

ÖZET

Doktora Tezi

SALMONELLA TYPHIMURIUM'UN MISL OTOTRANSPORTER PROTEİNİNİN İN-VİTRO ÜRETİMİ VE PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNİN TANIMLANMASI

Nefise AKKOÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

MisL ototransporter proteininin in vitro koşullarda üretimi, MarT regülatör proteini yapısal geninin pBADgIII/a vektörüne klonlanması ve doğal *Salmonella* Typhimurium LT2 suşuna aktarımı yolu ile gerçekleştirildi. Bu transformantta optimum MisL proteini üretiminin gelişme ortamına % 0.02 L-arabinoz ilavesi sonucu gerçekleştiği, β -galaktozidaz testi (560 Miller ünitesi) ve western lekeleme yöntemi kullanılarak belirlendi. İn vitro koşullarda MisL üretimi gerçekleştiren *S. Typhimurium* LT2 mutantında yürütülen immüno elektron mikroskopi çalışmaları, bu proteinin hücre yüzeyine salgılandığını ve ekzopolisakkaritlerle ilişkilenecek hücrenin en dışında düzensiz bir tabaka oluşturduğunu gösterdi. MisL geninin pozitif regülatörü olan MarT proteininin ifade edildiği mutantın, doğal suş ile karşılaştırılarak yorumlanan mikrodizin analizleri, bu regülatörün; *dps*, *ylhH*, *wraB*, *flgK*, *osmE*, *manZ*, *cheM*, *cheA*, *motB*, *fliA*; *fliC* genlerini negatif yönde, *aceE*, *aceFi*, *lpdA*, *tsf*, *allC*, *cydB*, *wzzB*, *rplP*, *rpsC*, *rplW*, *rplD*, *rplC*, *rmbA*, *misL*, *fidL*, *marT*, *slsA* ve *cpxP* genlerini ise pozitif yönde regüle ettiği kanıtlandı. İn vitro koşullarda yürütülen bağlanma ve birlikte çöktürme denemeleri sonucunda ise, MisL proteininin fibronektinin heparin-II domainine (hep-II) özgül bir şekilde bağlandığı saptandı.

Ocak 2011, 117 sayfa

Anahtar Kelimeler: *S. Typhimurium*, MisL, Protein-Protein Etkileşimleri, Üretim, Bağlanma, Mikrodizin

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IN-VITRO PRODUCTION AND IDENTIFICATION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS OF MISL AUTOTRANSPORTER PROTEIN OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Nefise AKKOÇ

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In vitro production of MisL autotransporter protein was performed by cloning functional gene of the MarT regulator protein to pBADgIII/a vector, which was then used to transform wild type *Salmonella* Typhimurium LT2 strain. The optimum MisL protein production of this transformant was obtained with addition of 0.02 % L-arabinose to the growth medium, monitored by a β -galactosidase test (560 Miller units) and western blotting analysis. Immunoelectron microscopy experiments, performed with *S. Typhimurium* LT2 mutants which produce the MisL protein under invitro conditions, showed MisL to be secreted at the bacterial cell surface and forming an irregular layer complexed with exopolysaccharides. Comparative microarray experiments between wild type and mutant strains expressing the marT protein, which is the positive regulator of *misL* gene, showed that the expression of *marT* downregulated the *dps*, *yliH*, *wraB*, *flgK*, *osmE*, *manZ*, *cheM*, *cheA*, *motB*, *fliA*; *fliC* genes and upregulated the *aceE*, *aceFi* *lpdA*, *tsf*, *allC*, *cydB*, *wzzB*, *rplP*, *rpsC*, *rplW*, *rplD*, *rplC*, *rmbA*, *misL*, *fidL*, *marT*, *slsA* and *cpxP* genes. Results of in vitro adhesion and pull-down experiments showed that there was a specific binding interaction between MisL protein and the Hep-II domain of fibronectin.

January 2011, 117 pages

Key Words: *S. Typhimurium*, MisL, Protein-Protein Interactions, Production, Binding, Microarray

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri, sabır ve yardımlarını esirgemeyerek bilimsel gelişimimde başından sonuna kadar emeği olan, hayata karşı dik duruşu bana öğreten danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı);

Çalışmalarım sırasında tezime önemli katkılarda bulunan The Vaccine Research Institute of San Diego Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Michael McClelland, Steffen Porwollik ve sabrını ve sevgisini esirgemeyen Pui Cheng'e;

Desteklerini benden esirgemeyen sevgili, annem, babam ve kardeşime,

Tüm yardımları için başta Yüksek Biyolog Deniz YÜKSEL ve Seyit Nesimi BULUT ve çalışma arkadaşlarıma

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nefise AKKOÇ
Ankara, Ocak 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Karakteristikleri	3
2.2 <i>Salmonella</i> Enfeksiyonu.....	5
2.3 <i>Salmonella</i> Patojenitesinde Rol Oynayan Moleküler Elemanlar.....	10
2.4 <i>Salmonella</i> 'nın Bağırsak Epiteline Tutunmasında Etkili Moleküler Elemanlar.....	11
2.5 Konakçı Hücre İşgalinde Rol Oynayan Salgı İzyolları	14
2.6 <i>Salmonella</i> Patojenite Adaları (SPI).....	17
2.7 Fibronektin	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1 Materyal	26
3.1.1 Suşlar ve plazmidler	26
3.2 Yöntem	31
3.2.1 Bakterilerden genomik DNA'nın izolasyonu	31
3.2.2 Plazmid DNA izolasyonu	32
3.2.3 Sodyum dodezil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	33
3.2.4 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri ve agaroz jel elektroforezi	35
3.2.5 DNA bağlama reaksiyonu (Ligasyon).....	37
3.2.6 β -galaktozidaz testi	38
3.2.7 <i>marT</i> geninin pBAD/gIII A vektörüne klonlanması	40

3.2.8 Western lekeleme (blotting).....	43
3.2.9 İmmün elektron mikroskopi	44
3.2.10 <i>Salmonella</i> Typhimurium 14028 suşunda <i>marT</i> geninin ifadesi	45
3.2.10.1 <i>marT</i> geninin PZR ile çoğaltılması	45
3.2.10.2 Elektrokompotent hücrelerin hazırlanması.....	47
3.2.10.3 Elektroporasyon.....	48
3.2.10.4 Arabinoz varlığında <i>marT</i> üretiminin teşviki, RNA izolasyonu ve cDNA üretimi.....	48
3.2.11 Q-PCR yöntemi ile mikrodizin çalışması için en uygun zaman diliminin belirlenmesi.....	50
3.2.12 Mikrodizin denemeleri.....	51
3.2.12.1 RNA örneklerinin işaretlenmesi ve mikrodizin denemesine hazırlanması.....	51
3.2.12.2 Mikrodizin slaytlarının hazırlanması, hibridizasyonu ve analizi.....	53
3.2.13 Fibronektinin fragmentasyonu.....	55
3.2.14 Glutation S-transferaz (GST) füzyon proteinlerinin saflaştırılması.....	56
3.2.15 Histidin işaretli füzyon proteinlerinin saflaştırılması.....	57
3.2.16 Katı faz bağlanma deneyi.....	57
3.2.17 Birlikte çöktürme deneyi.....	58
3.2.18 Fibronektinin deglikolizasyonu.....	58
3.2.19 Konjugasyon.....	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	60
4.1 MisL Ototransporter Proteininin Üretiminin Teşviki	60
4.2 MisL Ototransporter Proteininin Hücresel Lokasyonunun Tanımlanması.....	65
4.3 MisL Ototransporter Proteininin Regülasyon Karakteristiklerinin Tanımlanması.....	68
4.4 MisL Proteininin Fibronektine (FN) Bağlanma Karakteristiklerinin Tanımlanması	87

4.4.1 Fibronektin deglikolizasyonunun MisL bağlanması üzerine etkisi	87
4.4.2 Fibronektinin termolizin fragmentlerine ayrılması ve MisL bağlanma domaininin belirlenmesi	90
4.4.3. MisL proteininin Hep-2 domaini içerisindeki bağlanma bölgesinin haritalanması	96
5. SONUÇ.....	99
KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	114

SİMGELER DİZİNİ

bç	Baz çifti
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
FN	Fibronektin
g	gram
kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
OD	Optik Density: Optik Yoğunluk
PBS	Peptonla Tamponlanmış Tuzlu Su
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
TAE	Tris Asetat EDTA
UV	Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Salmonella</i> 'nın hücre işgalinde kullandığı pinositoz mekanizması (sitoiskelet düzenlemesi) ve epitel hücre ve nötrofil işgali	9
Şekil 2.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium'un neden olduğu gastroenteritte doku hasarı.....	10
Şekil 2.3 <i>Salmonella</i> patojenitesinde rol oynayan patojen ilişkili moleküler elemanlar.....	11
Şekil 2.4 MisL ototransporter proteininin genetik organizasyonunun ve aktif bölgelerinin şematik görünümü.....	13
Şekil 2.5 Ototransporter salgı yolu	17
Şekil 2.6 Fibronektin makriksinin oluşum basamakları.....	23
Şekil 2.7 Termolizin kesimi ile elde edilen FN parçaları.....	25
Şekil 3.1 pCR 2.1-TOPO vektörünün genetik haritası.....	27
Şekil 3.2 pET101/D-TOPO vektörünün genetik haritası.....	28
Şekil 3.3 pBAD/gIII A, B, C vektörlerinin genetik haritası.....	29
Şekil 3.4 pGEX-4T-2 vektörünün genetik haritası.....	30
Şekil 3.5 Protein büyüklüklerinin saptanmasında kullanılan protein standardının jel göç planı.....	35
Şekil 3.6 Kullanılan DNA standardının % 1 agaroz jel göç planı.....	37
Şekil 4.1 <i>marT</i> geni PZR ürünü.....	60
Şekil 4.2 PCR2.1 Vektörüne <i>marT</i> geni insersiyonunun kontrolü.....	61
Şekil 4.3 Transformantlarda <i>marT</i> geni içeren pBAD gIII/A vektörü varlığının <i>PstI</i> ve <i>SacI</i> enzim kesimi ile kontrolü	62
Şekil 4.4 <i>LacZYA::misL</i> Füzyonu içeren <i>S. Typhimurium</i> NA23 suşunda arabinoz konsantrasyonuna bağlı MisL üretimi ve β -galaktozidaz aktivite artışı	63

Şekil 4.5 % 0.02 Arabinoz varlığında indüklenen <i>S. Typhimurium</i> NA23 transformantında MisL proteini lokalizasyonunun immün elektronmikroskopik görüntüsü ve bu bölgenin büyütülmüş hali (27500X).....	67
Şekil 4.6 Arabinoz indüksiyonu yapılmayan <i>S. Typhimurium</i> NA23 transformantının immün elektronmikroskopik görüntüsü (A) ve işaretli bölgenin büyütülmüş hali (B) (27500X).....	68
Şekil 4.7 PZR sonucunda, <i>S. Typhimurium</i> ATCC14028 suşu genomik DNA'sından çoğaltılan <i>marT</i> geni.....	69
Şekil 4.8 pBAD24 plazmid vektörünün % 0.8 oranında agaroz içeren jeldeki görüntüsü	70
Şekil 4.9 pBAD24 plazmid vektörü ve <i>marT</i> geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi sonrası agaroz jel görüntüleri.....	71
Şekil 4.10 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşuna ($\Delta marT$) pNA01 (<i>marT</i> geninin aktarıldığı pBAD24 vektörü) plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamlarında gelişimi.....	72
Şekil 4.11 pNA01 plazmid DNA'sı ve bu plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan <i>marT</i> geni.....	73
Şekil 4.12 pNA01 ve pBAD24 vektörlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan bantların agaroz jel görüntüleri.....	74
Şekil 4.13 MZ1627 transformantından izole edile plazmidin (pNA01) baz dizi analizi.....	75
Şekil 4.14 MZ1627 ve MZ1629 örneklerinden arabinoz ilavesinden sonra izole edilen RNA örnekleri	76
Şekil 4.15 MZ1627 ve MZ1629 bakterilerinden izole edilen RNA örnekleri kullanılarak sentezlenen cDNA'ların agaroz jeldeki görüntüleri.....	77
Şekil 4.16 N-bağlı deglikolize edilmiş Fibronektin, N-bağlı deglikolize edilmiş RNaz B.....	88

Şekil 4.17 Artan konsantrasyonlardaki GST-MisL proteininin fibronektine (mavi kolonlar) ve N-bağlı deglikolize fibronektine (kırmızı kolonlar) bağlanma etkinliği.....	89
Şekil 4.18 Termolizin'in sığır fibronektini üzerinde oluşturduğu fragmentler..	90
Şekil 4.19 GST-MisL füzyon proteininin fibronektin fragmentlerine bağlanma özgülüğü	92
Şekil 4.20 Saflaştırma işlemine tabi tutulan 6xHis-tag FNIII 10-15 füzyon proteininin farklı aşamalarındaki fraksiyonlarının SDS-PAGE ve Western lekeleme sisteminde izlenmesi.....	93
Şekil 4.21.A GST ve GST-MisL proteinlerinin artan konsantrasyonlarının fibronektine (2 µg/ml) bağlanma etkinlikleri.....	95
Şekil 4.21.B. GST ve GST-MisL proteinlerinin artan konsantrasyonlarının saflaştırılmış 6xHis-tag Hep-2 bölgesine (2 µg/ml) bağlanma etkinlikleri.....	96
Şekil 4. 22 Saflaştırılan fibronektin füzyon proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü	97
Şekil 4.23 GST, GST- FNIII 10, GST-FNIII 12, GST-FNIII 13 ya da GST-FNIII 14'in % 0.02 L-arabinoz varlığında ve düşük tuz konsantrasyonunda geliştirilen <i>S. Typhimurium</i> FB4 ve FB5 suşlarında bağlanma karakteristikleri.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Arabinoz konsantrasyonlarının hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler.....	43
Çizelge 4.1	MarT regülatör proteini varlığında ifade düzeyinde azalma belirlenen genler.....	78
Çizelge 4.2	MarT regülatör proteini varlığında ifade düzeyinde artış belirlenen genler.....	83

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***SALMONELLA* TYPHIMURIUM'UN MİSL OTOTRANSPORTER
PROTEİNİNİN İN-VİTRO ÜRETİMİ VE PROTEİN-PROTEİN
ETKİLEŞİMLERİNİN TANIMLANMASI**

Nefise AKKOÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

1. GİRİŞ

Salmonella serotipleri gastroenterit'den, tifo, bakteremi, fokal enfeksiyonlar ve yaşam boyu taşıyıcı duruma kadar geniş bir hastalık spektrumuna yol açabilmektedir. Bu hastalıklar etiyolojik açıdan değerlendirildiğinde birbirinden belirgin farklılıklar içermektedir (Vasquez-Torres vd. 1999, Chessa vd. 2008a, 2008b). Ancak konakçı-patojen ilişkilerinin temel moleküler mekanizmalarının benzerliği, *Salmonella*'yı bu ilişkilerin açıklanmasında model bir mikroorganizma haline getirmiştir. Özellikle *Salmonella*'da patojen ilişkili moleküler elemanların genetik ve biyokimyasal esasının tanısı, enfeksiyon hastalıklarının temel biyolojik süreçlerinin açıklanmasına öncülük etmektedir (McClelland vd. 2001, Morgan vd. 2007, Srivatsan ve Wang 2008).

