daha bu antibiyotik ile inkübe edildi. Hücrelere invaze olmayan bakterileri uzaklaştırmak için PBS ile 2 defa yıkama adımının ardından 250 µL tripsin-EDTA ile 37 °C'de 10 dakika muamele edilerek hücreler plakadan ayrıldı. Daha sonra bağırsak hücreleri, kuyu başına 250 µL % 0,1'lik Triton X-100 çözeltisi eklenerek parçalandı. 37 °C'de 10 dakikalık inkübasyonun ardından yukarıda açıklandığı gibi invaziv bakteri sayısının belirlenmesi için örnekler toplandı. Seri dilüsyonun ardından ekim yapıldı ve ertesi gün sayım işlemi gerçekleştirildi.

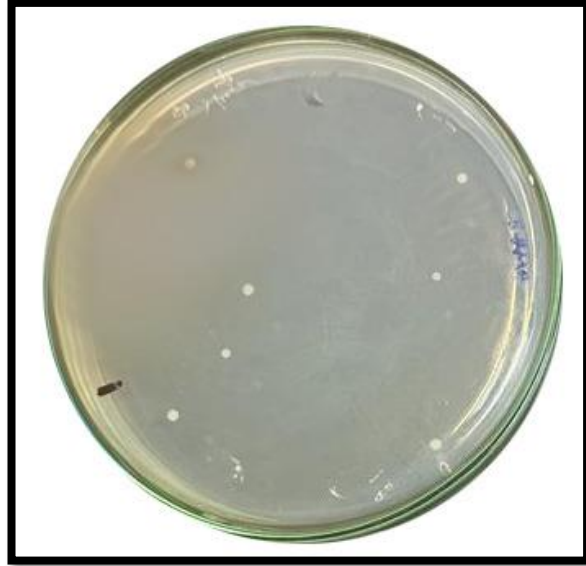
3.2.8 Verilerin istatistikî analizi

Sonuçların istatistikî analizinde SPSS 25 programı kullanıldı. Üreme eğrileri arasındaki ilişki, R² değerleri baz alınarak lineer regresyon analizi ile test edildi. Verilerin varyans analizi için tek yönlü ANOVA ile F ve p değerleri dikkate alınarak gerçekleştirildi. Grup farklılıklarının ileri analizi ise Post-hoc analiz yöntemlerinden Bonferroni metodu ile gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

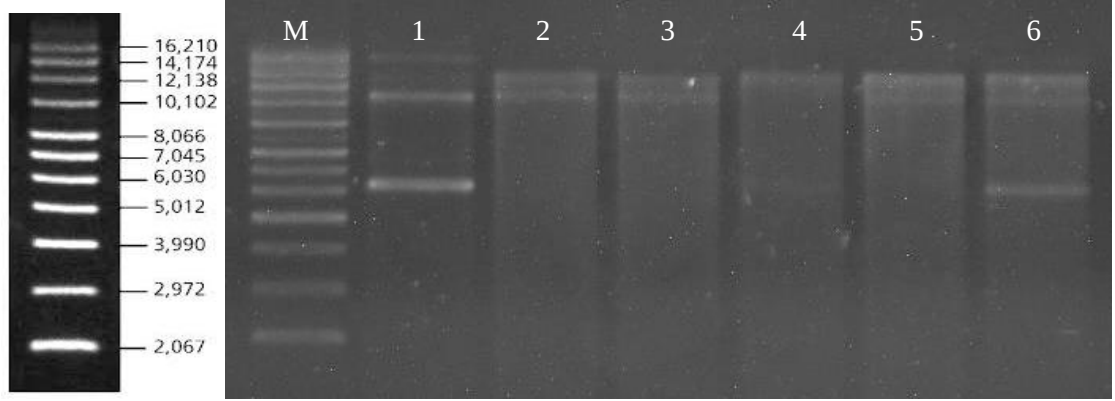
4.1 Lambda Red Genlerini Kodlayan pKD46 Plazmidinin *S. Typhimurium* 14028'e Aktarılması

pagN geni silinmiş mutantın oluşturulması amacıyla ilk olarak arabinoz promotörü kontrolünde λ red rekombinaz genlerinin ifadesini sağlayan pKD46 plazmidi *E. coli*'den izole edilerek elektroporasyon yolu ile *Salmonella* Typhimurium 14028 suşuna transforme edildi. Transformantlar 100 µg/mL amfisilin içeren LB agar ortamında seçildi (Şekil 4.1)



Şekil 4.1 pKD46 transformasyonu neticesi amfisilin içeren agardaki transformantlar

Seçilen koloniler üzerinden plazmid izolasyonu yapılarak pKD46 varlığı agaroz jel elektroforezi yoluyla tespit edildi (Şekil 4.2).

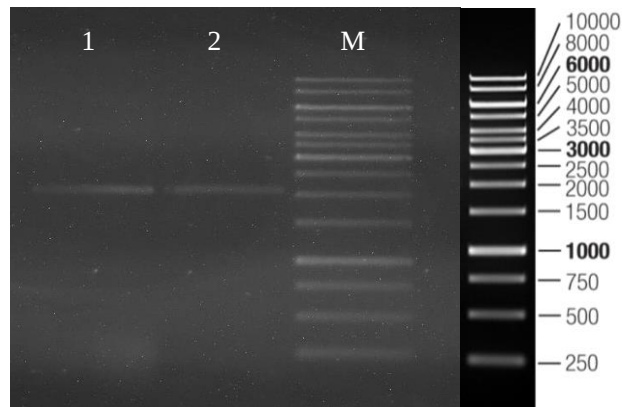


M: Süper sarmal DNA marker (Sigma, Germany) 1: *E. coli*'den izole edilen pKD46 plazmidi 2-6: Transformantlardan izole edilen pKD46 plazmidleri

Şekil 4.2 Transformantlarda pKD46 plazmidi varlığının doğrulanması

4.2 Kloramfenikol Gen Kaseti İnsersiyonu ile *S. Typhimurium*'da *pagN* Geninin Delesyonu

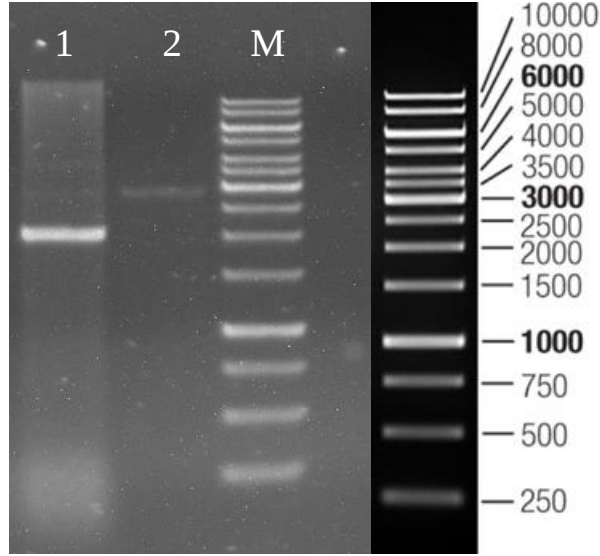
pagN geni açısından mutant suşun oluşturulması için *pagN* dizisi, bu dizi ile homolog uzantılara sahip primerler kullanılarak kloramfenikol direnç geniyle yer değiştirildi. Bu amaçla, kloramfenikol direnç kaseti için kalıp olarak kullanılan pKD3 plazmidi *E. coli*'den izole edildi (Şekil 4.3).



1-2: pKD3 plazmidi M: 1 kb marker (Thermo, USA)

Şekil 4.3 pKD3 plazmidi jel görüntüsü

Daha sonra plazmid *PvuI* enzimi ile kesilerek lineer hale getirildi ve ardından purifiye edilerek agaroz jelde görüntülendi.

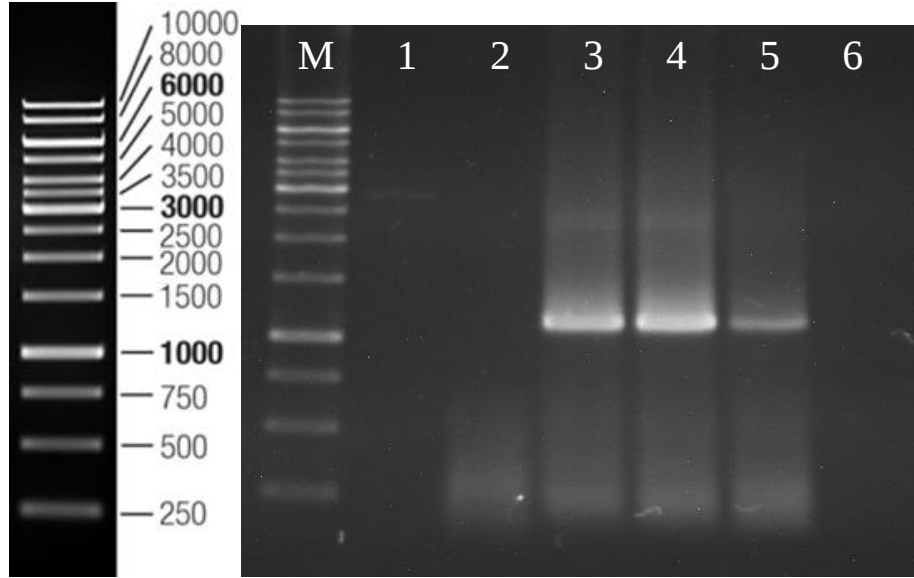


1: pKD3 plazmidi 2: Doğrusal hale getirilmiş pKD3 plazmidi M: 1 kb marker (Thermo, USA)

Şekil 4.4 PvuI enzimi ile kesilip lineer hale getirilmiş pKD3 plazmidi

Doğrusal hale getirilmiş pKD3 plazmidi kalıp olarak kullanılarak Touchdown PZR yoluyla *pagN* geni ile homolog uzantılara sahip kloramfenikol kaseti çoğaltıldı. Pürifiye edilmesinin kalıp DNA'nın ortamdan uzaklaştırılması amacıyla *DpnI* restriksiyon enzimi ile kesim işlemine tabii tutulduktan sonra pürifiye edildi. Bu örnekler % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi (Şekil 4.5).