Salmonella enfeksiyonunun ilk aşaması, konakçı ince bağırsak epiteline patojenin tutunmasının sağlanmasıdır. Bu süreç, *Salmonella*'da, bazıları serovaryete özgüllüğü gösteren değişik fimbriya'lar, diğer enterik bakterilerde tanımlanan ototransporter proteinlerle yüksek düzeyde homoloji gösteren MisL ve ShdA adhezinleri ve mukoid kapsül yapılar tarafından gerçekleştirilmektedir (Boekema vd. 2004, Tükel vd. 2005, Tükel vd. 2006, Gibson vd. 2007, Galan 2008). *Salmonella enterica*'da yürütülen DNA dizi analizleri sonucu, MisL proteini gen kodu *Salmonella* patojenite adası 3 üzerinde saptanmıştır. *Salmonella* ototransporter proteinleri bir N-terminal sinyal peptit, bir iç yolcu domaini ve bir C-terminal translokator domaini içermektedir. *Salmonella* ototransporter proteinleri ile yüksek düzeyde homoloji gösteren diğer enterik bakterilere ait adhezinler üzerinde elde edilen bilgiler ışığında, MisL ve ShdA proteinlerinin sitoplazmik membrandan geçişleri esnasında sinyal peptidin kesildiği, C terminal bölgesinin dış membranda beta varil formları oluşturduğu ve iç yolcu domaininin hücre yüzeyine salgılandığı öngörülmektedir. Ancak, *Salmonella* ototransporter proteinlerinin kültür koşullarında üretilmemesi nedeniyle, söz konusu proteinler ile bu konuda detaylı çalışmalar yapılamamıştır. MisL proteininin iç yolcu domaininin *S. Typhimurium*'un patojenitesindeki fonksiyonunun, konakçı organizma bağırsak sisteminde bulunan hedef epitel hücrelere tutunmayı güçlendirme yönünde olduğu değişik araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür. Özellikle MisL protein üretimi engellenmiş *S. Typhimurium* mutantlarında makrofajlara tutunmanın ve konakçı sistemlerde kalıcılığın önemli

düzeylede engellendiği saptanmıştır. Bu çalışmalarda ayrıca MisL ototransporter proteininin fibronektin (FN) ile in vitro koşullarda interaksiyon verdiği belirlenmiştir (Raffatellu vd. 2005, Raffatellu vd. 2006, Tükel vd. 2007, Galan 2008).

Tüm bu ön bulgulara rağmen MisL ototransporter proteininin hücresele lokasyonu, fibronektin bağlanma aktivitesinin biyokimyasal esası ve temel MisL regülatörünün (*marT*) detaylı aktivitesi üzerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Günümüzde en yaygın gıda kökenli hastalık olan salmonellozun kontrolü ve tedavisinde sağlanacak ilerlemeler ancak hastalık etmeni bakterinin patojenitesinde rol oynayan moleküler yapıların ve onların konakçı sistemdeki interaksiyonlarının tanımlanması ile mümkün olabilecektir. *Salmonella* enfeksiyonunun başlama aşaması, konakçı sisteme tutunma ve kolonizasyondur. Bu nedenle tutunma aşamasının moleküler biyolojisinin detaylı tanısı, enfeksiyon süreçlerinin açıklanmasında anahtar rol oynamaktadır.

Bu tez çalışmasında, yukarıda özetlenen temel amaç doğrultusunda; MisL ototransporter proteininin uygun klonlama sistemleri geliştirilmesi suretiyle labotatuvar koşullarında *S. Typhimurium*'da üretiminin sağlanması, hücresele lokalizasyonunun ve konakçı ince bağırsak sistemine tutunma özelliklerinin tanımlanması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Karakteristikleri

Salmonella insanlarda gastroenterit ve tifo etmenidir. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından açıklanan son istatistiklerde, dünyada yaklaşık 18 milyon tifo (% 3.6 ölüm oranı) ve 1.5 milyar gastroenterit vakası (% 0.23 ölüm oranı) bildirilmiştir. Özellikle moleküler genetik ve ileri biyokimyasal teknikler kullanılarak elde edilen veriler ışığında *Salmonella* cinsi için; *S. enterica* ve *S. bongori* olarak adlandırılan iki tür önerilmiştir. *S. enterica* daha sonra; *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *houtaenae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* ve *S. enterica* subsp. *arizonae* olarak adlandırılan altı alt türe ayrılmıştır. Serotipler (serovaryete) ile türlerin karıştırılmasını engellemek ve adlandırmayı sadeleştirmek için, serotip esas alındığında alt tür adının gözardı edilmesi (*S. enterica* subsp. I serotype Typhimurium yerine, *S. enterica* serotype Typhimurium gibi) ve kısa form (*S. Typhimurium* gibi) kullanımı önerilmiştir. *S. enterica* sıcak kanlı hayvanları enfekte ederek sistemik ya da sistemik olmayan hastalıklara yol açar. *S. bongori* serotipleri ise soğuk kanlı hayvanlara adapte olmuştur. Bugüne kadar yürütülen serotiplendirme çalışmaları sonucunda, *S. enterica*'ya ait 3000'e yakın serotip saptanmıştır. Belirlenen serotiplerin büyük bir çoğunluğunda, patojenitenin moleküler mekanizması üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Tindall vd. 2005, Wain vd. 2005).

Salmonella, Enterobacteriaceae familyasına ait Gram negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif aerob ve çubuk formunda bakterileri içeren bir cinstir. Çubuk şeklindeki hücreler yaklaşık 0.5-1.0 (en) x 1-5 (boy) µm boyutlarındadır. *Salmonella* üyelerinin büyük bir çoğunluğu flagella içerir ve hareketlidir. Laktoz fermentasyon yeteneği içermezler. Gelişme optimumları 37 °C'dir. *Salmonella* üyeleri düşük pH, düşük su aktivitesi ya da yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda sıcaklığa dirençlidir. Gıdaların dondurularak depolanmasında, özellikle donma sıcaklığı civarında canlılık düşer. Optimum pH değeri 6.5-7.5 civarındadır. Ancak pH 4.5-9.0 arasında gelişebilirler. *Salmonella* esas olarak insan ve hayvanların bağırsak sisteminde bulunan bir patojendir.

Bazı *Salmonella* üyeleri konakçıya adapte olmuş ya da konakçı spesifiktir. Bunun en tipik örneği *S. enterica* serovar Typhi'dir. Konakçı spesifik diğer serovaryeteler: Paratyphi, Sendai (insan), Pullorum/Gallinarum (kanatlılar), Dublin (sığırlar), Choleraesuis (domuzlar, ancak insanları da enfekte eder); Typhimurium ve Enteritidis (insan, sığır, kanatlılar, koyun, domuz, at ve yabani kemirgenlerde ana hastalık etmenleridir) sayılabilir (Singleton ve Sainsbury 1996, Gibson vd. 2006).

Salmonella serotiplerinin büyük çoğunluğu geniş konakçı dizgesi içerir. Lağım ya da dışkı örneklerindeki *Salmonella*'lar, uygun koşullar altında suda ya da toprakta haftalarca yaşayabilirler. Suların rutin klorlanması, pastörizasyon ya da birçok genel dezenfeksiyon ajanları kullanılarak *Salmonella*'lar öldürülebilir (Fitzgerald vd. 2003, Gibson vd. 2006). Ancak, sağlıklı çiftlik hayvanları ve evcil kanatlılarda da *S. Typhimurium* kolonize olmakta ve bu yolla hayvandan insana geçiş gerçekleşebilmektedir. *Salmonella* tüm dünyada gıdalar aracılığı ile enfeksiyona yol açan en önemli etmendur. Bu vakaların % 26'sının etmeni *S. enterica* serovar Typhimurium olarak belirlenmiştir. *Salmonella*'nın en çok bulunduğu gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelmektedir. Bunlar arasında kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema en yüksek risk içeren gıdalardır. Ayrıca çeşitli soslar ve salatalar, pudingler ve diğer süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalar arasında yer almaktadır. Hammadde işleme teknolojisi, depolama ve pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin büyümesine neden olmaktadır. *Salmonella*'nın yol açtığı gastroenterit'in şiddeti konakçının yaşına bağlıdır. Yenidoğanlarda, bebeklerde ve yaşlılarda daha şiddetlidir (Kim ve Surette 2003, Voetsch vd. 2004, Suar vd. 2006).

S. Typhimurium kromozomu, yaklaşık 4×10^6 baz çifti uzunlukta olan tek bir çevrimsel DNA molekülüdür. Çoğu *Salmonella enterica* üyesi bir virülans plazmid ve lizogenik faj içerir. *S. enterica* serovar Typhimurium ve serovar Typhi'nin genom dizi analizleri tamamlanmıştır (McClelland vd. 2001, Srivatsan vd. 2008).

2.2 *Salmonella* Enfeksiyonu

Daha önce de ifade edildiği gibi, salmonelloz'un moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılan model bakteri *S. Typhimurium*'dur. En yaygın kullanılan konakçı ise, fare model sistemleridir. Farelerde özellikle tifo ateşinin örnekleme, sistemi kullanışlı kılan ana unsurdur. Ancak değişik konakçılarda serovaryeteler için *Salmonella* patojenitesinde farklı yanıtlar alınması, hastalığın moleküler mekanizması üzerinde yürütülen çalışmalarda ciddi sorunlar yaratmaktadır. Bugüne kadar yürütülen çalışmalardan elde edilen veriler ışığında sistemik ve sistemik olmayan *Salmonella* enfeksiyonunun genel moleküler mekanizmaları aydınlatılmıştır. *Salmonella* enfeksiyonu, primatlar ve insanlarda 10^5 ya da daha fazla bakterinin gıdalar yolu ile alımı sonucu başlar. *Salmonella*'lar ilk olarak ince bağırsağın bir bölümünü teşkil eden ve ileoçekal valfe yakın bölgede yer alan ileum'a, bakteriyel adhezinler aracılığı ile tutunur ve mukozal hücreler üzerinde kolonize olur. Bu tutunma ve kolonizasyonu ökaryotik hücrelerin işgali (invazyon) takip eder. Hücre işgalinde ilk aşama, Payer plakı bölgesindeki M hücrelerinin ve enterositlerin içerisine girıştır (Vasquez-Torres vd. 1999, Ohl ve Miller 2001).

Hastaların dışkı örneklerinde lökositlerin varlığı ya da yokluğuna bağlı olarak yangılı diyare ya da sıvı kaybına yol açan diyare tanımlanmaktadır. Dışkı örneklerinde laktoferrin ya da nötrofillerin bulunması yangılı diyareye, dışkıda lökositlerin bulunması halinde ise sıvı kaybına neden olan diyareye karar verilmektedir. Sıvı kaybına yol açan diyareye; *Vibrio cholerae*, enterotoksijenik *Escherichia coli*, enteropatogenik *E. coli* ve enterohemorrajik *E. coli* de neden olmaktadır. Bu bakteriler genellikle invazif değildir ve ince bağırsak mukozasında çok düşük düzeyde yangıya yol açarlar. Buna karşın yangılı diyareye neden olan patojenler (enteroinvazif *E. coli*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* ve tifoid olmayan *Salmonella* serotipleri gibi) bağırsak epitelini işgal ederler ve bağırsakta yoğun nötrofil akışına neden olurlar (Bolton vd. 2000, Helms vd. 2005).

S. Typhimurium tarafından indüklenen gastroenteritin mekanizması üzerinde yürütülen son çalışmalarda, nötrofil sızması (akışı) ile karakterize edilen yangılı diyarenin

bakteriyel işgal ve onu takip eden doğal bağışıklık yanıtından ileri geldiği belirlenmiştir. Enfeksiyon esnasında *S. Typhimurium*, *Salmonella* patojenite adası 1 (SPI I)'de kodlanan tip III salgı sistemi (T3SS-1) aracılığı ile efektör proteinlerini enjekte ederek, enterositlere ve mikrofold (M) hücrelerine girer. Altı efektör, Rho ailesi GTPazlar için iki guanin nukleotit değişim faktörü (SopE ve SopE2), inozitol fosfat fosfataz (SopB, SigD olarak da anılmaktadır), aktin-bağlanma proteinleri (SipA ve SipC), ve aktiviteleri bilinmeyen efektörler (SopA ve SopD) beraber çalışmak suretiyle bakterinin bağırsak epitel hücrelerine girişini sağlamakta ve bağırsak mukozasında yangı oluşumunu tetiklemektedir (Unsworth vd. 2004, Raffatellu vd. 2005).

Salmonella'nın ince bağırsak epitel hücrelerine tutunması, lümeni kaplayan mukoz tabakadan geçme yeteneği sayesinde gerçekleşir. Hayvan model sistemleri ile yürütülen çalışmalarda, *Salmonella*'nın tutunma ve hücre işgali için öncelikli olarak bağırsak epitelinde bulunan M hücrelerini tercih ettiği saptanmıştır. Bu aşamada ayrıca fagositik olmayan enterosit hücrelerinin de kullanıldığı saptanmıştır. M hücreleri pinositoz ile bağırsak antijenlerini içlerine almakta ve Peyer plakları (ince bağırsakta ve esas olarak da ileumda -incebağırsağın son kısmında- yer alan, lenfatik doku plakları) aracılığı ile ince bağırsak epitelinin altında bulunan lenfoid hücrelere bu antijeni taşımaktadır. Bu aktivite mukozal bağışıklığın oluşturulması açısından önemlidir. *Salmonella*'nın ökaryotik hücre işgalinde fagositoz yolu da kullanılmaktadır. Bu yolla özellikle CD18 antijenini üreten fagositlerin içerisine girdikleri tespit edilmiştir (Baumler vd. 1996a, Baumler vd. 1996b, Baumler vd. 1996c, Zhou vd. 2001, Suar vd. 2006, Morgan vd. 2007). *Salmonella* serotipleri epitellerin salgı yanıtı oluşturmasını tetiklemekte ve nötrofillerin toplanarak bağırsak lümenine (boşluğa) sızmasına yol açmaktadır. İn-vitro koşullarda yürütülen doku kültürü çalışmalarında nötrofil birikimi için, bakteri ve epitel hücrelerde çeşitli sitokinlerin üretimi ile ilişkili proteinlerin sentezlenmesinin zorunlu olduğu saptanmıştır. Özellikle epitel hücreleri tarafından üretilen kemokin interlökin-8 aracılığı ile mukozal boşlukta nötrofil birikiminin teşvik edildiği tespit edilmiştir (Lee vd. 2000, Raffatellu vd. 2006, Morgan vd. 2007). *Salmonella* bağırsak epitel hücrelerini geçtikten sonra, bir diğer bağışıklık sistemi elemanı olan ve mukozal boşlukta yer alan makrofajlar içine girmektedir. Sistemik enfeksiyona yol açan *Salmonella* serotipleri makropinositoz yolu ile makrofaj içine girmekte ve fagositin antibakteriyel

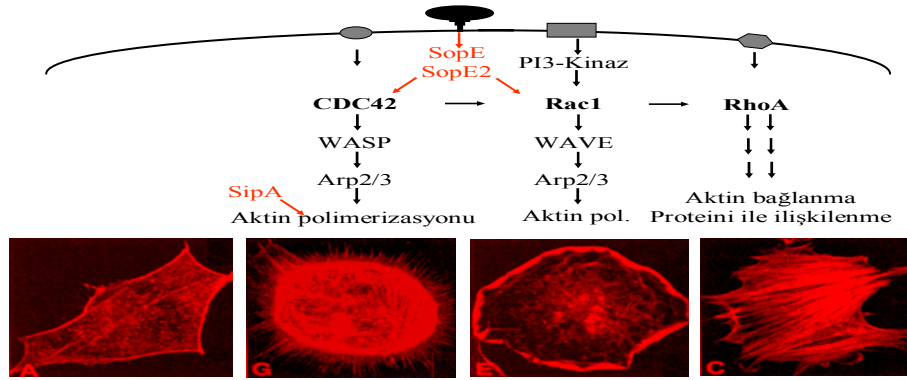
fonksiyonlarından kurtulmasını sağlayan virülans mekanizmaları aktive etmektedir. Enfekte olmuş fagositlerin retikuloendotelial sistemde bulunan diğer organlara göç etmesi bakterinin konakçı içinde yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Ohl ve Miller 2001, Morgan vd. 2007).

S. Typhimurium ile insan hücreleri arasındaki interaksiyon, makrofaj benzeri hücreler (THP-1 veya U937 hücreleri), makrofajlardan türeyen monosit hücreleri veya birincil nötrofillerin, söz konusu bakteri ile enfekte edilmesi sonucu modellenmiştir (Bolton vd. 2000, Chessa vd. 2008a). Son zamanda ise insan vücudundan alınan doku örnekleri *S. Typhimurium* ile insan bağırsak mukozası arasındaki ilişkinin tanımlaması amacı ile kullanılmaktadır. İnsan epitel hücrelerinin kullanıldığı bu çalışmalarda; SopB tarafından üretilen fosfatidilinozitol fosfatazlar ile SopE-SopE2 tarafından üretilen RhoGTPaz'ların beraber çalışarak *S. Typhimurium* işgali için gerekli olan WASp/Scar proteinlerini aktive ettiği saptanmıştır (Unsworth vd 2004, Chessa vd. 2008b). Aktive edilen WASp/Scar proteinleri Arp2/3 kompleksini etkileyerek aktin filamentlerinin yeni dallar oluşturmasını sağlamaktadır. SipA proteini bu aşamada aktin polimerizasyonu için gerekli olan kritik dal konsantrasyon miktarını düşürerek, yeni dalların oluşumunu hızlandırmakta ve aynı zamanda ADF/kofilin tarafından yönetilen aktin çözümlerini engellemektedir. Yeni aktin dallarının hızla büyümesi membranı dışarı doğru itmekte ve membran kabartılarının oluşmasına, makropinozitoz ile bakterinin içeri alınmasına öncülük etmektedir (Şekil 2.1) (Tükel vd. 2006) (Burkholder ve Bhunia 2009).

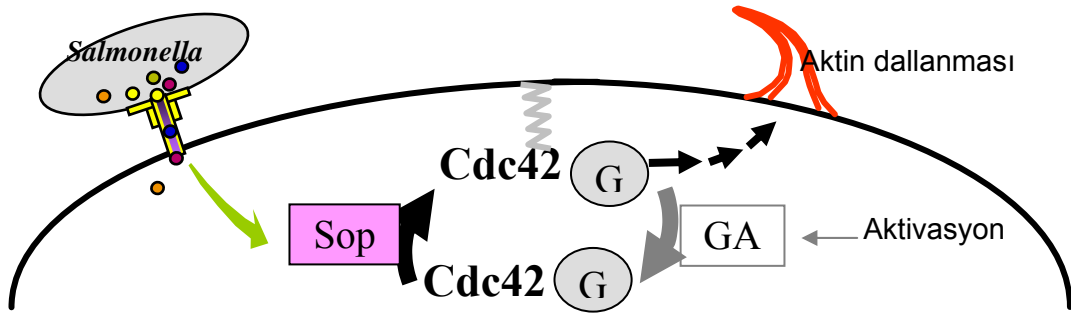
Salmonella enfeksiyonunda gerçek doku hasarı, nötrofiller aracılığı ile; proteazların, miyeloperoksidazların ve NADPH oksidazların salgılanması sonucu gerçekleşmektedir. Epitelin bariyer fonksiyonunu kaybetmesinden sonra, kan damarlarından çok miktarda damar sıvısı kaybı meydana gelir ve böylece kandan bağırsak lümenine yüksek oranda sıvı akışı gerçekleşir. Nadir olmakla birlikte, bakteriler koruyucu makrofaj yanıtı oluşmadan önce kan dolaşımına dahil olabilir ve bu durumda da septik şok ve ölüm görülür (Şekil 2.2) (Tükel vd. 2006, Chessa vd. 2008a, Burkholder ve Bhunia 2009).

Bağırsak mukozasında yaşamda kalabilmek için *S. Typhimurium*'un tercih ettiği niş, makrofajların içerisidir. Makrofajların içerisinde yaşamda kalabilme aktivitesi için ise,

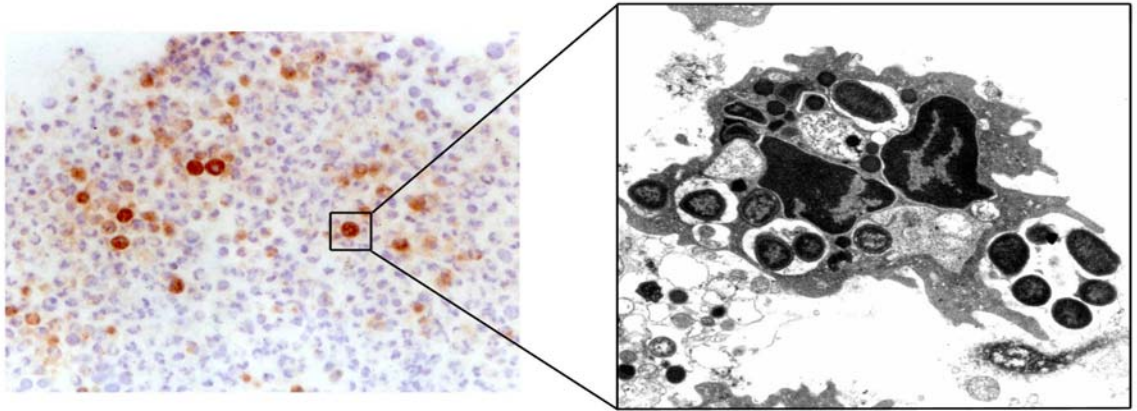
SPI-II tarafından kodlanan ikinci bir tip III salgı sistemine (T3SS-2) gereksinim vardır. Bu bakterilerde T3SS-2'nin inaktivasyonu sonucu, buzağılarda ve streptomisin muamele edilmiş farelerde *S. Typhimurium*'un ağızdan enfeksiyonunu takip eden 24 saat içerisinde bağırsak mukozasında nötrofil sızmasının önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Yangı reaksiyonunun, hücre içi bir adaptör protein olan ve Toll-benzeri reseptörlerden (TLRs) alınan sinyalleri birleştiren MyD88'e bağımlı olması, lamina propria'da T3SS-2 ortamlı bakteriyel yaşamın, patojen tanıyan algılayıcılar (pathogen recognition receptors) tarafından sürekli izlendiğine işaret etmektedir (Raffatellu vd. 2006, Bueno vd. 2010).



(a)



(b)



(c)

(d)

Şekil 2.1.a.b. *Salmonella*'nın hücre işgalinde kullandığı pinositoz mekanizması (sitoiskelet düzenlemesi), c.d. epitel hücre ve nötrofil işgali (Tükel vd. 2006)



(a)

(b)

Şekil 2.2 *Salmonella Typhimurium*'un neden olduğu gastroenteritte doku hasarı

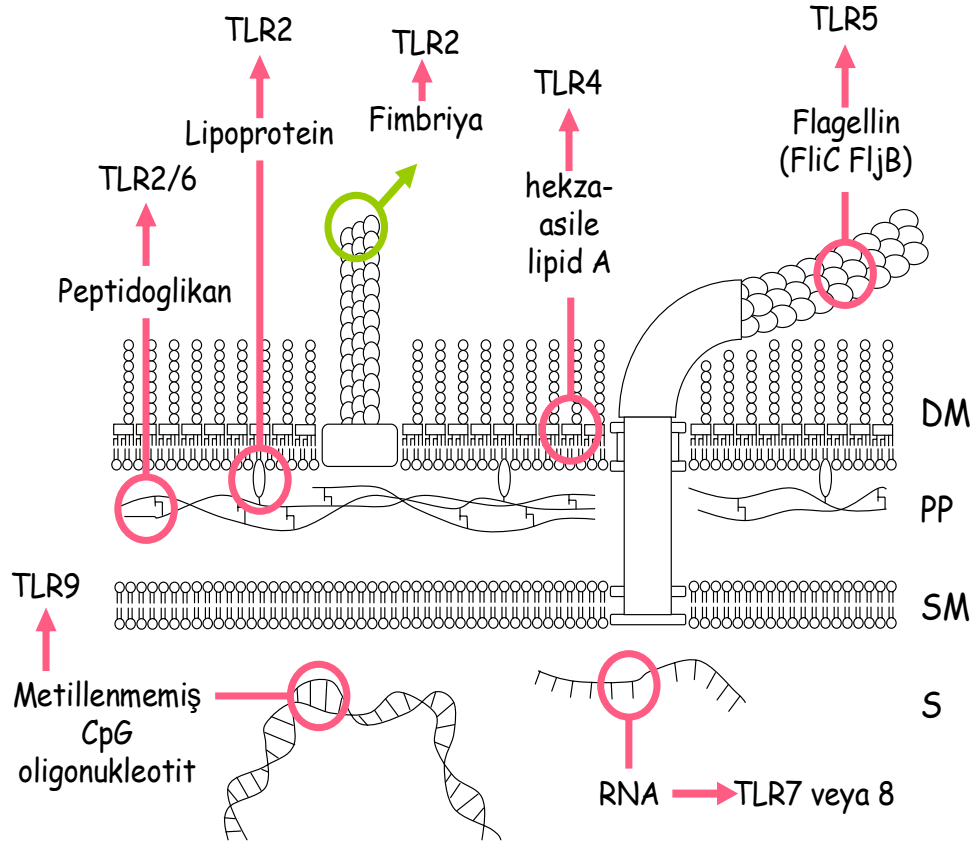
Enfekte buzağı ince bağırsak epiteli (a) normal epitel doku (b) (Tükel vd. 2006)

2.3 *Salmonella* Patojenitesinde Rol Oynayan Moleküler Elemanlar

Değişik mikroorganizmalar, insan hücrelerinde bulunmayan ve bu nedenle insan sistemine dahil olduklarında immün sistem reseptörlerini uyararak bağışıklık yanıtının oluşumuna yol açan yapısal elemanlar içerirler. Bu yapılar, patojen ilişkili moleküler elemanlar olarak adlandırılmaktadır. İnsan doğal immün sisteminin temel patojen ilişkili moleküler eleman algılayıcıları, Toll benzeri reseptörlerdir (TLR). Diğer algılayıcılar ise; dektin-1 (b-glukan içeren partikülleri tanıyan C tipi lektin), makrofaj mannoz reseptörü (değişik bakterilerin yüzeyinde bulunan şekerleri tanıyan C tipi lektin), makrofaj süpürücü reseptörü (düşük yoğunluktaki lipoproteinleri ve belirli anyonik polimerleri tanır) ve peptidoglikan yapısını tanıyan reseptörlerdir (karaciğer, özefagus ve kemik iliğinde bulunur). Bugüne kadar Toll benzeri reseptörler tarafından tanınan değişik *Salmonella* ilişkili moleküler elemanlar belirlenmiştir. Bunlar; peptidoglikan (TLR 2 ve 6), lipoprotein (TLR 2) ince agregatif fimbriya (agf), hekza asile lipit A (TLR 4), flagellin (TLR 5), metillenmiş CpG oligonukleotitler (TLR 9) ve RNA (TLR7 veya TLR8)'dir (Mullins vd. 1998, Gentle vd. 2004), (Şekil 2.3).

Patojen ilişkili moleküler elemanlar, patojen mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunda bulunan ve immün sistem tarafından tanınan (doğal ve adaptif immün

sistem reseptörlerinin tanınması sonucu immün yanıt oluşturulan) yapılardır. Bu elemanlar yüksek düzeyde korunmuş olup, mikrobiyel metabolizmanın ürünleridir ve antijenik yapı farklılıklarını kapsamazlar (Zierler ve Galan 1995, Gerlach vd. 2007).