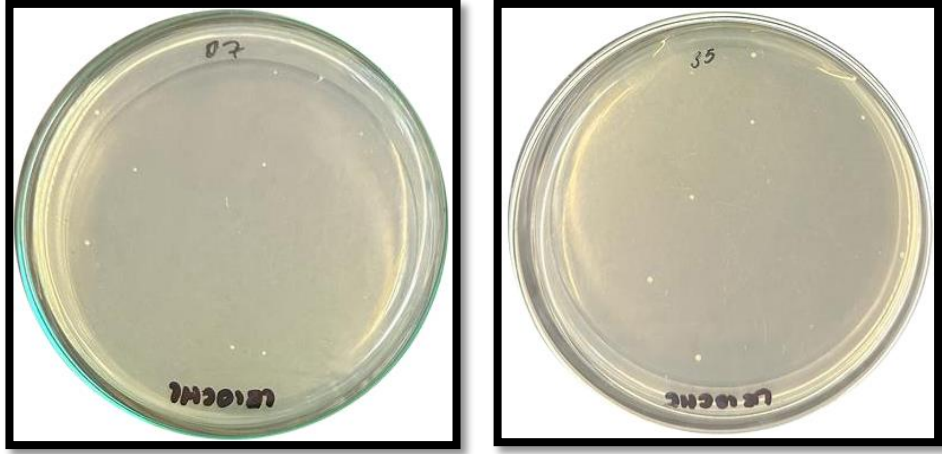
Elektroporasyon işleminde kullanılacak kesilmiş PZR ürününün saflık ve miktar analizi nanadrop aracılığıyla yapıldı.



M: 1 kb marker (Thermo, USA) 1: Doğrusal haldeki pKD3 plazmidi 2: PZR reaksiyonu için negatif kontrol 3: Touchdown PZR ürünü 4: Purifiye edilmiş Touchdown PZR ürünü 5: *DpnI* enzimi ile kesimin ardından saflaştırılan homolog kollara sahip direnç kaseti 6: *DpnI* kesimi için negatif kontrol

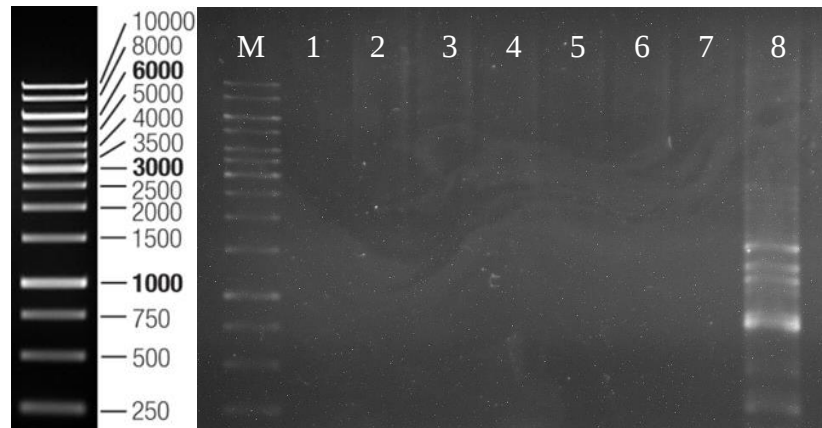
Şekil 4.5 Touchdown PZR ile çoğaltılan homolog kollara sahip kloramfenikol kaseti

DpnI ile kesilerek saflaştırılmış PZR ürününden farklı nanogramlarda kullanılarak transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Transformasyon neticesinde λ red Rekombinaz genlerinin ifadesi sayesinde kromozomal gen ile kloramfenikol direnç kaseti yer değiştirilmiş bakterilerin antibiyotik içeren seçici LB agarda üremesi beklendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *pagN* delesyonu neticesi kloramfenikol içeren LB agardaki transformantlar

Bu agar ortamındaki transformantlardan gDNA izolasyonu ardından ile ilgili primerler kullanılarak PZR ile doğrulama yapıldı (Şekil 4.7).



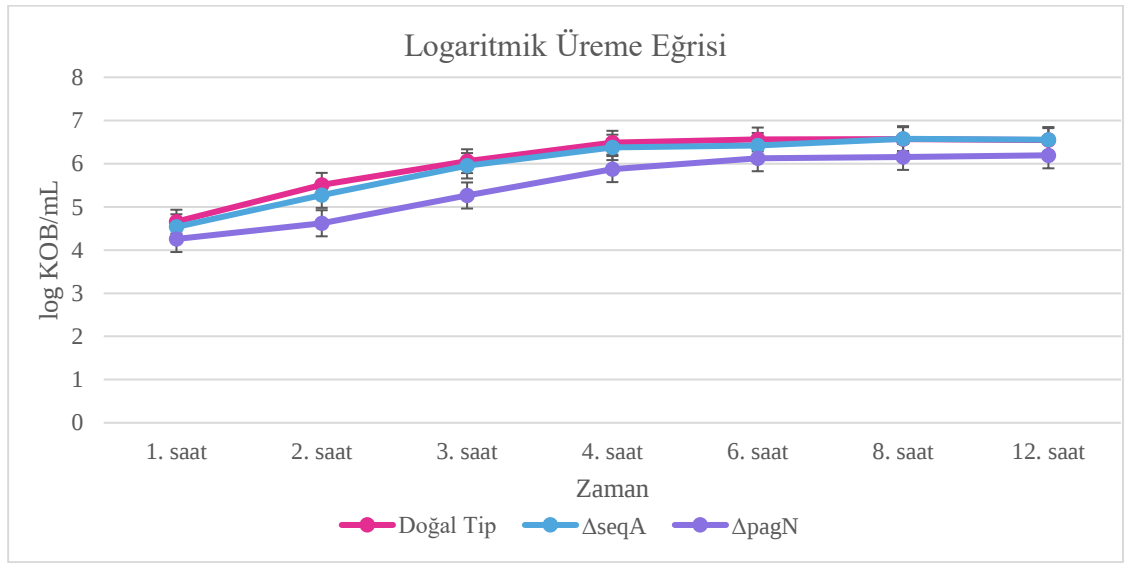
M: 1 kb marker (Thermo, USA) 1: Negatif kontrol 2-7: Delesyon açısından negatif koloniler 8: *pagN* geni delesyona uğratılmış transformant

Şekil 4.7 *pagN* delesyonu için doğrulama

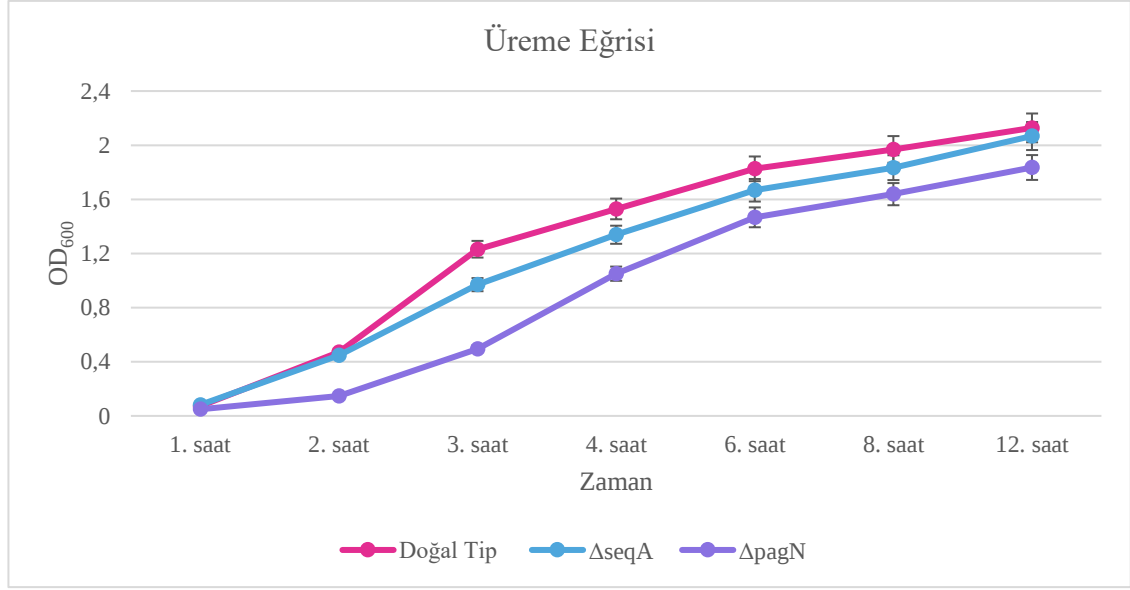
Red rekombinaz aracılı dizi spesifik rekombinasyon sonucu elde edilen *pagN* geni açısından mutant *Salmonella* Typhimurium suşu, bundan sonraki denemelerde kullanıldı.

4.3 S. Typhimurium 14028 Suşu ve Bu Suşun *seqA* ve *pagN* Mutantlarının Üreme Eğrilerinin Değerlendirilmesi

Salmonella Typhimurium 14028 doğal tip ve mutant suşlarının üreme eğrileri, absorbansa ve canlı hücre sayımına dayalı olarak 12 saat boyunca belirli aralıklarla takip edildi. Elde edilen birimleri ilişkilendirmek için doğrusal regresyon analizi kullanıldı ve doğal tip için R^2 değeri 0,912, *seqA* mutanıtı için 0,937 ve *pagN* mutanıtı içinse 0,980'dir (Şekil 4.8 ve 4.9). Bu deney verileri sonraki deneylerin planlanmasında kullandı.