Şekil 2.3 *Salmonella* patojenitesinde rol oynayan patojen ilişkili moleküler elemanlar

(DM: dış membran, PP: periplazma, SM: sitoplazmik membran, S: sitoplazma, TLR (Toll benzeri reseptör))

2.4 *Salmonella*'nın Bağırsak Epiteline Tutunmasında Etkili Moleküler Elemanlar

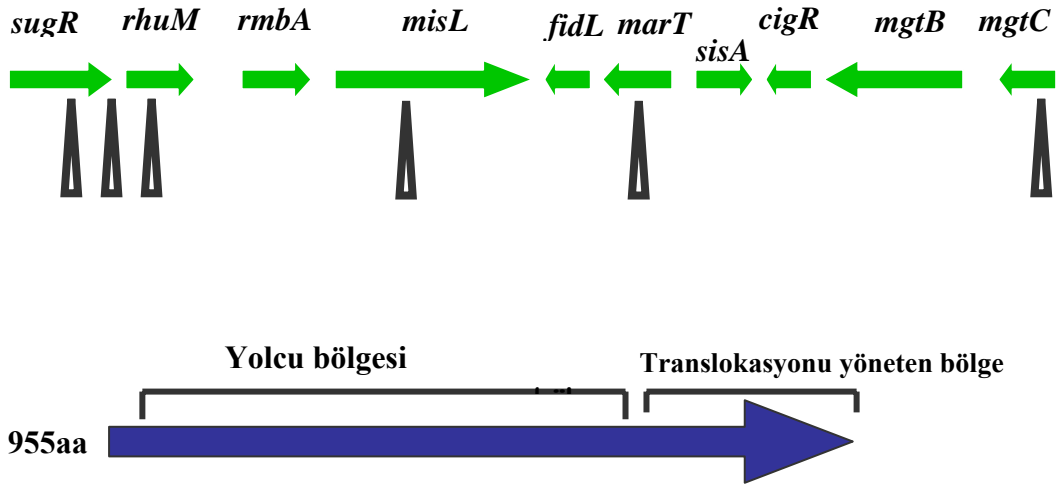
Salmonella'da konakçı hedef doku yüzeyine (bağırsak epiteli) tutunmada rol oynayan temel yapılar, 13 adet operon tarafından kodlanan fimbriya'lar, 2 adet ototransporter protein (ShdA ve MisL) ve mukoid kapsül yapılarıdır (Gentshev vd. 2002, Bookema vd. 2004, Tükel vd. 2005).

Fimbriya'lar, değişik çevresel koşullarda üretilen ve bakterilerin aktif yüzey tutunmasında rol oynayan saç benzeri yapılardır. Bir ya da daha fazla protein monomerinden oluşan bu yapılar hücre yüzeyinden dışarıya doğru sentezlenirler. Fimbriya'lar ökaryotik hücrelerin yüzeyine, doku matriksine, serum proteinine ya da diğer bakterilere tutunma işlevi görürler. Bu tutunma bakterilerin epitel yüzeyinde kolonizasyonu, konak hücreye giriş, konjugasyon ve biyofilm oluşumu süreçleri için zorunludur. *Salmonella*'nın genom dizi analizi sonucunda 13 farklı fimbriyal operon içerdiği saptanmıştır. Ancak bunlardan yalnız iki adetinin (ince agregatif fimbriya, *agf*, ve tip-1 fimbriya, *fim*) in vitro koşullarda üretimi tanımlanmıştır. İnce agregatif fimbriya üzerinde yürütölen detaylı analizler sonucunda; söz konusu fimbriyanın ana alt ünitesi olan AgfA proteininin fibronektine (epitel doku bağ proteini) spesifik olarak bağlandığı ve TLR 2 tarafından tanındığı belirlenmiştir. Fim olarak adlandırılan fimbriyanın ana alt ünitesinin (FimH) ise, eritrositler ve maya hücrelerinin yüzeyinde bulunan glikoproteinlerin içerdiği terminal α -D-mannoz birimlerine bağlandığı saptanmıştır. Son yıllarda yürütölen glikomiks çalışmaları sonucunda plazmid kodlu fimbriyanın PefA alt ünitesinin (*pef*) Lewis kan grubu antijenine [Gal β 1-4(Fuc α 1-3) GlcNAc (trisakkarit)] özgül bağlanma gösterdiği tespit edilmiştir. Uzun polar fimbriya'nın ise sadece heterolog konakçıda ifadesi örneklenmiş ve patojenin konakçı sistemde kalıcılığı üzerinde rol oynadığı tanımlanmıştır (Thanassi vd. 1998, White vd. 2003, White vd. 2006, Gibson vd. 2007). Diğer dokuz *Salmonella* fimbriyasının in vitro koşullarda üretilmemesi nedeni ile tutunma ve kalıcılıkta oynadıkları roller üzerinde bilgi bulunmamaktadır. Fimbriyal operonların regölasyonu üzerinde yürütölen çalışmalardan elde edilecek veriler ışığında, laboratuvar koşullarında üretimleri mümkün olabilecek ve adhezif özellikleri aydınlatılabilecektir.

Salmonella'da MisL ve ShdA olarak adlandırılan iki ototransporter proteinin, adhezif özellikleri tanımlanmıştır. *Salmonella* patojenite adası III (SPI-III)'de kodlanan MisL proteininin C terminal bölgesi, *Neisseria gonorrhoeae*'da bulunan immunoglobulin A1 proteaz ailesi üyesi ototransporter proteinlerle benzer özellikler göstermektedir. 955 amino asitlik MisL proteini sistein içermez ya da sistein bulunması durumunda, bu amino asitler arasında disülfid bağları oluşturmaz. Sinyal peptit, iç yolcu domaini ve translokator bölgeleri enterik bakterilerde tanımlanan ototransporter proteinlerle önemli

ölçüde homoloji göstermektedir. Belirlenen ikincil ve üçüncül yapı özellikleri esas alınmak suretiyle, MisL, tip V salgı sistemi tarafından salgılanan bir ototransporter protein olarak tanımlanmıştır. MisL proteini; özellikle enteropatojenik *E. coli*' de bulunan AIDA-1 (%43), *Shigella flexneri*'de bulunan VirG (%38) ve *Yersinia pestis*'de bulunan YapD ve YapH ototransporter proteinleri ile yüksek düzeyde benzerlik içermektedir (Şekil 2.4) (Dorsey vd. 2005), (Tükel vd. 2007, Chessa vd 2008a).

MisL proteininin *S. Typhimurium*'un patojenitesindeki fonksiyonu fare model sistemlerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada bir *misL* mutantının fare bağırsak sisteminde doğal suşa oranla kalıcılığının düştüğü (cecum'da kolonize olma yeteneğini önemli ölçüde kaybetmiştir) ve dışkıda oranının ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca MisL ototransporter proteininin *S. Typhimurium*'a özellikle fibronektin'e (FN) ve kısmen kollajen'e bağlanma aktivitesi kazandırarak, kolonik karsinoma kökenli insan epitel hücrelerinde invaziviteyi artırmada rol aldığı da tanımlanmıştır. Bu veriler MisL'in, bağırsakta *Salmonella*'nın kolonizasyonu için gerekli bir ekstraselüler matris adhezin proteini olduğuna işaret etmektedir (Chessa vd. 2008a, Chessa vd. 2008b).



Şekil 2.4 MisL ototransporter proteininin genetik organizasyonunun ve aktif bölgelerinin şematik görünümü (Dorsey vd. 2005)

S. Typhimurium'da, MisL dışında, ShdA olarak tanımlanan bir başka ototransporter protein daha izole edilmiştir. Bu protein büyük bir dış membran proteini olup, konakçı hücre heparini gibi davranarak yolcu domaini ile fibronektine ve kollajene

bağlanmaktadır. ShdA yolcu domaini 1500 amino asit içerir ve iki bölgeye ayrılır. Burada bir N-terminal tekrarsız bölgeyi, tipA ve tipB olarak adlandırılan iki amino asit tekrarı izlemektedir (Dorsey vd. 2005, Chessa vd. 2008a). *S. Typhimurium* *shdA* geninin insersiyonal inaktivasyonunun ya da delesyonunun farelerde fekal örneklerden geri alınan bakteri sayısında düşmeye neden olduğu belirlenmiştir. *S. Typhimurium* fare enfeksiyonu denemelerinde cecumun bakteriyel populasyonun ana rezervuarı olduğu saptanmıştır. *shdA* geni, söz konusu bakterinin cecumun duvarı ve diğer yapılarına kolonizasyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, cecumda gerçekleşen ShdA-ortamlı kolonizasyon *S. Typhimurium*'un sistemde kalıcılığı ve enfeksiyon için zorunludur (Dorsey vd. 2005, Hamilton vd. 2009).

Salmonella'nın epitel hücrelere tutunması ve kolonizasyonunda rol oynayan son eleman mukoid kapsül yapıları ya da diğer bir deyişle ekzopolisakkaritleridir. *Salmonella*'da en iyi tanımlanmış ekzopolisakkarit yapı Vi-Ag'dir. Vi-Ag, lineer poli- α -1,4-2-GalANAc homopolimeri olup, serotiplere göre C3 pozisyonunda O-asillenmiş grup bakımından farklılıklar içerir. İkinci ekzopolisakkarit yapı selüloz'dür. Çözünmez bir β -(1,4) glukoz homopolimeri olan selüloz, 10000 adet glukoz monomeri içerebilmektedir. Selüloz abiyotik çevrelerde biyofilm oluşumuna yol açarken, konakçı hücrelerde, özellikle ince agregatif fimbriya ile ilişkilendirilerek, yüzey tutunmasında rol almaktadır. *Salmonella*'da tanımlanan son ekzopolisakkarit yapı ise kolonik asittir. Kolonik asit yüksek potasyum konsantrasyonunda ve 15–20 °C arasında mukoid yapı oluşturma özelliği gösterir. İki elemanlı bir sistem (PhoP-PhoQ) tarafından regüle edilen kolonik asit üretimi sayesinde abiyotik çevre koşullarında biyofilm oluşumu desteklenerek hücreler oksidatif strese korunur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tavuk ince bağırsak epitel hücrelerinde de kolonik asidin biyofilm oluşturarak tutunmayı güçlendirdiği ve patojenin virülansını yükselttiği belirlenmiştir (Ngwai vd. 2006, Chessa vd. 2008a, Dieye vd. 2009).

2.5 Konakçı Hücre İşgalinde Rol Oynayan Salgı İzyolları

Gram negatif bakterilerde I'den V'e kadar numaralandırılan beş adet salgı yolu bulunmaktadır. T3SS yukarıda açıklanmıştır. Yakın geçmişte yayınlanan iki makalede

Vibrio cholerae'da tanımlanan VI bir salgı yolu tanımlanmıştır (Henderson vd. 2004, Frye vd. 2006).

Tip I salgı sistemi sitoplazmik membran ve dış membranda porların genişlemesi görevini üstlenen en az üç proteinin işlevi ile fonksiyonel olmaktadır. İlk kez *E. coli* alfahemolizin'inin (HlyA) ökaryotik hücrelere girişi üzerinde yürütülen çalışmalar sonucu tanımlanan bu sistemin, değişik patojenlerdeki karakteristikleri belirlenmiştir. HlyA modifiye proteine (11-179 amino asitler arasında bir tekrar bölgesi içerir) lipit yan gruplarının bağlanması sonucu meydana gelen bir lipoproteindir. İn vitro sistemlerde kalsiyuma bağlanma özelliği gösterdiği belirlenmiş ve bu yolla ökaryotik hücreler ile ilişkilendiği öne sürülmüştür. Bu interaksiyon HlyA'nın, ökaryotik hücrelerde plazma membranından geçişini ve sitoplazmik içeriklerin hücre dışına akışını teşvik eder (Galan ve Curtiss 1989, Ghigo ve Wandersman 1992, Koronakis vd. 1995, Frye vd. 2006).

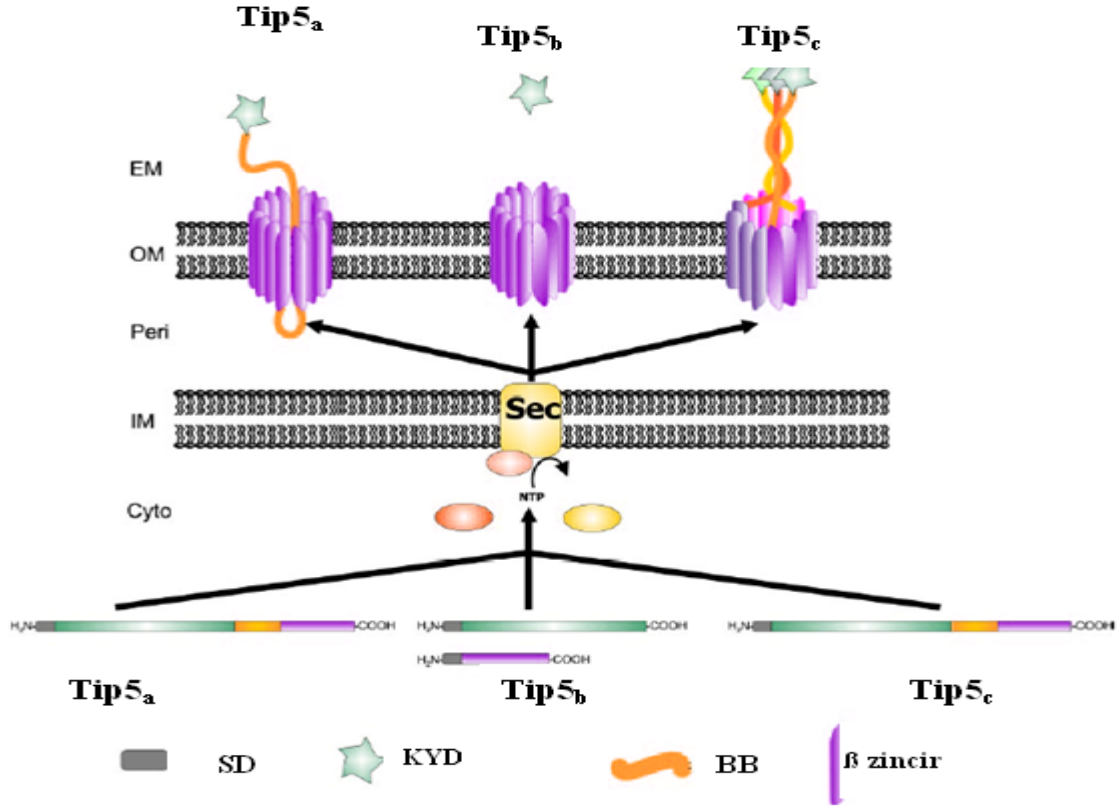
Tip II salgı sistemi, genellikle ana terminal dal olarak (main terminal branch, MTB) adlandırılır. Sistemin, sürekli aktif olan tek bir operon tarafından kodlanan 14'den fazla proteine gereksinim duyduğu saptanmıştır. MTB sistemi aynı zamanda iç ve dış membranlarda, büyük olasılıkla açılma yapıları olarak ortaya çıkan yapıların makromoleküler özelliklerini taşır. MTB aracılığı ile salgılanmanın tipik örneği, *Klebsiella oxytoca*'da pullunazın (PulA) salgılanmasıdır. PulA nişasta hidrolizini gerçekleştiren bir lipoproteindir. Önce misel formları oluşturulur ve daha sonra dış çevreye salgılanır. *K. oxytoca*'da MTB yolu bulunduktan sonra, *Vibrio cholerae*'de kolera toksininin, *P. aeruginosa*'da enterotoksin A'nın ve değişik hücre duvarı parçalama aktivitesine sahip enzimlerin bu yolla salgılandığı belirlenmiştir (Galan 2001, Bourzac ve Guillemin 2005, Gerlach ve Hensel 2006).