Şekil 4.8 S. Typhimurium doğal tip ve mutantlarının logaritmik üreme eğrisi



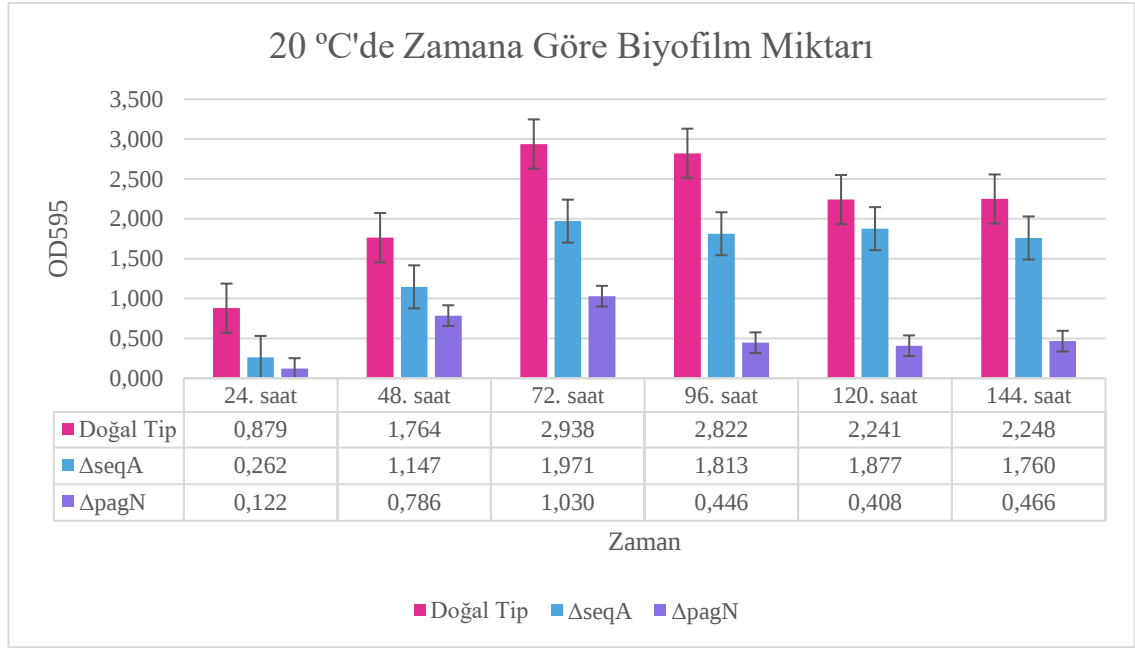
Şekil 4.9 S. Typhimurium doğal tip ve mutantlarının üreme eğrisi

Doğal tipe kıyasla *seqA* mutantının zamana göre üreme miktarında çok büyük bir farklılık gözlemlenmemesine karşın *pagN* mutantının üremesi diğer suşlara göre daha yavaş olmakla beraber durağan faza giriş vakti de gecikmektedir.

4.4 *pagN* Geni Açısından Mutant S. Typhimurium Suşunun Polistren Yüzeylerde Biyofilm Oluşum Kapasitesinin Değerlendirilmesi

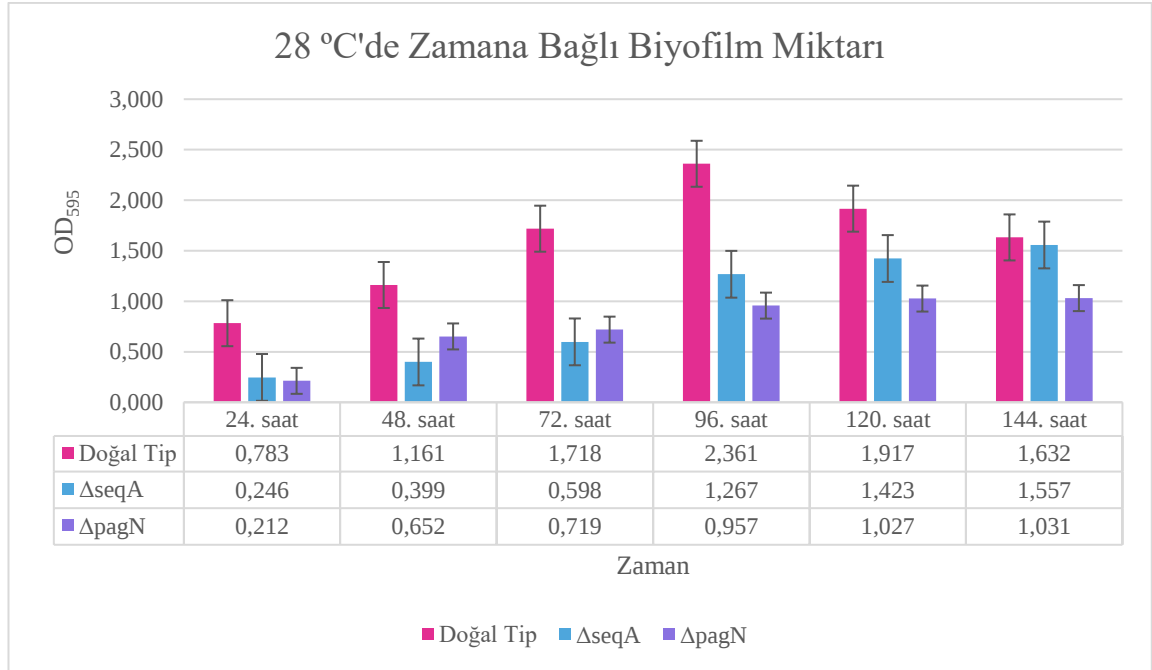
S. Typhimurium 14028 doğal tip ve mutant suşlarının polistiren yüzeyde iki farklı sıcaklıkta biyofilm oluşturma kabiliyeti 6 gün boyunca test edilerek kıyaslandı. Polistiren plakalardaki biyofilm ölçümlerinin sonuçları her teknik tekrardan ölçülen optik dansite değerlerinin ortalamasından, kontrol kuyularının (sadece tuzsuz LB sıvı besiyeri içeren kuyular) optik dansite değerlerinin ortalamasının çıkarılması yoluyla hesaplanmıştır.

Doğal tip suşu, 20 °C’de zamana bağlı artan biyofilm üretimi gösterirken 72. saatte maksimum biyofilm üretimine ulaştı. 28 °C’de ise en fazla biyofilm üretiminin 96. saatte olduğu tespit edildi. Doğal tip için optimum biyofilm üretim sıcaklığının 20 °C derece olduğu tespit edildi ve biyofilme ilişkin diğer denemelerde referans noktası olarak bu sıcaklık kullanıldı.



Şekil 4.10 20 °C derecede zamana göre biyofilm miktarı

20 °C’de yapılan biyofilm denemelerinde *seqA* mutantının her suş için maksimum değerin görüldüğü 120. saatte biyofilm miktarının doğal tipe kıyasla *seqA* mutantının biyofilm üretme kabiliyetinin % 33 azaldığı *pagN* mutantının biyofilm üretme kapasitesinin ise doğal tipe kıyasla % 65 oranında düştüğü saptandı ($p<0,05$). Devam eden saatlerde *pagN* mutantı için biyofilm üretim kapasitesinin oldukça düşük olduğu ve hemen hemen aynı optik yoğunluk değerlerinde olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

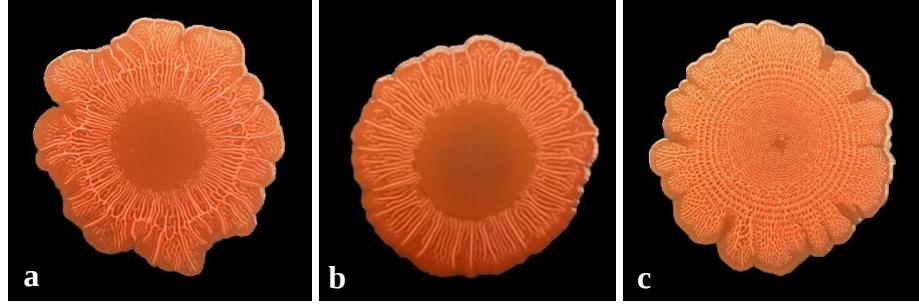


Şekil 4.11 28 °C derecede zamana göre biyofilm miktarı

28 °C’de yapılan biyofilm denemelerinde *seqA* mutantının, doğal tip için maksimum değerin görüldüğü 96. saatte biyofilm miktarının doğal tipe kıyasla % 46 azaldığı *pagN* mutantının biyofilm üretme kapasitesinin ise doğal tipe kıyasla % 59 azaldığı tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.11).

4.5 Kongo Kırmızısı (CR) Agarda Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

S. Typhimurium 14028 doğal tip ve mutant suşlarının biyofilm morfotipleri Kongo kırmızısı (CR) agarda tanımlandı. Curli fimbriya ve selüloz genlerinin göreceli ekspresyonuna göre farklı koloni morfotipleri kaydedilmiştir. Buna göre, yapısında selüloz ve curli bulundurmeyen biyofilm morfotipi düz ve beyaz (saw), yalnızca selüloz eksprese edilmiş morfoloji ise pembe, kuru ve pürüzlü (pdar), yalnızca curli fimbriyanın ekspresyonu ise kahverengi, kuru ve pürüzlü koloni morfotipi ile sonuçlanırken doğal tip suşlarda olduğu iki komponentin birden ifade edildiği durumlarda kırmızı, kuru ve pürüzlü biyofilm morfolojisi ortaya çıkar. Kongo kırmızı agarda yapılan denemelerin sonuçları Şekil 4.12’deki gibidir.



a: doğal tip b: $\Delta seqA$ c: $\Delta pagN$

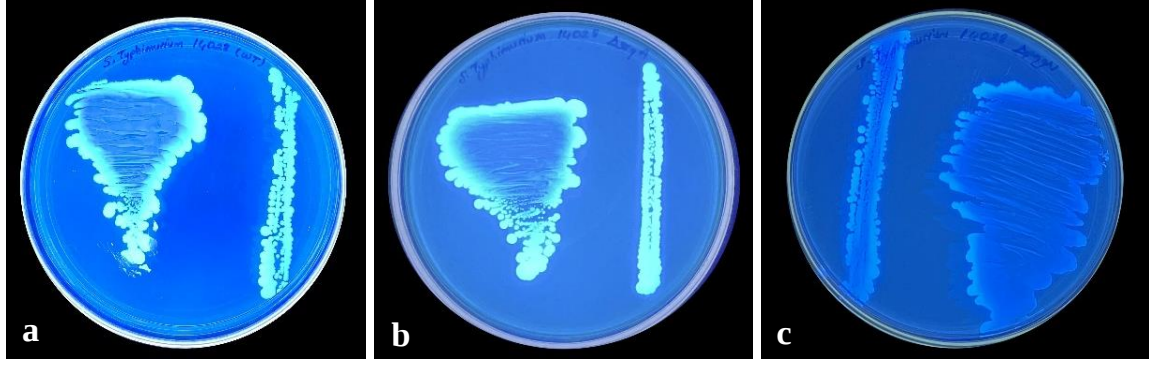
Şekil 4.12 Kongo kırmızısı agarda biyofilm morfortipleri

Bu doğrultuda, doğal tip suşun biyofilm morfortipi rdar olarak tanımlanırken mutantlarda bu morfortipten sapmalar görülmektedir. *seqA* ve *pagN* mutantlarının morfortipleri ise pdar morfortipi benzeri ara bir morfortipe kaymıştır.

4.6 Kalkoflor Beyazı (CFW) İçeren Besiyerlerinde Biyofilm Yapısının Değerlendirilmesi

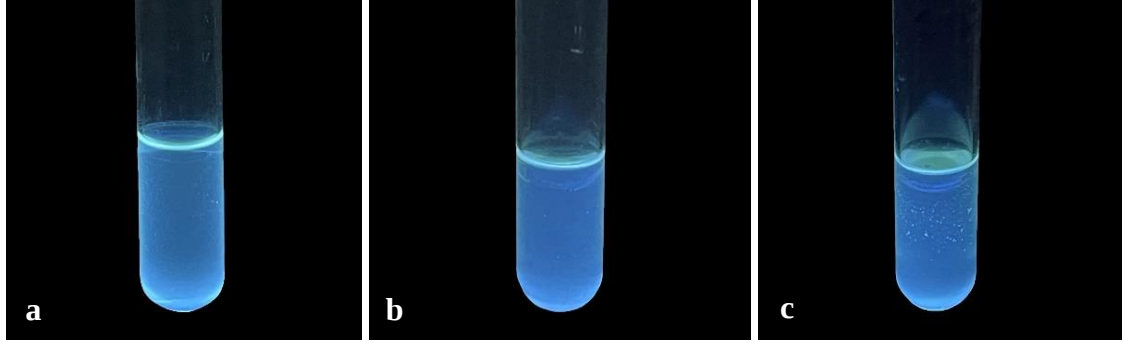
Suşların selüloz üretiminin belirlenmesi amacıyla yapılan kalkoflor boyasının selüloz indikatörü olarak kullanıldığı denemelerde petri plakaları ve tüpler 366 nm UV ışık altında incelendi.

Kalkoflor içeren agar ortamında doğal tipe kıyasla mutantların kalkoflor bağlama miktarının düştüğü ışına yoluyla gözlemlendi. Işıma miktarındaki bu farklılık selüloz varlığının azlığına işaret etmektedir (Şekil 4.13).



a: doğal tip b: $\Delta seqA$ c: $\Delta pagN$

Şekil 4.13 Kalkoflor beyazı içeren agarda selüloz bağlanma uygulaması



a: doğal tip b: $\Delta seqA$ c: $\Delta pagN$

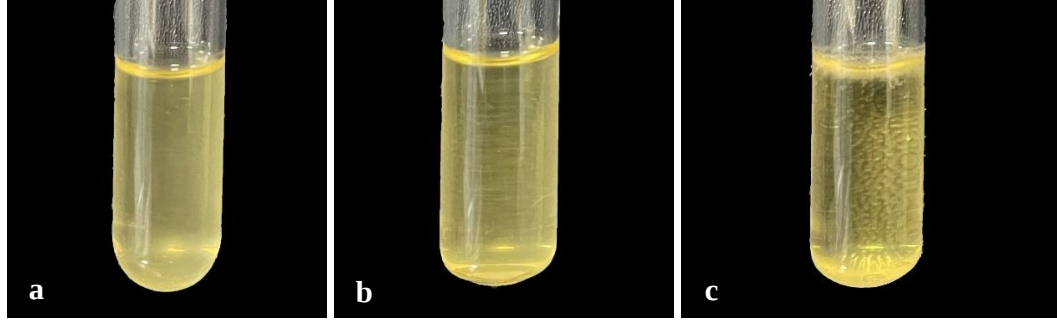
Şekil 4.14 Kalkoflor bağlama denemesi

Benzer durum kalkoflor içeren sıvı ortamda bakterilerce oluşturulan pelikül yapısı için de geçerlidir. Doğal tipe kıyasla floresans ışımadaki bu azalma mutantlarda selüloz üretiminin büyük ölçüde düştüğüne işaret etmektedir. Bunun yanında *pagN* mutantının bu ortamda ürettiği pelikül formunun kırılganlığı ışımanın izlenmesiyle belirgin bir hal almıştır (Şekil 4.14).

4.7 *Salmonella* Suşlarının Pelikül Oluşturma Özelliklerinin Değerlendirmesi

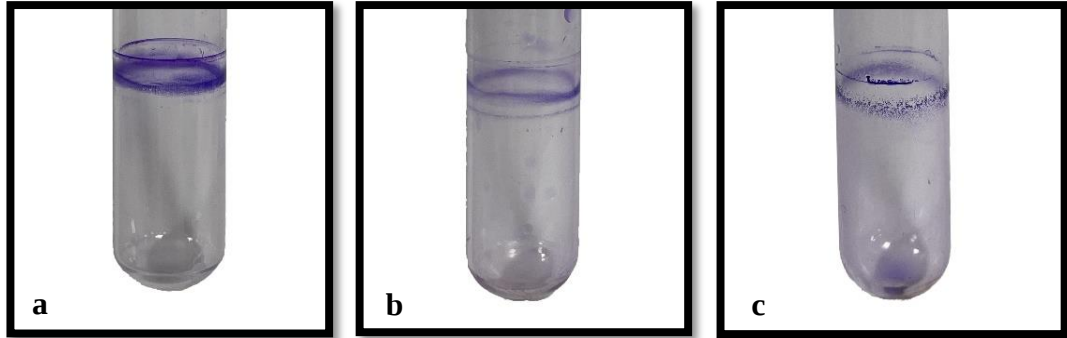
20 °C’de pelikül oluşturma özellikleri *Salmonella* doğal tip ve mutant suşları pelikül oluşumu, bakteri üremesinin yoğunluğu, pelikülde halka yapısının varlığı, ve karıştırmaya karşı yapının gösterdiği direnç temel alınarak incelendi.

Doğal tip suşun üremesi daha yoğun ve bulanıkken özellikle *pagN* mutantının daha berrak olduğu ve yine özellikle *pagN* mutantının pelikül yapısının diğer suşlara göre daha kolay dağılan kırılğan bir yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15). Ayrıca mutant bakterilerde halka yapısının daha ince olduğu bilhassa boyama yoluyla tespit edildi (Şekil 4.16).



a: doğal tip b: $\Delta seqA$ c: $\Delta pagN$

Şekil 4.15 Doğal tip ve mutant suşların pelikül yapısı



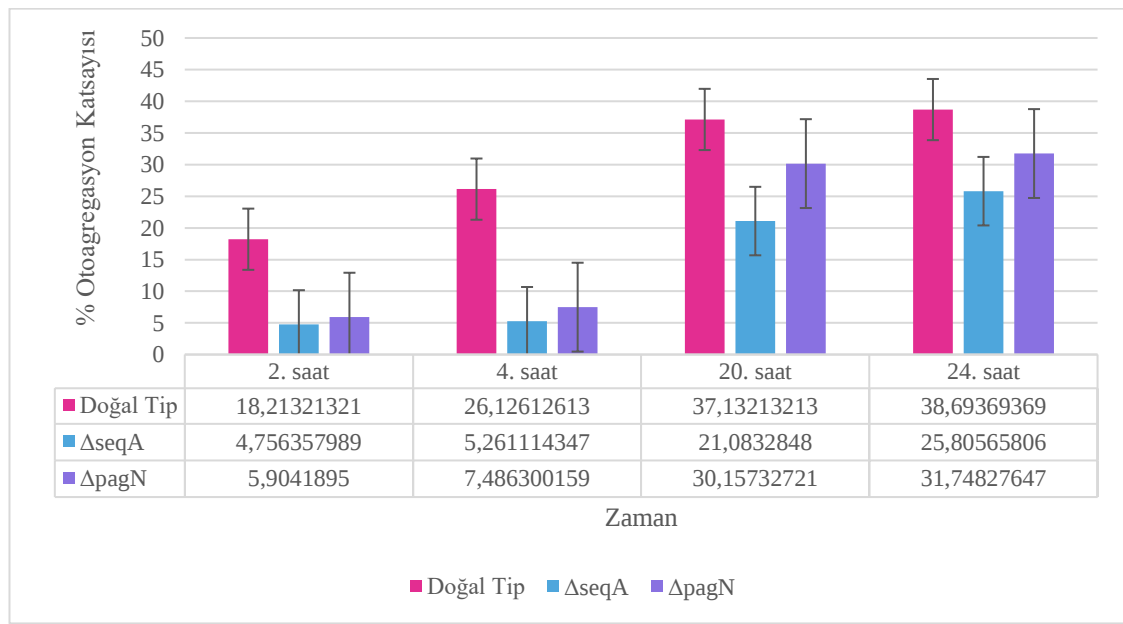
a: doğal tip b: $\Delta seqA$ c: $\Delta pagN$

Şekil 4.16 Doğal tip ve mutant suşların pelikül yapısının kristal viyole boyası ile boyanarak tespiti

4.8 Bakteriyel Agregasyonun Belirlenmesi

S. Typhimurium doğal tip ve mutantlarının zamana göre agregasyon miktarındaki değişiklik optik yoğunluğa bağlı olarak belirlendi ve otoagregasyon katsayıları yüzde cinsinden hesaplandı. Doğal tip suшта otoagregasyon miktarları 2., 4., 20. ve 24. saatte

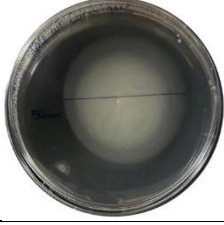
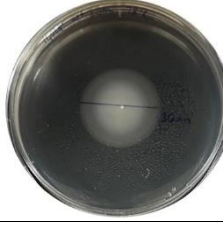
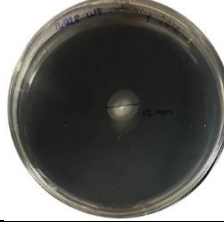
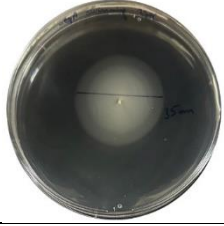
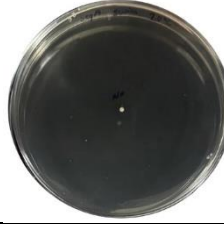
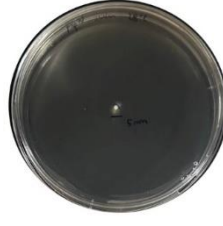
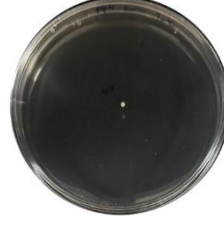
başlangıç zamanına oranla sırasıyla % 18,2, % 26,13, % 37,13 ve % 38,7 oranında artış gösterdi. Bu oranlar: *seqA* geni açısından mutant suşta % 4,75, % 5,26, % 21,08 ve % 25,80 iken *pagN* geni bakımından mutant suşta ise % 5,90, % 7,49, % 30,16 ve % 31,75'tir. Zamana göre agregasyon miktarı kıyaslandığında doğal tip suşa göre *seqA* mutanlığı oldukça düşük agregasyon kabiliyetine sahipken *pagN* mutanlığının agregasyon miktarı 20. saatten sonra artış göstermekte ve doğal tip suşa yaklaşmaktadır (Şekil 4.17). *S. Typhimurium* doğal tip ve mutant suşlarının zamana göre agregasyon kapasitelerindeki değişim istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.17 Doğal tip ve mutant suşların yüzde otoagregasyon miktarları