Tip III efektör moleküller, iç ve dış membranların genişlemesine yol açacak proteinlerin oligomerik yapıdaki kompleks birliğine gereksinim duyar. Sec mekanizması salgı için zorunlu değildir ancak, yapısal proteinlerin iç membrandan translokasyonunu yönetir. SipA, SopA, SopB, SopD, SopE ve SopE2 *S. Typhimurium*'da SPI-I de kodlanan T3SS tarafından salgılanan efektör moleküllerin bazılarıdır. Bunlar bakteriyel işgalden sonra epitel hücrelerine enjekte edilir (Zierler ve Galan 1995, Gentle vd. 2004, Galan 2008).

Tip IV salgı sistemi, DNA'nın konjugatif transferini gerçekleştiren sistemlerle ilişkilidir. Bu sistem, iç ve dış membranlar ile ilişkili ve periplazma ve sitoplazmada lokalize olan, en az 9 proteinin koordineli hareketinden sorumludur. Bu sistem sadece Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır (Wilson vd. 2008).

Tip V salgı sistemi ilk kez *Neisseria gonorrhoeae*'da IgA1 proteazın salgılanmasında tanımlanmış ve ototransporter salgı yolu olarak adlandırılmıştır. Poliprotein (ototransporter) öncüsünün sinyal serisi iç membrandan geçerken kesilir. Bu öncünün iç membrandan transferi Sec bağımlı izyolu ile gerçekleşir. Ototransporter proteinin β -varil domainin karboksil terminali, yolcu domaininin dış membrandan transportunu sağlar. Bundan dolayı ne enerji bağlanması ve ne de yardımcı faktörler söz konusu translokasyon sürecinde rol almaz. Bugüne kadar 31 adet IgA1 proteaz-benzeri ototransporter tanımlanmıştır. Bunların 28 adeti, prototipik-Sec bağımlı sinyal sekanslarının bazı karakteristiklerini taşıyan, sinyal peptid domaini içermektedir. Sinyal serisi pozitif yüklü amino asitlerden oluşan bir N-terminal domainine sahiptir. Ayrıca, nötral amino asitler içeren bir hidrofobik bölge (H-domaini) ve C terminal konsensus sinyal peptidaz tanıma bölgesi (AXB) içermektedir. Burada A ve B küçük amino asitlerdir ve B oluşumundan sonra peptid yapısından kesilirler. Tipik amino-terminal lider peptidin bulunmaması gibi istisnalar hariç, bu proteinlerin iç salgılanmasında sec-bağımlı mekanizma söz konusudur (Desvaux vd. 2004, Henderson vd. 2004, Lawrenz vd. 2009). Tip V salgı sistemi için önerilen ve genel kabul gören modelde, iç membranı geçtikten sonra ototransporter protein periplazmik yüzeyde görülür. Ototransporter proteininin β -domaininin biyofiziksel olarak tercih edilen β -varil konfigürasyonundaki dış membrana insersiyonunun, kendiliğinden meydana geldiği kabul edilmektedir. β -varil, çok sayıda amfipatik antiparalel β -katlanmaları içeren kompleks protein yapısı içermektedir. İlk ve son β -katlanmalar, kendiliğinden yakın halka (ring) yapısında ve antiparalel hidrojen bağları oluşturur. Amfipatik primer yapı, moleküler porların oluşumuna izin verir. Burada ototransporter proteinin hidrofobik yan zincirleri, hidrofobik çift tabaka içerisine girdikten sonra birbirini takip eder, ancak merkezde hidrofilik yan zincirlerin sıvı çevre ile temasını sağlar. Böylece varil benzeri porlar oluşur. Yolcu domaini bu kanaldan dışarı salınır. Salınma sonrasında ya kesilir ya da S.

Typhimurium'un ototransporter proteini ShdA gibi bakteri yüzeyine bağlı kalır (Şekil 2.5) (Desvaux vd. 2004, Lawrenz vd. 2009, Santiviago vd. 2010).



Şekil 2.5 Ototransporter salgı yolu

KYD: Katlanmış yolcu domaini, dış membrandan salgılanmayı yönetir, SD: sinyal dizisi, BB: bağlayıcı bölge. 1. evre: β -domaininin dış membrandan insersiyonu ve β -varil por oluşumu. 2. evre: linker bölge pordan salgılanmayı sağlar. 3. evre: otoşaperon domaini yolcu domaininin β -varil porundan çıkacak şekilde katlanmasını tetikler. 4. evre: katlanan yolcu domaini hücre yüzeyine çıkar (translokasyon) ve efektör molekül bir proteaz aktivitesi ile kesildikten sonra dış çevreye salgılanır. Peri: periplazma; OM: dış membran; IM: sitoplazma membranı, EM: dış çevre (Desvaux vd. 2004).

2.6 *Salmonella* Patojenite Adaları (SPI)

Farklı türler arasında gerçekleşen yatay gen transferi tarafından, virülans özellik ile ilgili genetik lokusların belirli genom bölgelerinde toplanması sonucu *Salmonella*'da patojenite adalarının (SPI) oluştuğu görüşü giderek yaygınlık kazanmaktadır. Tüm patojen mikroorganizmalar, bir ya da birden çok virülans faktör içermektedir. Virülans özelliği kodlayan ve genomun aynı bölgesinde lokalize olan patojenite adaları,

organizma tipine bağılı olarak, 10-200 kb arasında bölgeleri kapsar. Bu bölgelerin % G+C içeriğı ile kodon kullanma özellikleri bakımından diğere genomik bölgelerden farklı oluşu, yatay (lateral) gen transferi yolu ile kazanıldıklarının en önemli kanıtıdır. Diğere kanıtlar ise; patojenite adalarının genellikle doğrudan tekrar edilen DNA bölgeleri ile ve tRNA genleri ile ilişkili olmalarıdır. Zira çoğı ökaryotik ve bazı prokaryotik organizmalarda tRNA genlerinin ve tekrar serilerinin, yabancı DNA'nın entegrasyon bölgeleri olarak işlev gördüğü belirlenmiştir. Patojenite adaları ayrıca, genellikle integrazlar ve insersiyon elementlerinin bir bölümü gibi genetik hareketliliğı kodlayan fonksiyonel genler içerirler. Bu nedenle patojenite adaları stabil olmayan bölgeler olarak değerlendirilmektedir. Bugüne dek *Salmonella*'da 10 adet farklı patojenite adası ve 2 adet patojenite adası benzeri genomik organizasyon tespit edilmiştir (Groisman ve Ochman 1996, Gunzel vd. 2006). Bunlar içerisinde, genel ya da kısmi virülans fonksiyonları tanımlanmış beş ada üzerinde durulacaktır.

Salmonella kromozomunda sentizom 63 içinde yer alan genler *Salmonella* patojenite adası I (SPI-I) olarak adlandırılmıştır. Kromozom üzerinde 40 kb'lık bir bölgeyi işgal eden SPI-I lokusu, yaklaşık 30 genin kodladığı Tip-3 salgı sistemi (T3SS-1) aktivitesi ile, hücre yüzeyinde iğne benzeri uzantılar oluşturulup *Salmonella* proteinlerinin konakçıya aktarılmasını sağlamaktadır. Bu lokusun ikinci elemanı *sitABCD* genleri invazif aktivite ile ilişkili değildir. Söz konusu genler, *Salmonella*'da demir yakalama sistemini kodlamaktadır. Bağırsağı invaze olma sürecinde, SPI-I'de kodlanan SipB proteini, hücre içi kaspaz-1'in makrofajlar içindeki aktivasyonunu tetikler. Sistein proteaz ailesinin bir üyesi olan Kaspaz-1, enfekte olmuş makrofajlarda apoptozisi (hücre ölümünü) başlatır. Bu da *Salmonella*'nın bu hücrelerden salınmasına yol açar. Kaspaz-1 aynı zamanda lokal inflamasyonu ve polimorfonükleer fagositlerin (PMN) sızmasını arttıran biyoaktif sitokinleri üretmek için inflamatuvar öncesi sitokinleri (IL1 β ve IL18) doğrudan bağlar. Kaspaz-1'in Sip-B aracılığı ile aktive edilmesi, Peyer plakı tipi hücrelerde ve mezenterik lenf düğümlerinde gelişmiş kolonizasyon ile sonuçlanır (Zhou vd. 1999, Monack vd. 2001, Coombes vd. 2005). Fakat alternatif bir invaze olma mekanizmasının SPI-I'e bağılı olmadığı belirlenmiştir. Burada *Salmonella*, M hücreleriyle ilişkiye girmez ve mukozal yüzeydeki epitel hücreleri ve bakteriler arasındaki sıkı bağlantıları açan dallanmış hücreler tarafından (dentritik hücreler)

yakalanırlar (Coombes vd. 2005). *Salmonella* daha sonra CD18 aracılığı ile gastrointestinal sistemden kan dolaşımına aktarılır (Vasquez-Torres vd. 2000, Rescigno vd. 2001, Coombes vd. 2005). Konakçı hücrenin içine translokasyonda yer alan ve SPI-I de kodlanan T3SS'in efektör proteinlerinin büyük bir kısmı tanımlanmıştır. SipA, SipB, SipC, SptP ve AvrA SPI-I lokusunda yer alan genler tarafından kodlanmaktadır. *Salmonella* türlerinde oldukça korunan *sipABC*, *sptP* genleri ve *avrA* genleri ise SPI-I ile bitişik, yüksek düzeyde değişken bölgeler olarak tanımlanmıştır. *SopA*, *SopB*, *SopD*, *SopE* ve *SopE2* efektör proteinleri SPI-I 'in dışında bağımsız bir lokus tarafından kodlanır. *Salmonella* türlerinde *sopB*, *sopD* ve *sopE2* lokasyonu oldukça stabil iken, faj içeren *sopE* lokasyonu ise değişkendir (Miold vd. 1999, Lucas ve Lee 2000, Raffatellu vd. 2006). SPI-I genlerinin ifadesinin regülasyonu, lokal ve global regülatör sistemleri içeren karmaşık bir süreçte gerçekleştirilir. AraC sınıfının SPI-I kodlu transkripsiyonel regülatörü olan HilA, SPI-I kodlu transkripsiyonel bir aktivatör olan InVF'yi kontrol eder. HilC ve HilD de, HilA fonksiyonlarını modüle eden diğer SPI-I kodlu regülatörlerdir. PhoPQ, OmpR/EnvZ ve BarA/SirA gibi iki bileşenli global regülatör sistemler, SPI-I genlerinin (flagella demeti sistemi gibi) ifadesini etkiler. Toplu olarak bu regülatör sistemler; düşük oksijen gerilimi, orta dereceli bazik pH, yüksek osmolarite ve kısa zincirli yağ asitlerinin varlığı gibi intestinal lümeninde *Salmonella* tarafından karşılaşılan çevresel uyarılarla uyarılır ve bu da istila genlerinin ifadesiyle sonuçlanır (Lucas ve Lee 2000, Raffatellu vd. 2006).

SPI-II, *Salmonella*'nın sistemik enfeksiyonu gerçekleştirebilmesi ve konakçı organlarında çoğalabilmesi için gereklidir. Bu virülans fenotipi, *S. enterica*'nın fagositik hücrelerde yaşamda kalma ve çeşitli ökaryotik hücrelerde vakuoller içinde çoğalabilme yeteneğini sağlar. SPI-II lokusunun büyüklüğü de 40 kb'dır. Bu lokusta kodlanan ikinci T3SS-2, *Salmonella* efektör proteinlerin konakçı hücreye lokasyonunu sağlamaktadır. Bu salgı sistemi aynı zamanda patojeni vakuol içinde konakçı bağışıklık sisteminin efektör fonksiyonlarına karşı da korumaktadır (Monack vd. 2001, Frye vd. 2006). SPI-II'nin kodladığı bazı proteinlerin; fagosit oksidazın ve indüklenebilir nitrik oksit sintazın *Salmonella* içeren vakuollere (SCV) kolokalizasyonunu engellediği belirlenmiştir (Chakravorty vd. 2002, Dieye vd. 2009). *Salmonella* enfeksiyonlu epitelyal hücrelerde, konakçı hücre endozomlarında tübüler agregatların oluşumu

gözlenmiştir. Bu fenotip SPI-II kodlu T3SS efektör proteini SifA'nın translokasyonuna bağlıdır. SifA yönünden eksik olan mutant suşlar SCV'yi sağlayamaz ve doğrudan konakçı hücrenin sitoplazmasına dahil olur. Makrofajların hızlı apoptozu *Salmonella* tarafından SPI-I'e bağlı işgal ile tetiklenirken, gecikmiş bir Kaspaz-1'e bağlı apoptoz formunun da SPI-II fonksiyonuna bağlı olduğu saptanmıştır. SPI-II lokusu içinde diğer genlerin fonksiyonu sistemik patojenite ile ilişkili değildir. SPI-II kodlu T3SS'in ifadesi SPI-II kodlu iki-bileşenli bir sistem olan SsrAB tarafından kontrol edilir. SsrAB'nin ifadesi ise, global regülatör fonksiyonlu diğer bir iki bileşenli sistem olan OmpR/EnvZ tarafından ayarlanır. SPI-II ifadesinde çevresel uyarıların etkileri üzerinde yürütülen çalışmalar, PhoPQ'nun da regülatör görevi üstlendiğine işaret etmiştir (Lee vd. 2000, Tükel vd. 2005, Tükel vd. 2007, Jarvik vd. 2010).