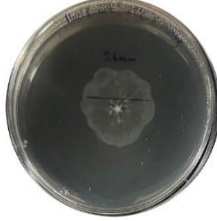
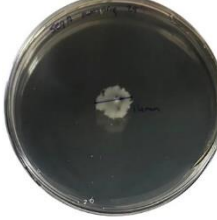
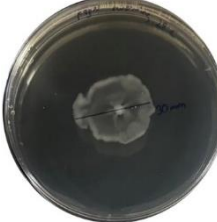
4.9 Swimming ve Swarming Hareketlerinin İzlenmesi

Salmonella doğal tip ve mutant suşlarının flagellaya bağlı swimming (yüzme) ve swarming (toplu göç) hareketleri, inokülasyon bölgesinden hareketin sonlandığı noktaya kadar yarıçap ölçümüyle belirlendi. *seqA* ve *pagN* geni açısından mutantların swimming hareketi kabiliyetlerinde doğal tip suşa kıyasla sırasıyla 37 °C derecede % 30 ve % 72 azalma 28 °C derecede % 40 ve % 83,3 azalma 20 °C derecede ise % 100 azalma görülmektedir (Şekil 4.18). Bu durum, *pagN* delesyonunun, swimming hareketini çok büyük oranda kısıtladığını göstermektedir.

Swimming			
	37 °C	28 °C	20 °C
Doğal tip	25 mm	15 mm	6 mm
			
$\Delta seqA$	17,5 mm	5 mm	Yok
			
$\Delta pagN$	7 mm	2,5 mm	Yok
			

Şekil 4.18 Sıcaklığa bağlı swimming (yüzme) hareketi

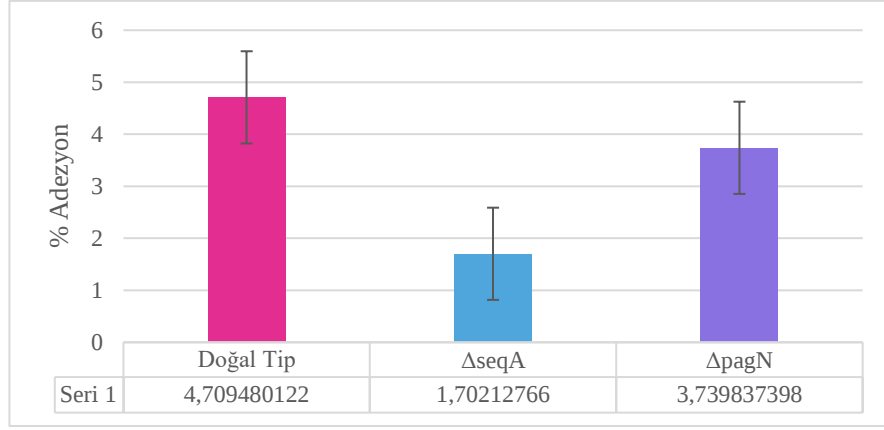
Swarming hareketi, doğal tip suşa kıyasla *seqA* geni açısından mutant suş 37, 28 ve 20 °C derecede sırasıyla % 26,6, % 20 ve % 60 azalırken bu durum *pagN* geni bakımından mutant suş için daha karmaşıktır. *pagN* geni bakımından mutant suşun swarming hareketliliğinde 37 °C derecede yalnızca % 1,5 azalma tespit edilirken 28 °C derecede % 15 artış hesaplandı ve 20 °C derecede ise *seqA* mutantına benzer şekilde % 60 azalma izlendi (Şekil 4.19).

Swarming			
	37 °C	28 °C	20 °C
Doğal tip	30 mm	13 mm	5 mm
			
$\Delta seqA$	22 mm	7 mm	2 mm
			
$\Delta pagN$	25,5 mm	15 mm	2 mm
			

Şekil 4.19 Sıcaklığa bağlı swarming (toplu göç) hareketi

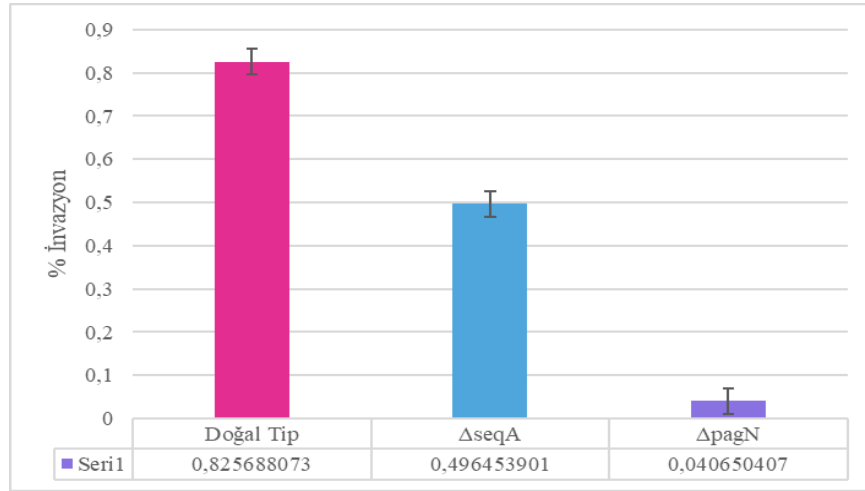
4.10 Caco-2 Hücre Hattında Adezyon ve İnvazyon Denemeleri

Caco-2 hücre hattında *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve mutant suşlarının adezyon ve invazyon denemeleri yapıldı. Sonuçlar hücreleri enfekte etmek için kullanılan edilen kültür miktarlarına oranlanarak hesaplandı. Caco-2 hücrelerine adezyon miktarı doğal tip için % 4,7 iken *seqA* mutanıtı için % 1,7 *pagN* geni bakımından mutant içinse % 3,7 tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 *Salmonella* doğal tip ve mutantların Caco-2 hücrelerine adezyonu

Caco-2 hücrelerine *Salmonella* invazyonu ise; doğal tip için % 0,82 iken *seqA* mutanlığı için % 0,4 *pagN* geni bakımından mutant içinse % 0,04 olarak tespit edilmiştir ($p < 0,05$). (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 *Salmonella* doğal tip ve mutantların Caco-2 hücrelerine adezyonu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enterik bir patojen olan *Salmonella*, çoğunlukla kontamine su veya gıdaların tüketilmesi yoluyla bulaşır. Patojen mideyi geçtikten sonra bağırsağa ulaşır ve patojenik döngüsünü sürdürmek için bağırsak epiteliyle etkileşime girer. Bu epitel hücrelerine tutunma ve invazyon, bağırsak kolonizasyonu ve epitel bariyerini geçmek için önemli adımlardır. *Salmonella* epitel hücrelere girişte hem sitoskeletin yeniden düzenlenmesi yoluyla gerçekleştirilen tetikleyici mekanizma ile hem de reseptör bağımlı fermuar mekanizmasıyla giriş yapabildiği bilinen bir bakteridir. Konak hücreye internalize olmasının ardından *Salmonella* içeren vakuol (SCV) içerisinde kalarak kendini doğal bağışıklık yanıtlardan korur (Haraga vd. 2008). Makrofajlar tarafından yakalandıktan sonra bu hücreleri, mezenterik lenf düğümlerine kan dolaşımına ve sonuçta dalak ve karaciğer gibi sistemik organlara yayılmak için bir vektör olarak kullanır (Monack vd. 1996, Galán vd. 2021, Koczerka vd. 2024). Enfeksiyonun akut aşamalarını takiben *Salmonella* safra kesesi gibi organlarda asemptomatik olarak varlığını sürdürebilir ve vücuttan atılımını hızlandırabilir (Crawford vd. 2010). *Salmonella*'nın epitel hücrelere tutunma ve invazyonunda rol alan tanımlanmış bileşenlerinden biri de PagN proteindir. Bu proteini kodlayan invazyonla ve virülansla ilişkili bazı genleri bulunduran SPI-6'da yer alan *pagN* geninin *Salmonella*'nın hayatta kalma, uyum sağlama ve rekabet becerilerinde ve dolayısıyla *Salmonella* patojenitesi ve virülansı ayrıca yayılımı için önemli olduğuna dair literatürde deneysel çalışma sonuçları mevcuttur (Conner vd. 1998, Lambert ve Smith 2008, Yang vd. 2013). Bunlara ek olarak güncel bir çalışma *pagN* geninin, sistemik enfeksiyonun oluşturulmasında diğer invazinlerden daha önemli bir rolü olduğunu gösteren kanıtlar sunmaktadır (Koczerka vd. 2024). Bununla birlikte adezin ve invazin görevinde olduğu bilinen bir proteini sentezleyen *pagN* geninin doğası hakkındaki bilgiler kısıtlıdır. Bu literatür verilerinden hareketle bir dış membran proteini kodlayan *pagN* geninin, daha önce test edilmemiş olan *Salmonella* biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisinin de bulunma potansiyeli öngörüsü ile oluşturduğumuz hipotezimizi bu tez kapsamında test ettik.

Çalışmamızda, *S. Typhimurium* ATCC 14028 doğal suşu ve onun *pagN* geni delesyona uğratılmış mutantı yanında, araştırma grubumuz tarafından daha önceki çalışmalarda elde

edilen ve biyofilm oluşunun regülasyonuna katıldığı belirlenmiş (Uğur vd. 2018) ve transkriptomik analiz sonucu biyofilm oluşumu esnasında *pagN* geninin ekspresyonunda artış olduğu saptanan *seqA* geninin mutant suşu (Has vd. 2023), *pagN* geninin fonksiyonunun yanında regülasyon karakteristikleri hakkında da bilgi sahibi olmak amacıyla kullanılmıştır.