SPI-III tarafından kodlanan virülans faktör, *Salmonella*'nın konakçı hücre içinde canlı kalabilmesi için önemli olan yüksek afiniteli magnezyum transport sistemidir (MgtCB). MgtCB sistemindeki bozucu bir mutasyonu içeren suşların sistemik virülans etkilerinin ve hücre içinde çoğalma miktarlarının az olduğu saptanmıştır (Blanc-Potard ve Groisman 1997, Blanc-Potard vd. 1999, Beuzon vd. 2000, Marathe vd. 2010). Bu gen kümesi içinde yer alan *misL*, bir ototransporter proteini kodlamaktadır. *S. Typhimurium* ile enfekte olmuş tavuk ve farelerde bağırsak yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonun gerçekleşmesi için *misL* geninin tam aktivitesini göstermesi gerektiği belirlenmiştir (Morgan vd. 2004, Tükel vd. 2007, Marathe vd. 2010). *Salmonella* patojenite adası-III (SPI- III) *S. enterica* serovar Typhimurium kromozomunda 81 dakika bölgesinde yer alan *selC* tRNA geninin önünde (3' ucunda) lokalize olan 17 kb uzunluğunda bir bölgeyi kapsamaktadır. Bu bölgenin G+C içeriği % 47.5'tur ve genomun diğer bölgelerindeki G+C içeriğinden (% 52) farklılık gösterir. SPI-III'ün merkezinde yer alan 4 genlik grup *rmbA*, *misL*, *fidL* ve *marT* yalnız bazı alt türlerde bulunmaktadır ve insersiyon seri kalıntıları tarafından genler ayrılmaktadır. SPI-III altı transkripsiyon ünitesi halinde organize olmuş on açık okuma kalıbı (ORF) içermektedir. Bu açık okuma kalıpları, yukarıda söz edilen 4 gen dışında, Mg²⁺ transport proteini MTB ve biyokimyasal fonksiyonu bilinmeyen MgtC'yi kodlayan operonu teşkil etmektedir. Yakın geçmişte yürütülen çalışmalar; *mgtC* geninin fare model sistemlerinde, makrofaj içinde ve in vitro koşullarda düşük Mg²⁺ konsantrasyonunda bakterinin canlılığını

korumasında rol aldığını göstermiştir (Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007, Chessa vd. 2008b, Jarvik vd. 2010).

SPI-IV'ün fonksiyonel özelliklerine dair henüz yeterli bilgi elde edilememiştir. Ancak yapılan çalışmalar bu adada bulunan genlerin T3SS'e benzer DNA baz dizisi özelliği içerdiğini göstermiştir. Bunun yanında transpozon mutasyonu denemeleri sonucunda *Salmonella*'nın makrofaj içinde hayatta kalabilmesi için gerekli fonksiyonları içeren birkaç lokus tanımlanmıştır. SPI-IV içinde yer alan bu lokuslardan biri *ims94* olarak adlandırılmıştır (Baumler vd. 1996c, Gerlach vd. 2007, Rangunathan vd. 2009). Son yıllarda yapılan deneyler sonucunda, SPI-IV'ün T3SS'e benzer bir mekanizma ile SiiE adı verilen bir adhezin kodladığı tespit edilmiştir. Ancak bu adhezin, fimbriyal adhezinlerden farklı bir fonksiyon ile epitel hücrelere tutunmaya yardımcı olmaktadır. Diğer patojenite adalarına oranla % 44.8 gibi düşük bir G+C içeriğine sahip olan SPI-IV, 23 kb büyüklüğünde bir bölgeyi işgal etmektedir. Dizi analizi çalışmalarından elde edilen veriler, söz konusu bölgenin *S. Typhi* ile *S. Typhimurium* arasında önemli farklılıklar gösterdiğine işaret etmiştir (Gerlach vd. 2007, Rangunathan vd. 2009).

SPI-V, salgı sistemleri ile translokasyonları gerçekleştirilen efektör proteinleri kodlamaktadır. T3SS-1 aracılığı ile translokasyonu yapılan ve sıvı salınımını başlatarak diyareye neden olan SopB efektör proteini ve T3SS-2 aracılığı ile translokasyonu gerçekleştirilen PipB efektör proteini bu lokusta kodlanmaktadır. SPI-V genlerinin regülasyon sistemleri, SPI-II genleri ile benzer bulunmuştur. Söz konusu genlerin aktivasyonu, hücre içi (in-vivo) ya da bakterilerin Mg^{2+} kısıtlamasına maruz kaldığı in vitro koşullarda gerçekleşmektedir. Buna karşın sopB ifadesi, HilA fonksiyonuna (SPI-I kodlu merkezi regülatör protein) bağlıdır (Morgan vd. 2004, Choi vd. 2010).

2.7 Fibronektin

Fibronektin (FN) çok domainli ve büyük bir glikoproteindir. Bağ dokuda, hücre yüzeylerinde, plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunur. FN sitoskeleton ve ekstraselüler matriksin değişik elemanları ile interaksiyon verir. Bu glikoprotein ayrıca kendi kendisi ile de interaksiyon vererek, henüz detaylı analizi yapılmamış olan fibriller

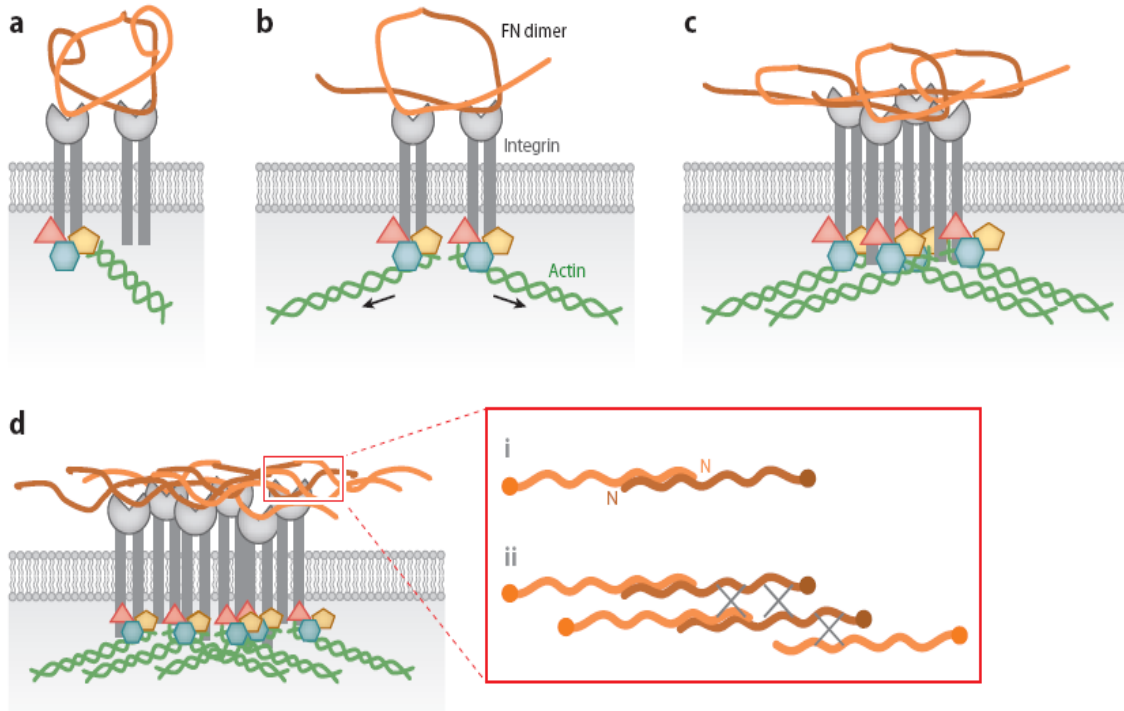
yapıları meydana getirir. 1980'li yıllarda fibronektinin amino asit dizilimi çözümlenmiştir (Engel vd. 1981, Erickson 1994). FN'in büyük bir kısmı, üç tip homolog tekrar içermektedir. I. tip tekrarlar 45, II. tip tekrarlar 60 ve III. tip tekrarlar 90 amino asit içerir. Protein yapısında toplam 12 adet tip I, 2 adet tip 2 ve 17 adet tip III tekrar bulunmaktadır (Sechler vd. 2001). FN genellikle, benzer fakat aynı olmayan iki zincirden meydana gelen dimer yapılar oluşturur. Dimerde yer alan her bir zincir yaklaşık 250 kDa'dur. Bir çift disülfid bağı zincirlerin karboksi (C)- terminal uçlarını birbirine bağlar. Her bir zincirde ayrıca, 30 adet zincir içi disülfid bağı ve iki sülfidril grubu bulunur (Maqueda vd. 2007).

Fibronektin yüksek düzeyde glikolize edilmiş bir proteindir. Bu karbonhidrat gruplarının, proteinin belirli domainlerinin proteolizden korunmasında ve fibronektinin stabilizasyonunda rol aldığı bilinmektedir. Ancak proteinin fonksiyonelliğinde ilave bir etkinliğe sahip olup olmadıkları hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Fibronektin gibi kompleks glikoproteinlerin üzerindeki karbonhidratlar bazı özgül enzimler kullanılarak uzaklaştırılabilmektedir. Glikoproteinlerden karbonhidrat gruplarının uzaklaştırılması bir çok durumda önemli çalışma avantajları sağlamaktadır. Bu sayede peptid analizleri kolaylaşmakta ve ligand bağlanma aktiviteleri tanımlanabilmektedir (Astrof vd. 2004, Maqueda vd. 2007).

FN tek bir gen tarafından kodlanır ve homolog tekrarlar halinde bulunan üç ekzon içerir. Alternatif ekzon düzenlenmesi mekanizması sayesinde çoklu FN izoformları oluşturulabilmektedir. Ekzon düzenlenmesi FN geninin yalnız üç bölgesinde meydana gelir. Bunlar EDA, EDB ve V bölgeleridir. V. bölge duruma bağlı olarak proteinin yapısında bulunabilir ya da bulunmayabilir. Örneğin hücrel FN (cFN) EDA ve EDB bölgelerini içerirken, plazma FN'inde (pFN) bu bölgeler bulunmaz. cFN ve pFN salgılandıklarında ekstraselüler matriks ile ilişkilendirilir (Astrof vd. 2007).

FN'in; adhezyon, göç (transport), farklılaşma, transformasyon ve çoğalmada fonksiyonel olduğu detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Genelde FN, epitel doku gibi, değişik doku tiplerinde matriks yapılar oluşturmak suretiyle, hücrelerin bağlanmasında görev almaktadır (Şekil 2.6) (Singh vd. 2010). FN aynı zamanda değişik

mikroorganizmaların bağlanmasını yönetmede de önemli rol oynamaktadır. Çoğu Gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* gibi) FN'in (N)- terminal ucuna bağlanmaktadır. FN ayrıca *Candida albicans* gibi küflere ya da *Pneumocystis carinii* ve diğer parazit protozoanlara da bağlanma hedefi teşkil etmektedir (Gee vd. 2008, Singh vd. 2010).

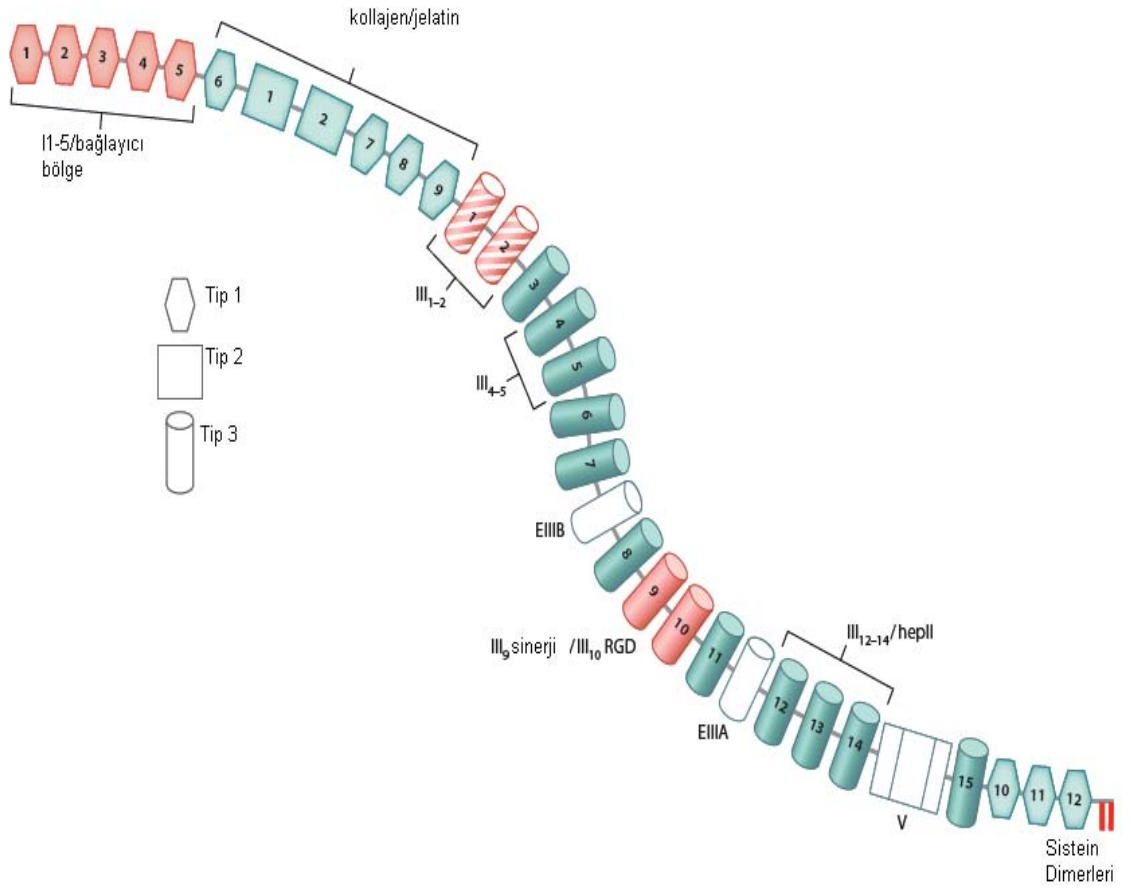


Şekil 2.6 Fibronektin matriksinin oluşum basamakları

(a) Kompakt fibronektin dimeri öncelikle integrinlerle ilişkilendirilmiştir. (b) Hücre içi proteinler (pembe, sarı ve mavi renkler) integrinlerin sitoplazma içerisinde bulunan bölgelerini güçlendirmekte ve aktin sitoskeleti (yeşil) ile integrinlerin ilişkilmesini sağlamaktadır. Sitoskelet bağlantıları hücrenin kasılma yeteneğini artırmakta, bu da fibronektinin yapısında meydana gelecek değişimlere öncülük etmektedir. (c) İntegrin kümeleri ve açıkta bulunan fibronektin bağlanma bölgeleri FN-FN bağlanmalarını teşvik etmektedir. (d) Meydana gelen bu olaylar sonrasında stabil, çözünmeyen fibriller matriks yapısı oluşmaktadır. Kırmızı kutucuk içerisinde tek bir FN dimerinin alt üniteleri arasında gerçekleşen bağ yapıları gösterilmiştir. (i) FN alt ünitelerinin N terminal uçları arasında gerçekleşen bağlanmalar, (ii) diğer fibronektin bağlanma bölgelerinin, III₁₋₂, III₄₋₅, III₁₂₋₁₄, katılımıyla lateral fibrillerin bağlanması ile sonuçlanmaktadır (Singh vd. 2010).