Bu doğrultuda yürüttüğümüz deneysel çalışmalarda *pagN* ve *seqA* geni mutantlarında farklı sıcaklıklarda biyofilm oluşunun istatistiki açıdan anlamlı ($p<0,05$) düzeylerde düşüşü her iki genin ve dolayısıyla kodladıkları proteinlerin *Salmonella*'da biyofilm oluşumu üzerinde kritik bazı rollere sahip olduklarına işaret etmektedir. Burada en dikkat çeken sonuç, evrensel literatür verileri (Römling vd. 2000, García vd. 2004, Latasa vd. 2005) yanında çalışma grubumuz tarafından yürütölen araştırmalarda da (Eran vd. 2020, Özdemir vd. 2021, Has vd. 2023, Oğuz vd. 2023) farklı genlerin biyofilm yapıları üzerinde belirlenen etkileri birlikte değerlendirildiğinde; *pagN* geninin belirgin bir üstönlük göstermesidir. Öyle ki *pagN* geni mutantlarında biyofilm üretme kabiliyetinde azalma, *Salmonella* biyofilm yapılarının ana regölatörü olarak kabul edilen *csqD* geni mutantlarından bile daha yüksek düzeyde meydana gelmiştir. Tez çalışmasında elde edilen ve evrensel literatüre doğrudan katkı değer taşıyan ana bulgumuz bu şekilde özetlenebilir. Diğer yandan *pagN* geninin *Salmonella* biyofilm yapıları üzerindeki etkinliğinin ilk kez bu çalışma ile araştırılması ve aşağıda tekrar özetlenen bulgularla kanıtlanması da çalışmanın orjinalitesinin kanıtlarıdır.

Yukarıda özetlenen genetik ve fizyolojik kanıtlara ek olarak, Kongo kırmızısı (CR) içeren agar ortamlarında yürütölen denemelerde *pagN* ve *seqA* mutantlarının biyofilm morfolipinde doğal suşun morfolipi olan rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) görünümünden sapmalar meydana gelerek pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) morfolip benzeri ara bir morfolipe dönüşümü belirlenmiştir. Ayrıca, Kalkoflor beyazı içeren katı ve sıvı besiyeri ortamlarında yürütölen denemeler ile de *pagN* ve *seqA* mutantlarının selöloz üretme yeteneklerinde belirgin bir düşüş olduğu da tanımlanmıştır. Son olarak, *Salmonella* doğal suşu ve mutantlarında hava-sıvı ara fazında peliköl oluşturma özellikleri karşılaştırmalı bir şekilde değerlendirildiğinde; mutantların peliköl yapılarının daha kırılğan ve halka yapısının daha ince olduğu görölmüştür. Bu durum denemelerimizde kontrol olarak kullanılan *seqA* geni yanında *pagN* geninin de, *Salmonella* biyofilm matriksinin ana

bileşenleri olan selüloz ve kıvrımlı fimbriya üretimi üzerinde kantitatif bir etkiye sahip olduğunu ve daha da önemlisi söz konusu elemanların üretiminin düşmesinin biyofilm üretimini dramatik bir şekilde değiştirebileceğini kanıtlamaktadır. Söz konusu *pagN* geni mutantında bu düşüşün maksimum oranda meydana gelişinin temel kaynağını ise, sadece bu genin selüloz ve kıvrımlı fimbriya üretimi üzerindeki etkisini açıklamak olası değildir. Ancak *pagN* geninin aynı zamanda bir adezin/invazin olan PagN proteininin genetik determinant olduğu dikkate alındığında (Lambert ve Smith 2008) söz konusu etkinin fizyolojik esası anlaşılmaktadır. Zira bu amaçla yürüttüğümüz denemelerde *pagN* ve *seqA* geni mutantlarında adezyon ve invazyon oranlarının, doğal suşa oranla anlamlı bir şekilde düşmesi ve *pagN* geninin esasen invazin üretimini kontrol ettiğinin belirlenmesi *pagN* geninin *Salmonella*'da biyofilm üretimi ve dolayısı ile patojenite üzerindeki etkinliğinin biyokimyasal ve fizyolojik esasına yönelik yeni bir görüşün geliştirilmesine esas olacak ilk bulgulardır. Çalışmamızda, *Salmonella*'da bulunan çok sayıda adezin kısmen de *seqA* geni kontrolünde olduğundan, adezin üretiminde *pagN* geninden daha yüksek bir etkinlik belirlenmiştir. Adezinler *Salmonella*'nın biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunma elemanlarıdır. Bu anlamda biyofilm oluşumunda etkinliklerinin invazinlerden daha yüksek olacağını düşünmek daha akla yatkın görünse de, *Salmonella* popülasyonunda adezyon tek hücreye kadar indirgense bile kısa sürede tutunulan yüzeyde kolonizasyonun maksimum düzeye ulaşabilmesi kuvvetli bir olasılıktır. Dolayısı ile, bu yüzey agregatlarından biyofilm yapısının oluşumunu teşvik edecek diğer moleküler elemanlar, söz konusu tutunma yüzeylerinde biyofilm gelişimi için daha kritik bir önem taşımaktadır. Çalışmamızda invazyon denemelerinden elde ettiğimiz ve yukarıda özetlediğimiz bulgular, *pagN* geninin biyofilm oluşumu üzerine ana etkinliğini, invazin üretimi ile gösterdiğine işaret etmektedir. PhoP/PhoQ ikili regülatör sistemlerinin regülasyonuna bağlı olduğu bilinen PagN üretiminde; PhoQ sitozoldeki asidik pH, ozmolaritedeki artış, düşük periplazmik magnezyum konsantrasyonu, kısa zincirli yağ asitleri gibi çevresel değişimlerin algılayıcısı, PhoP ise bu sinyallere bağlı olarak bakteriyel virülans, hücre yüzeyi modifikasyonları ve antimikrobiyal ajanlara direnç gibi yanıtların üretiminde temel rolü oynayan sinyal üreticisi olarak görev almaktadır (Véscovi vd. 1996, Chamnongpol vd. 2003, Shin ve Groisman 2005, Kato ve Groisman 2008, Groisman vd. 2021). Bu literatür verileri ışığında tutunmadan sonraki aşamada yukarıda tanımlanan ikili regülatör sistemler aracılığı ile PagN üretiminin biyofilm

oluşumunun fizyolojik esasını da belirleyen hücre yüzey değişimlerinin başladığının yani biyofilm üretiminin teşvik edildiğinin önemli bir belirteci olduğunu söylemek olasıdır. Zira adezyonda *Salmonella*'nın PagN yanında daha birçok adezin içermesi bu aşamada bu bakterinin adezyonda PagN proteinine ciddi bir ihtiyaç duymadığını göstermekte ve daha önemlisi yukarıda ifade edildiği üzere tutunma miktarının da biyofilm üretme etkinliği ile doğrudan bir ilişkisi bulunmamaktadır. Dolayısı ile PagN'nin *Salmonella* patojenitesindeki rolü, tutunmadaki adezin rolünden çok daha önemlidir (Koczerka vd. 2024). Ancak bugüne kadar invazinlerin biyofilm oluşumundaki rolüne dair herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızın verileri, PhoP/PhoQ ikili regülatör sistemlere bağlı olarak PagN invazininin biyofilm oluşumundaki dolaylı rolünü açıkça göstermektedir. Ancak bu yüksek etkinliği tek başına dolaylı bir etki olarak açıklamak olası değildir. Çalışmamızda PagN invazininin biyofilm oluşumundaki rolünün doğrudan kanıtları ise, swimming ve swarming hareket üzerine etkinliğinin belirlendiği fizyolojik çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Bu denemelerde *pagN* geni mutantında swimming hareketin çok yüksek düzeyde düşüşü, biyofilm oluşturulacak yüzeyle aktif karşılaşma olasılığını minimize ettiğinin ve swarming hareketin de artışının biyofilm olgunlaşmasını kısıtladığının kanıtları olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda sınırlı deneysel kanıtlar olmasına rağmen, elde edilen bulgular ışığında invazin üretimindeki artışın biyofilm matriks oluşumunu ve bu yolla da biyofilm oluşumunu önemli ölçüde teşvik ettiğini söylemek olasıdır. Bu öngörünün kesinlik kazanabilmesi için, halen ilave biyokimyasal ve fizyolojik kanıtlara gereksinim olduğu dikkatten kaçırılmamalıdır.

Çalışmamızın devamında zamana göre yüzde otoagregasyon miktarındaki değişim izlenmiştir. *pagN* geni açısından mutant süşun yüzde agregasyon değerinde büyük bir değişiklik gözlenmezken *seqA* mutantında bu katsayı belirgin şekilde düşmüştür. Bunun *seqA* delesyonu sonucu bu gen tarafından regüle edilen agregasyonla ilişkili çok sayıda yapının ekspresyonunun düşmesi nedeni ile açıklanması mümkündür. Bu veriler aynı zamanda hücre agregatlarını da biyofilm yapıları gibi değerlendiren birçok literatür bilgisini (Sauer vd. 2022, Kragh vd. 2023) çürütmesi açısından önemlidir. Zira hücre agregatlarında genetik ve biyokimyasal farklanmalar genellikle beklenmezken, biyofilm yapılarında söz konusu farklanmalar yanında hücrelerarası kooperasyon zorunludur.