Enzimatik proteoliz yolu ile FN parçaları oluşturulabilir. Şekil 2.7'de (Singh vd. 2010) bu parçalar büyüklükleri ve bağlanma yeteneklerine göre sınıflandırılmıştır. FN termolizin ile parçalandığında değişik parçalar elde edilir. Bir 29 kDa'luk N terminal Fib-1/Hep-1 parçası, 1-5 adet arasında tip I tekrar içerir. Bu fragment fibrin, heparin ve bazı bakterilere bağlanma spesifitesine sahiptir. Söz konusu bölge ayrıca FN'in matriks

ile birleşmesinde rol oynar. Bu parçayı takip eden 42 kDa büyüklüğündeki jelatin bağlanma parçası (GBF) 6-9 adet tip I ve 1-2 adet tip II tekrar içermektedir. Bu ikinci parça denatüre kollajen ve doku transglutaminazına bağlanma yeteneğindedir. Üçüncü sıradaki parça ~9 kDa büyüklüktedir ve 1 adet tip III tekrara sahiptir. Bu parça zayıf bir şekilde heparin'e bağlanmakta ve bu yolla molekülün kendi kendisi ile interaksiyon vermesinde, yani fibril yapılarının oluşmasında rol oynamaktadır. 110 kDa'luk büyük merkezi hücre bağlanma parçası (CBF) 2-10 adet tip III tekrara ve integrin tanıma sekansı olarak görev yapan RGD domainine sahiptir. Merkezi parçayı, 30 ya da 40 kDa olabilen Hep-2 domaini izler. Bu parçada 12-14 ya da 12-15 adet tip III tekrar bulunmaktadır. FN'in C-terminalinde yer alan ikinci bir fibrin bağlanma bölgesi 19 kDa büyüklüğündedir ve bu bölge Fib-2 parçası olarak adlandırılmaktadır. Söz konusu bölge 10-12 adet tip I tekrar içerir (Xu vd. 2009, Singh vd. 2010).



Şekil 2.7 Termolizin kesimi ile elde edilen FN parçaları

Kırmızı çizgiler parçaları ifade etmektedir (Singh vd. 2010)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Suşlar ve plazmidler

Çalışmada kullanılan *Salmonella* Typhimurium ve *Escherichia coli* suşları ve vektör plazmidler Vaccine Research Institute (San Diego, CA, USA) ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bakteri suşları ve plazmidler, uygun tampon (Tris-EDTA) ya da % 40 gliserol içeren LB broth ortamlarında (Difco, Surrey, UH) -80 °C’de saklanmıştır.

LB (Luria-Bertani) Broth ve Agar

Tripton	10 g
Maya Özütü	5 g
NaCl	10 g
Destile su	1000 mL

2 N NaOH kullanılarak pH 7.2–7.5 arasına ayarlandı ve 121 °C’de 15 dakika sıcaklık uygulaması ile sterilize edildi. Katı ortam için bu karışıma 15 g/L olacak şekilde agar ilave edildi.

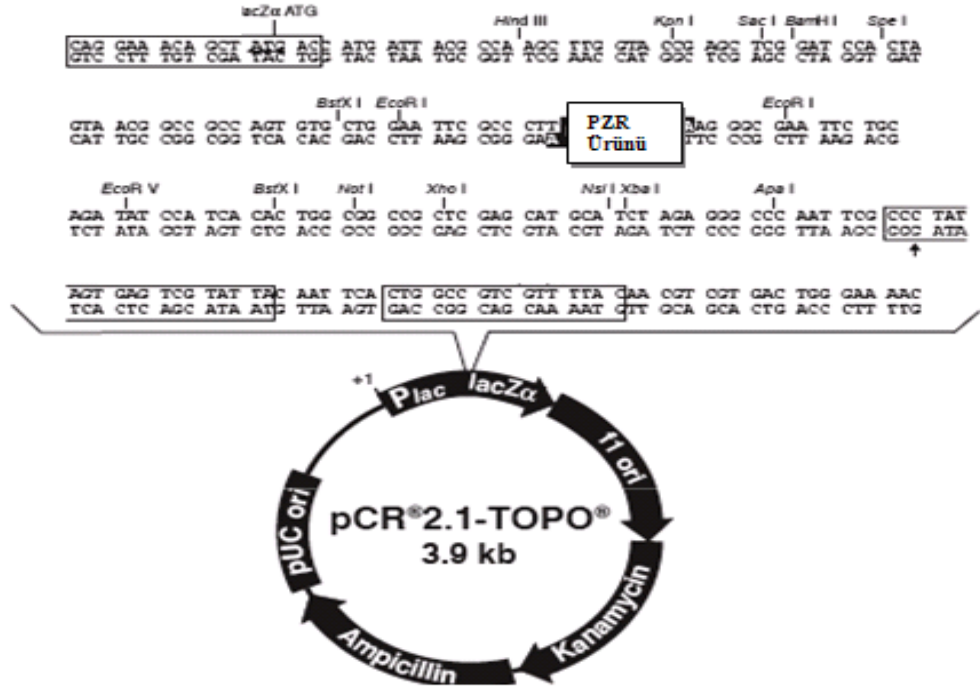
Tris (Tris Hidroksimetil Amino Metan)/ EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) Çözeltisi

Tris	1.21 g
EDTA	0.37 g
Destile Su	1000 mL

pH 7.4 (2 N HCl kullanıldı)

Sterilizasyon işlemi 121 °C’de 15 dk süre sıcaklık uygulaması ile yapıldı.

Tez çalışmasında genel kullanımı olan plazmid vektör haritaları (Şekil 3.1-3.4) :



LacZ α parçası: 1-57. bazlar arası

M13 ters primer bölgesi: 205-221 bazlar arası

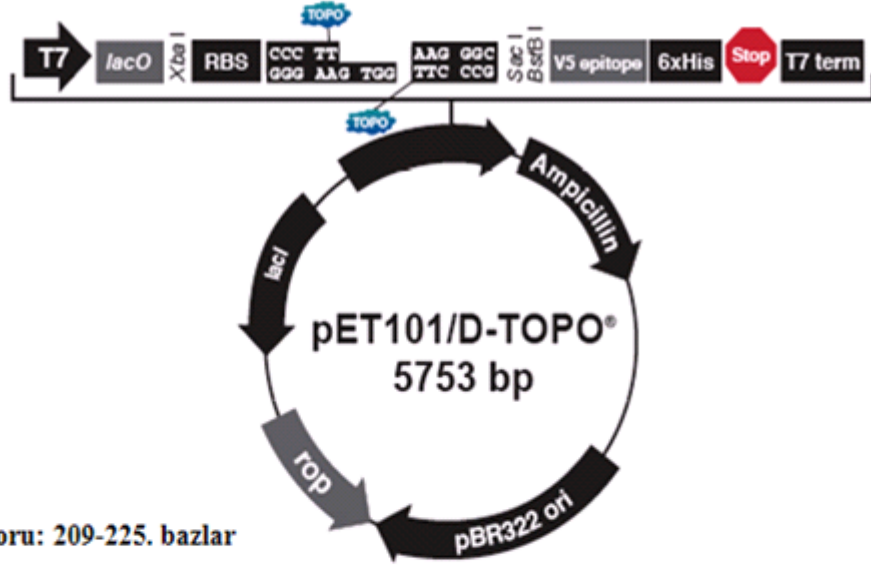
Çoklu klon bölgesi: 234-357. bazlar arası

Kanamisin dirençlilik: 1319-2113. bazlar arası

Ampisilin dirençlilik: 2131-2991. bazlar arası

Şekil 3.1 pCR 2.1-TOPO vektörünün genetik haritası

Bu vektör polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünlerinin doğrudan *E. coli*' ye klonlanmasında kullanılmıştır (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA).



T7 Promotoru: 209-225. bazlar arası

Ampisilin dirençlilik: 1949-2622. bazlar arası

LacI: 4493-5584. bazlar arası

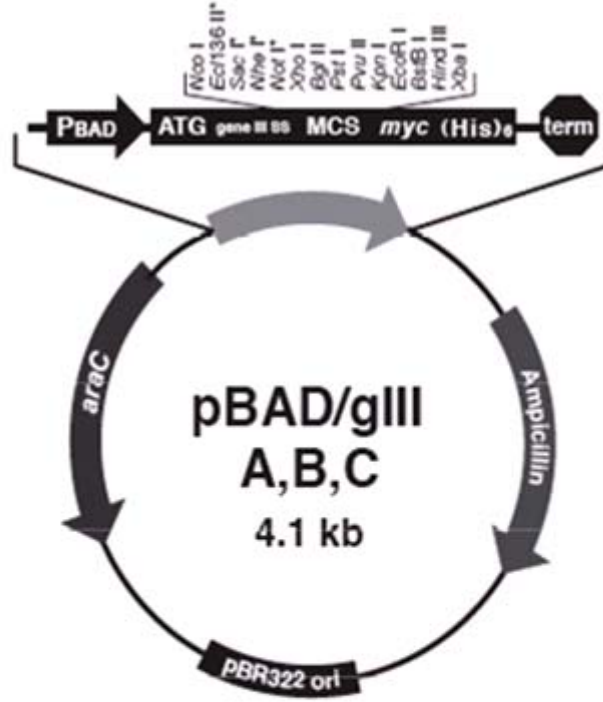
Polihistidin bölgesi (6XHis): 384-401. bazlar arası

V5 Epitopu: 333-374. bazlar arası

Ribozom bağlanma bölgesi (RBS): 282-288, 209-228. bazlar arası

Şekil 3.2 pET101/D-TOPO vektörünün genetik haritası

Bu vektör, küt uçlu PZR ürünlerinin doğrudan klonlanmasında ya da T7 regülasyonuna bağlı ifadesinde ve N-6xHis tag füzyon proteini üretiminde kullanılmıştır (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA).



araBAD promotörü: 4-276. bazlar arası

ATG baz bölgesi: 319-321. bazlar arası

Çoklu klonlama bölgesi: 374-428. bazlar arası

Ampisilin dirençlilik: 1032-1892. bazlar arası

AraC geni: 3241-4139. bazlar arası

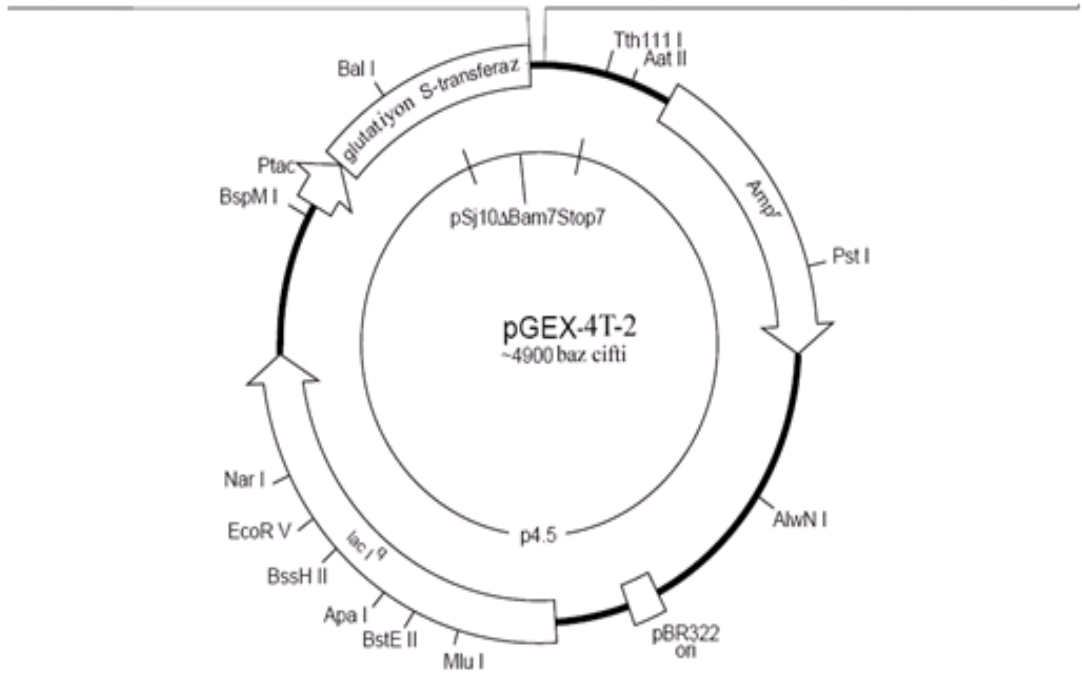
Şekil 3.3 pBAD/gIII A, B, C vektörlerinin genetik haritası

pBAD/gIII plazmidler pBR322'den türetilen ifade vektörleridir. Bu çalışmada MarT proteininin üretiminin induksiyonu amacı ile kullanılmıştır (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

pGEX-4T-2 (27-4581-01)

Trombin

Leu Val Pro Arg¹ Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop Kodonu



Şekil 3.4 pGEX-4T-2 vektörünün genetik haritası

Bu vektör, GST (glutathiyon-S-transferaz) füzyon proteinlerinin üretimi amacı ile kullanılmıştır (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA).