Çalışmadan elde edilen veriler uygulama açısından değerlendirilirdirilecek olur ise; elde ettiğimiz verilerden hareketle PagN proteininin çok güçlü bir aşı geliştirme ajanı ve ayrıca biyofilm yapıları ile mücadele için etkin bir hedef olabileceği, endüstriyel ve klinik çalışmalarda öncelikle dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., & O'Connor, C.D. 2001. Proteomic detection of PhoPQ-and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *PROTEOMICS: International Edition*, 1(4), 597-607.
- Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E., & Adenubi, O. T. 20 Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia microbiologica*, 56, 497-503.
- Agbor, T. A., & McCormick, B. A. 2011. *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cellular microbiology*, 13(12), 1858-1869.
- Ahmad, I., Lamprokostopoulou, A., Le Guyon, S., Streck, E., Barthel, M., Peters, V., & Römling, U. 2011. Complex c-di-GMP signaling networks mediate transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PloS one*, 6(12), e28351.
- Ahmad, I., Rouf, S. F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Le Guyon, S., & Römling, U. 2016. BcsZ inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial cell factories*, 15, 1-15.
- Akçelik, N., & Akçelik, M. 2022. What makes another life possible in bacteria? Global regulators as architects of bacterial biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 236.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A. I., Burnham, K. D., & Maurer, R. 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Molecular microbiology*, 35(3), 635-646.
- Amano, A. 2010. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology* 2000, 52(1).
- Arnold, J. W., & Yates, I. E. 2009. Interventions for control of *Salmonella*: Clearance of microbial growth from rubber picker fingers. *Poultry Science*, 88(6), 1292–1298.
- Bao, H., Wang, S., Zhao, J. H., & Liu, S. L. 2020. *Salmonella* secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. *Microbiological Research*, 241, 126591.
- Barak, J. D., Jahn, C. E., Gibson, D. L., & Charkowski, A. O. 2007. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(9), 1083-1091.
- Barilleau, E., Védrine, M., Koczerka, M., Burlaud-Gaillard, J., Kempf, F., Grépinet, O., Wiedemann, A. 2021. Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of *Salmonella* Typhimurium. *BMC microbiology*, 21(1), 1-18.
- Barilleau, E., Védrine, M., Koczerka, M., Burlaud-Gaillard, J., Kempf, F., Grépinet, O., Virlogeux-Payant, I., Velge, P., & Wiedemann, A. 2021. Investigation of the

- invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of *Salmonella* Typhimurium. BMC Microbiology, 21(1), 153.
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. 2006. Curli biogenesis and function. Annu. Rev. Microbiol., 60, 131-147.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella* typhimurium: Role in bacterial interactions with epithelial cells. Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases, 149-158.
- Bernal-Bayard, J., & Ramos-Morales, F. 2018. Molecular mechanisms used by *Salmonella* to evade the immune system. Current issues in molecular biology, 25(1), 133-168.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V. 2015. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. Microbial biofilms, 163-199.,
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V. 2015. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. Microbial biofilms, 163-199.
- Bhoite, S., Gerven, N. V., Chapman, M. R., & Remaut, H. 2019. Curli Biogenesis: Bacterial amyloid assembly by the Type VIII secretion pathway. EcoSal Plus, 8(2).
- Boumart, Z., Velge, P., & Wiedemann, A. 2014. Multiple invasion mechanisms and different intracellular Behaviors: A new vision of *Salmonella*-host cell interaction. FEMS microbiology letters, 361(1), 1-7.
- Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J., & Curtiss III, R. 2001. MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Molecular microbiology, 41(2), 349-363.
- Campbell, J. V., Mohle-Boetani, J., Reporter, R., Abbott, S., Farrar, J., Brandl, M., et al. 2001. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. The Journal of Infectious Diseases, 183(6), 984-987.
- Castelli, M. E., Vescovi, E. G., & Soncini, F. C. 2000. The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*. Journal of Biological Chemistry, 275(30), 22948-22954.
- Chamnongpol, S., Cromie, M., & Groisman, E. A. 2003. Mg²⁺ sensing by the Mg²⁺ sensor PhoQ of *Salmonella enterica*. Journal of molecular biology, 325(4), 795-807.
- Charles, R. C., Harris, J. B., Chase, M. R., Lebrun, L. M., Sheikh, A., LaRocque, R. C., & Ryan, E. T. 2009. Comparative proteomic analysis of the PhoP in *Salmonella enterica* serovar Typhi versus Typhimurium. PLoS One, 4(9), e6994.
- Coenye, T. 2013. 'Biofilms' in Maloy, S. & Hughes, K., Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition), San Diego: Academic Press, 335-337.

- 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.
- Conner, C.P., Heithoff, D.M., Julio, S.M., Sinsheimer, R.L., Mahan, M.J. 1998. Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strain S. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4641-4645.
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), 242-248.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322
- Craig, L., & Li, J. 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current opinion in structural biology*, 18(2), 267-277.
- 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.
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramirez-Aguilar, M. D. L. L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C., & Gunn, J. S. 2010. Gallstones play a significant role in *Salmonella spp.* gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4353-4358.
- Dalebroux, Z. D., & Miller, S. I. 2014. *Salmonellae* PhoPQ regulation of the outer membrane to resist innate immunity. *Current opinion in microbiology*, 17, 106 113.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K 12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:6640–6644.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2(2), 114–122.
- de Rezende, C. E., Anriany, Y., Carr, L. E., Joseph, S. W., & Weiner, R. M. 2005. Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7345–7351.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., & Wood, T. K. 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental microbiology*, 9(2), 332-346.
- Dong, H., Peng, D., Jiao, X., Zhang, X., Chen, S., Lu, Y., ... & Liu, X. 2011. Construction and characterization of an *ompR* gene deletion mutant from *Salmonella enteritidis*. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, 51(9), 1256-1262.
- Donlan R. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 7:277 281
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Douglas LJ. 2003. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11:30–36

- Dufresne, K., & Daigle, F. 2017. *Salmonella* fimbriae: What is the clue to their hairdo. Current Topics in *Salmonella* and Salmonellosis, 59-79.
- Duncan, M. J., Mann, E. L., Cohen, M. S., Ofek, I., Sharon, N., & Abraham, S. N. 2005. The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37707-37716.
- Dunne MW. 2002. Bacterial adhesion—seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15:155–166
- Eran, Z., Akçelik, M., Yazıcı, B. C., Özcengiz, G., & Akçelik, N. 2020. Regulation of biofilm formation by *marT* in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Biology Reports*, 47, 5041-5050.
- Evans, M. L., & Chapman, M. R. 2014. Curli biogenesis: Order out of disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1551-1558.
- Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. 2019. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 85:e00591-19.
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., & Heffron, F. 1986. Mutants of *Salmonella* typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(14), 5189-5193.
- Finlay, B. B., & Falkow, S. 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Molecular microbiology*, 3(12), 1833-1841.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Folkesson, A., Advani, A., Sukupolvi, S., Pfeifer, J. D., Normark, S., & Lofdahl, S. 1999. Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. In *Molecular Microbiology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 612–622).
- Folkesson, A., Löfdahl, S., & Normark, S. 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. In *Research in Microbiology* (Vol. 153, Issue 8, pp. 537–545).
- Gagnon, M., Berner, A. Z., Chervet, N., Chassard, C., & Lacroix, C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of microbiological methods*, 94(3), 274-279.
- Galán, J. E. 2021. *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 716-725.
- García, B., Latasa, C., Solano, C., Portillo, F. G. D., Gamazo, C., & Lasa, I. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular microbiology*, 54(1), 264-277.

- Gerstel, U., Park, C., & Römling, U. 2003. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Molecular microbiology*, 49(3), 639-654.
- Giaccone, V., Catellani, P., & Alberghini, L. 2011. Food as cause of human salmonellosis. *Salmonella—A Dangerous Foodborne Pathogen*, 47.
- Giaouris, E. D., & Nychas, G. J. 2006. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, 23(8), 747–752.
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., et al. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722–7730.
- Gómez-Aldapa, C. A., Torres-Vitela, M. D. R., Villarruel-López, A., & Castro-Rosas, J. 2012. The role of foods in *Salmonella* infections. *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen*, 21-46.
- Groisman, E. A., & Ochman, H. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in microbiology*, 5(9), 343-349.
- Groisman, E. A., Duprey, A., & Choi, J. 2021. How the PhoP/PhoQ system controls virulence and Mg²⁺ homeostasis: lessons in signal transduction, pathogenesis, physiology, and evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3), 10-1128.
- Gunn, J. S., Belden, W. J., & Miller, S. I. 1998. Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella* typhimurium chromosome. *Microbial Pathogenesis*, 25(2), 77–90.
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034–1043.
- Hamilton, S., Bongaerts, R. J., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., & Hinton, J. C. 2009. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC genomics*, 10, 1-21.
- Hansmeier, N., Miskiewicz, K., Elpers, L., Liss, V., Hensel, M., & Sterzenbach, T. 2017. Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Scientific Reports*, 7(1), 10326.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53-66.
- Has, E. G., Akcelik, N., & Akcelik, M. 2023. Comparative global gene expression analysis of biofilm forms of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 and its *seqA* mutant. *Gene*, 853, 147094.
- Heithoff, D. M., Conner, C. P., Hentschel, U., Govantes, F., Hanna, P. C., & Mahan, M. J. 1999. Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 799–807.
- Hermansson, M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 14(1-4), 105-119.

- Holden, N., Totsika, M., Dixon, L., Catherwood, K., & Gally, D. L. 2007. Regulation of P-fimbrial phase variation frequencies in *Escherichia coli* CFT073. *Infection and immunity*, 75(7), 3325-3334.
- Homoe, P., Bjarnsholt, T., Wessman, M., Sorensen, H. C., & Johansen, H. K. 2009. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 266(10), 1533–1538.
- Hou, S., Wang, S., Zhao, X., Li, W., Gao, J., Wang, Y., & Zhu, Y. 2022. Establishment of indirect ELISA method for *Salmonella* antibody detection from ducks based on PagN protein. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 424.
- Huang, J., Chen, S., Huang, K., Yang, L., Wu, B., & Peng, D. 2015. Identification of *rpoE* gene associated with biofilm formation of *Salmonella* pullorum. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 55(2), 156-163.
- Hume, P. J., Singh, V., Davidson, A. C., & Koronakis, V. 2017. Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* Entry Toolkit. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00348>
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. 2009. *Salmonella*—the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular microbiology*, 11(11), 1579-1586.
- Jesudhasan, P. R., Cepeda, M. L., Widmer, K., Dowd, S. E., Soni, K. A., Hume, M. E., & Pillai, S. D. 2010. Transcriptome analysis of genes controlled by luxS/autoinducer-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne pathogens and disease*, 7(4), 399-410.
- Ji, Y., Li, W., Zhang, Y., Chen, L., Zhang, Y., Zheng, X., ... & Ni, B. 2017. QseB mediates biofilm formation and invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microbial pathogenesis*, 104, 6-11.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U., & Melefors, Ö. 2010. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella* Typhimurium. *Environmental microbiology*, 12(2), 524-540.
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 367–372.
- Kato, A., & Groisman, E. A. 2008. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Bacterial signal transduction: networks and drug targets*, 7-21.
- Kingsley, R. A., Santos, R. L., Kestra, A. M., Adams, L. G., & Bäumler, A. J. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Molecular microbiology*, 43(4), 895-905.
- Klerks, M. M., Franz, E., van Gent-Pelzer, M., Zijlstra, C., & van Bruggen, A. H. 2007. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal*, 1(7), 620–631.

- Koczerka, M., Lantier, I., Morillon, M., Deperne, J., Clamagirand, C. D., Virlogeux Payant, I., & Grépinet, O. 2024. From intestine to beyond: *Salmonella* entry factors display distinct transcription pattern upon infection in murine models. *Open Biology*, 14(1), 230312.
- Kragh, K. N., Tolker-Nielsen, T., & Lichtenberg, M. 2023. The non-attached biofilm aggregate. *Communications Biology*, 6(1), 898.
- Lambert, M.A., & Smith, S.G. 2008. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC microbiology*, 8(1), 1-11.
- Latasa, C., García, B., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., & Lasa, I. 2012. *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *Journal of bacteriology*, 194(14), 3708-3722.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penades, J. R., et al. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1322–1339.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., & Altier, C. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular microbiology*, 46(5), 1451-1464.
- Lippa, A. M., & Goulian, M. 2009. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS genetics*, 5(12), e1000788.
- Liu, Z., Niu, H., Wu, S., & Huang, R. 2014. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerging microbes & infections*, 3(1), 1-5.
- Lu, Y., Chen, S., Dong, H., Sun, H., Peng, D., & Liu, X. 2012. Identification of genes responsible for biofilm formation or virulence in *Salmonella enterica* serovar pullorum. *Avian diseases*, 56(1), 134-143.
- Lüderitz, O., Staub, A. M., & Westphal, O. 1966. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related Enterobacteriaceae. *Bacteriological Reviews*, 30(1), 192-255.
- Mahon, B. E., Ponka, A., Hall, W. N., Komatsu, K., Dietrich, S. E., Siitonen, A., et al. 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *The Journal of Infectious Diseases*, 175(4), 876–882.
- Malik-Kale, P., Jolly, C. E., Lathrop, S., Winfree, S., Luterbach, C., & Steele-Mortimer, O. 2011. *Salmonella*—at home in the host cell. *Frontiers in microbiology*, 2, 125.
- Mariscotti, J. F., & Garcia-del Portillo, F. 2009. Genome expression analyses revealing the modulation of the *Salmonella* Rcs regulon by the attenuator IgaA. *Journal of bacteriology*, 191(6), 1855-1867.
- Marshall, K. C., Stout, R., & Mitchell, R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology*, 68(3), 337-348. 30.
- Ménard, S., Lacroix-Lamandé, S., Ehrhardt, K., Yan, J., Grassl, G. A., & Wiedemann, A. 2022. Cross-talk between the intestinal epithelium and *Salmonella* Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*, 13, 906238.

- Merino, L., Trejo, F. M., De Antoni, G., & Golowczyc, M. A. 2019. Lactobacillus strains inhibit biofilm formation of Salmonella sp. isolates from poultry. Food Research International, 123, 258-265.
- Mika, F., & Hengge, R. 2013. Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. International journal of molecular sciences, 14(3), 4560-4579.
- Miller, S. I. 1991. PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence?. Molecular microbiology, 5(9), 2073-2078.
- Mølbak, K., Olsen, J. E., & Wegener, H. C. 2006. *Salmonella* infections. Foodborne infections and intoxications, 57-136.
- Monack, D. M., Raupach, B., Hromockyj, A. E., & Falkow, S. 1996. *Salmonella* typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(18), 9833-9838.
- Mulder, D. T., Cooper, C. A., & Coombes, B. K. 2012. Type VI secretion system associated gene clusters contribute to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infection and immunity, 80(6), 1996-2007.
- Murray, R. A., & Lee, C. A. 2000. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. Infection and immunity, 68(9), 5050-5055.
- Navarre, W. W., Halsey, T. A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J. L., & Libby, S. J. 2005. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. Molecular microbiology, 56(2), 492-508.
- Oğuz, S. K., Has, E. G., Akcelik, N., & Akcelik, M. 2023. Phenotypic impacts and genetic regulation characteristics of the DNA adenine methylase gene (*dam*) in *Salmonella* Typhimurium biofilm forms. Research in Microbiology, 174(1-2), 103991.
- Olgunoğlu, İ. A. 2012. *Salmonella* in fish and fishery products. *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen*.
- Oludairo, O. O., Kwaga, J. K., Kabir, J., Abdu, P. A., Gitanjali, A., Perrets, A., & Aiyedun, J. 2022. A review on *Salmonella* characteristics, taxonomy, nomenclature with special reference to non-Typhoidal and Typhoidal salmonellosis. Zagazig Veterinary Journal, 50(2), 161-176.
- Özdemir, C., Akçelik, N., & Akçelik, M. 2018. The role of extracellular DNA in *Salmonella* biofilms. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 33, 60-71.
- Özdemir, C., Akçelik, N., Neslihan Özdemir, F., Evcili, I., Kahraman, T., Gürsel, İ., & Akcelik, M. 2021. The role of *bcsE* gene in the pathogenicity of *Salmonella*. Pathogens and Disease, 79(6), ftab037.
- Özkalp, B. 2012. Isolation and identification of *Salmonellas* from different samples. *Salmonella-A Dangerous Foodborne PathogenB*.

- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588.
- Park, S. Y., Pontes, M. H., & Groisman, E. A. 2015. Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(6), 1850-1855.
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., & Williams, D. W. 2011. Introduction to biofilms. *Biofilms and veterinary medicine*, 41-68.
- Petano-Duque, J. M., Rueda-García, V., & Rondón-Barragán, I. S. 2023. Virulence genes identification in *Salmonella enterica* isolates from humans, crocodiles, and poultry farms from two regions in Colombia. *Veterinary World*, 16(10), 2096.
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 71(12), 7154–7158.
- Radics, J., Königsmaier, L., & Marlovits, T. C. 2014. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(1), 82–87.
- Raghunathan, D., Wells, T. J., Morris, F. C., Shaw, R. K., Bobat, S., Peters, S. E., & Henderson, I. R. 2011. SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infection and immunity*, 79(11), 4342-4352.
- Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL 2006 Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6:979–986
- Ray, S., Pandey, N. K., Kushwaha, G. S., Das, S., Ganguly, A. K., Vashi, N., & Bhavesh, N. S. 2022. Structural investigation on SPI-6–associated *Salmonella* typhimurium VirG-like stress protein that promotes pathogen survival in macrophages. *Protein Science*, 31(4), 835-849.
- Rehman, T., Yin, L., Latif, M. B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., & Ouyang, P. 2019. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microbial pathogenesis*, 137, 103748.
- 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., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., & Tschäpe, H. 2003. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(4), 273-285.
- Römling, U., Gomelsky, M., & Galperin, M. Y. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular microbiology*, 57(3), 629-639.
- 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.

- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. 1998b. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular microbiology*, 28(2), 249-264.
- Rosselin, M., Virlogeux-Payant, I., Roy, C., Bottreau, E., Sizaret, P. Y., Mijouin, L., & Wiedemann, A. 2010. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies *enterica* serovar enteritidis, mediates zipper-like internalization. *Cell research*, 20(6), 647-664.
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. 2020. Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.
- Shin, D., & Groisman, E. A. 2005. Signal-dependent binding of the response regulators PhoP and PmrA to their target promoters in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4089-4094.
- Song, H., Kong, W., Weatherspoon, N., Qin, G., Tyler, W., Turk, J., & Shi, Y. 2008. Modulation of the regulatory activity of bacterial two-component systems by SlyA. *Journal of biological chemistry*, 283(42), 28158-28168.
- Soto, G. E., & Hultgren, S. J. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1059-1071.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-179.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 199–210.
- Teplitski, M., Al-Agely, A., & Ahmer, B. M. 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 152(11), 3411-3424.
- Tessari, E. N. C., Kanashiro, A. M. I., Stoppa, G. F., Luciano, R. L., De Castro, A. G. M., & Cardoso, A. L. S. P. 2012. Important aspects of *Salmonella* in the poultry industry and in public health. *Salmonella-A dangerous foodborne pathogen*, 182-206.
- Tierrez, A., & García-del Portillo, F. 2004. The *Salmonella* membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons. *Journal of bacteriology*, 186(22), 7481-7489.
- Tsolis, R. M., Young, G. M., Solnick, J. V., & Baumber, A. J. 2008. From bench to bedside: Stealth of enteroinvasive pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(12), 883–892.
- Tükel, C., Akçelik, M., de Jong, M. F., Simsek, O., Tsolis, R. M., & Bäumber, A. J. 2007. MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of bacteriology*, 189(10), 3922-3926.

- 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.
- Véscovi, E. G., Soncini, F. C., & Groisman, E. A. 1994. The role of the PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence. *Research in microbiology*, 145(5-6), 473-480.
- Véscovi, E. G., Soncini, F. C., & Groisman, E. A. 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84(1), 165-174.
- Vestby, L. K., Moretro, 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*. *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics*, 17-34.
- Wagner, C., Polke, M., Gerlach, R. G., Linke, D., Stierhof, Y. D., Schwarz, H., & Hensel, M. 2011. Functional dissection of SiiE, a giant non-fimbrial adhesin of *Salmonella enterica*. *Cellular microbiology*, 13(8), 1286-1301.
- Waite, R.D., Papakonstantinou, A., Litter, E., and Curtis, M.A. 2005. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *J Bacteriol* 187: 6571–6576.
- Watnick, P., & Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- White, A. P., Weljie, A. M., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R., Vogel, H. J., & Surette, M. G. 2010. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PloS one*, 5(7), e11814.
- Wu, S. 2015. Invasion. In *Molecular Medical Microbiology* (pp.423-448). Academic Press
- Yang, Y., Wan, C., Xu, H., Aguilar, Z.P., Tan, Q., Xu, F., Wei, H. 2013. Identification of an outer membrane protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a potential vaccine candidate for Salmonellosis in mice. *Microbes and Infection*, 15(5), 388-398.
- Yin, L., Li, Q., Xue, M., Wang, Z., Tu, J., Song, X., & Qi, K. 2019. The role of the *phoP* transcriptional regulator on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian pathology*, 48(4), 362-370.
- Zakikhany, K., Harrington, C. R., Nimtz, M., Hinton, J. C., & Römling, U. 2010. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*, 77(3), 771-786.
- Zeiner, S. A., Dwyer, B. E., & Clegg, S. 2012. FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity*, 80(9), 3289-3296.
- Zhang, X. L., Jeza, V. T., & Pan, Q. 2008. *Salmonella* Typhi: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cellular & molecular immunology*, 5(2), 91-97.

- Zhang, X. L., Tsui, I. S., Yip, C. M., Fung, A. W., Wong, D. K. H., Dai, X., & Morris, C. 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infection and immunity*, 68(6), 3067-3073.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452–1463.