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerden genomik DNA'nın izolasyonu

Çalışılan bakteri suşunun 5 mL sıvı kültürü; LB broth ortamına % 1 oranında inokülasyon yapılarak ve 37 °C'de ve 200 rpm çalkalama hızında 12 saat geliştirilerek hazırlandı. Bu süre bitiminde 1.5 mL kültür mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 12000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürüldü. Üst sıvı ortamdan alındıktan sonra, bakteri çökeltisi 567 µL Tris-EDTA (TE) tampon içerisinde çözüldü. Üzerine 30 µL % 10 sodyum dodezil sülfat (SDS) ve 20 mg/mL proteinaz K (Sigma Chem Co., USA) aktarılıp karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat tutuldu. Ortama 100 µL 5 M NaCl ilave edilerek karıştırıldı. 80 µL CTAB (Hekzadezil Trimetil Amonyum Bromit) /NaCl çözeltisinin ilavesinin ardından, kesik mikropipet uçları kullanılarak, beyaz partikül yapısı oluşuncaya kadar iyice karıştırılan tüpler, 65 °C'de 10 dakika tutuldu. Bu ortam üzerine 0.75 mL kloroform/izoamil alkol (24/1 hacim/hacim) aktarıldı ve karıştırıldı. 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen ortamda üst faz yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı. Alınan sıvı faz üzerine 0.75 mL fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1 hacim/hacim) ilave edildi ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işlemi sonunda tüplerdeki üst sıvı yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu sıvının üzerine, hacminin 0.6'sı (~350 µL) oranında izopropanol ilave edildi. Ortam, beyaz çökelti oluşuncaya dek, öne arkaya hareket ettirilerek elle karıştırıldı. Çökelti oluştuğunda tüpler mikrosantrifüje yerleştirildi ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı döküldükten sonra çökelti % 70 etanol ile yıkandı (350 µL) ve tekrar 12000 rpm' de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst sıvı dikkatli bir şekilde ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oda sıcaklığında kromozomal DNA örneği kurutuldu. Son aşamada örnek 100 µL TE tampon içerisinde yaklaşık bir saat muamele edilerek çözüldü (Ausubel vd. 1994, Sambrook ve Russell 2001).

CTAB (Hekzadezil Trimetil Amonyum Bromit) /NaCl Cözeltisinin Hazırlanması

Önce 4.1 g NaCl 80 mL destile su içerisinde çözüldü ve üzerine 10 g CTAB yavaş yavaş eklenerek karıştırıldı. CTAB'in çözülmesi için çözelti aralıklarla 65 °C'ye kadar ısıtıldı. Son aşamada toplam çözelti hacmi destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.2.2 Plazmid DNA izolasyonu

Büyük ölçek plazmid izolasyonunda kullanılan tüm çözeltiler Qiagen (Valencia, CA, USA) firmasından sağlandı ve izolasyon için firma tarafından önerilen koşullar kullanıldı. LB broth'ta geliştirilen (% 1 inokülasyon oranı, 37 °C inkübasyon sıcaklığı, 200 rpm çalkalama hızı ve 12 saat inkübasyon süresi) bakteri kültürlerinden 100 mL alındı ve 5000 rpm de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutularak, hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltisi 4 mL P1 tampon içerisinde çözüldü. Üzerine 4 mL P2 tamponu ilave edildi, elde 6 kez çevrilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk tutuldu. Bu süre bitiminde 4 mL P3 tamponu (3.0 M potasyum asetat, pH 5.5) uygulandı ve aynı karıştırma işlemine tabi tutularak buz banyosunda 15 dk bekletildi. Buz banyosundan alınan tüpler 4 °C'de 13000 rpm de 30 dk santrifüj edildi (Sorvall RC5C Plus, Asheville, NC, USA). Üst sıvı tekrar 4 °C'de 13000 rpm de 15 dk santrifüj edildi (Sorvall RC5C Plus, Asheville, NC, USA). Burada oluşan üst sıvı, QBT tampon (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, % 15 hacim/hacim etanol ve % 0.15 hacim/hacim tritonX-100) ile dengelenmiş (kolonların dengelenmesi için, kolonlara 4 mL QBT tampon konularak tamamen akması beklendi) Qiagen-tip 100 kolonlara (Qiagen, Valencia, CA, USA) aktarıldı ve sıvının kolondan geçmesi beklendi. Bu aşamadan sonra kolon iki kez 10'ar mL QC yıkama tamponu (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0; % 15 izopropanaol, hacim/hacim) ile yıkandı. Yıkanan kolona 5 mL QF geri kazanım tamponu (1.25 M NaCl, 50 mM Tris.HCl, pH 8.5; % 15 izopropanaol, hacim/hacim) eklendi ve kolondan DNA alındı. Bu sıvıya 3.5 mL izopropanol ilave edildi ve 4 °C'de 11000 rpm de 30 dk santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra çökelti % 70 etanol ile yıkandı. Yıkanan ortam 4 °C'de 11000 rpm de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve üst sıvı atıldı. Oda sıcaklığında DNA çökeltisi kurutulduktan

sonra (~ 30 dk) 100 µL steril destile su içerisinde çözüldü. DNA örnekleri kullanılabildiği takdirde -20 °C’de saklandı.

3.2.3 Sodyum dodezil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Jel plakaları arasına, önce; 6.0 mL akrilamid (% 30)/bisakrilamid (% 8), 3.75 mL 4xTris-Cl/SDS, pH 8.8, 5.25 mL steril destile su, 50 µL % 10 amonyum persülfat ve 10 µL TEMED (N’N’N’N’-Tetra-metiletildiamin) içeren ayırıcı jel, tarak yerleştirme bölgesinin 1 cm altına gelinceye kadar döküldü. Bu jelin üzerine yığılma jelin döküleceği yere kadar (tarak yerleştirme seviyesi) steril destile su ilave edilerek, polimerizasyonun gerçekleşmesi için 30-45 dk beklendi. Polimerizasyonun gerçekleşmesinden sonra su akıtıldı ve tarak yerleştirme bölgesi seviyesine kadar; 0.65 mL akrilamid (% 30)/bisakrilamid (% 8), 1.25 mL 4xTris-Cl/SDS, pH 6.8, 3.05 mL steril destile su, 25 µL amonyum persülfat ve 5 µL TEMED içeren yığılma jel döküldü. Bu aşamada tarak yerleştirildi ve yığılma jelin polimerizasyonu için 15-20 dk beklendi. Polimerizasyon tamamlandığında Tris-Glisin tampon dökülen tanklara jeller yerleştirildi ve taraklar çıkarıldı. Tarak çıkarıldıktan sonra 10 µL protein ve protein standart (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) örneği yüklendi ve 100 voltta 1.5 saat elektroforez işlemi yapıldı. Örnekler ayırma jeli sonuna geldiğinde elektrik akımı kesildi. Jel tanktan çıkarıldı ve Commasie Brilliant Blue boya çözeltisinde boyandı ve ya protein standardı (Şekil 3.5) ile birlikte görüntülendi ya da doğrudan Western lekeleme amacı ile kullanıldı (Laemmli 1970).

4x Tris-Cl/SDS (pH 8.8)

Tris	91 g
Destile Su	300 mL
pH 8.8 (1 N HCl kullanıldı)	

Destile su ile toplam hacim 500 mL’ye tamamlandı ve 2 g SDS ilave edilip çözüldü.

4x Tris-Cl/SDS (pH 6.8)

Tris	6.05 g
Destile Su	40 mL

pH 6.8 (1 N HCl kullanıldı)

Destile su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı ve 0.4 g SDS ilave edilip çözüldü.

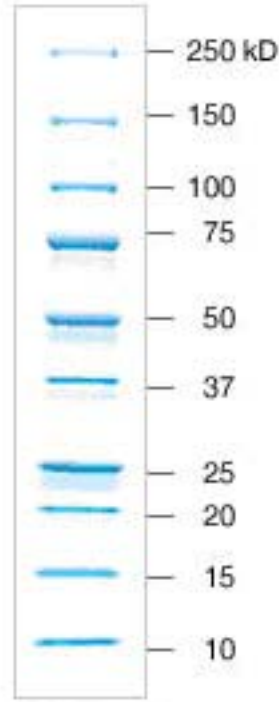
% 30 Akrilamit/ % 0.8 N, N' Bisakrilamit Çözeltisi

30 g akrilamit ve 0.8 g N, N' Bisakrilamit toplam hacim 100 mL olacak şekilde destile su içerisinde çözüldü. Çözelti 0.45 µm por çapındaki membran filtrelerden (Millipore Co. Billerica, MA, USA) geçirilerek sterilize edildi. Kullanılana kadar 4 °C'de karanlıkta saklandı.

Tris-Glisin Tamponu (5X)

Tris	15.1 g
Glisin	94 g
SDS (% 10)	50 mL

Bu karışım 700 mL destile su içerisinde çözüldü ve destile su ile toplam hacim 1000 mL ye tamamlandı.



Şekil 3.5 Protein büyüklüklerinin saptanmasında kullanılan protein standardının jel göç planı (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA)

3.2.4 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri ve agaroz jel elektroforezi

Araştırmada kullanılan tüm restriksiyon endonükleaz enzimleri ve bu enzimlere ait tampon çözeltiler New England Biolabs (Herts, UK) firmasından sağlanmıştır. Tüm kesim reaksiyonları için, bu firma tarafından önerilen ve aşağıda belirtilen reaksiyon karışımları kullanılmıştır:

Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyon Karışımı

DNA (mini ölçek izolasyon)	10 µL
Restriksiyon Endonükleaz Enzimi I	1 µL
Restriksiyon Endonükleaz Enzimi II	1 µL
Restriksiyon Endonükleaz Tamponu (2X)	2 µL
Destile su	6 µL

Kesim reaksiyonlarında *SmaI* ve *TaqI* hariç diğer tüm restriksiyon endonükleaz enzimleri için 37 °C'de 1 saat inkübasyon uygulandı. Bu süreler; *SmaI* için 25 °C'de 1 saat, *TaqI* için ise 65 °C'de 1 saat olarak alındı. Farklı inkübasyon sıcaklıkları ve sürelerine ihtiyaç duyan restriksiyon endonükleaz enzimleri için ise önce düşük sıcaklıkta aktif enzimin ve ardından da yüksek sıcaklıkta aktif enzimin kesim reaksiyonları için uygun inkübasyon koşulları oluşturuldu. Büyük ölçek DNA izolasyon örnekleri için kesimde 5 µL DNA örneği alındı. Tek restriksiyon endonükleaz enzim kesimi kullanıldığı koşullarda destile su miktarı 6 µL olarak kullanıldı. Kesim sonuçları 1 Kb marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılmak suretiyle % 1 konsantrasyonunda agaroz içeren jellerde kontrol edildi. İzole edilen DNA örnekleri jel kuyucuklarına 20' şer µL yüklendi. Jel göçünün görülebilmesi için DNA örneklerine 5 µL Orange-G yükleme boyası ilave edildi. Agaroz jel elektroforezi 100 V sabit elektrik akımında ve TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponda, 1 saat süreyle yapıldı. Elektroforez işlemi sonrasında DNA bantları TAE tampon içerisine 2 µg/mL olacak şekilde etidyum bromit (Sigma Chem. Co., USA) ilave edilerek 1 saat süreyle boyandı ve UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları alındı (Kodak 200). Moleküler büyüklük tespiti DNA standard kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.6).

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50X)

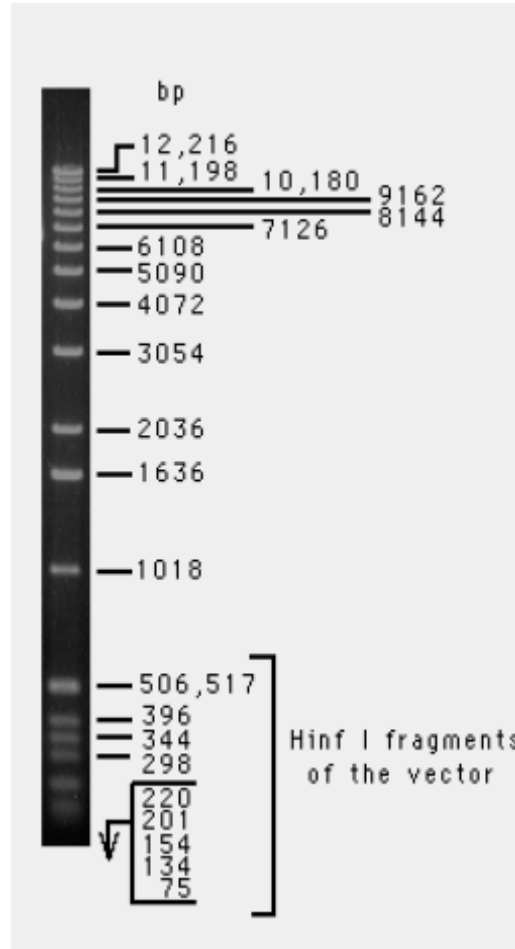
Tris.HCl	242 g
Glasiyel Asetik Asit	57.1 mL
EDTA (0.5 M)	100 mL

Destile su ile son hacim1 litreye tamamlandı

Orange-G Yükleme Tamponu

TAE (50X)	242 g
Gliserol	57.1 mL
Orange G	100 mL
Bidestile Su	36.25 mL

İlk olarak bidestile saf su ile gliserolün karıştırıldı. Ardından Orange-G (Sigma Chem. Co. USA) ve 50X TAE tampon ilave edildi. Bu ortam tekrar karıştırıldıktan sonra 1 mL hacimlere bölündü ve -20 °C’de saklandı.



Şekil 3.6 Kullanılan DNA standardının % 1 agaroz jel göç planı (Invitrogene, Carlsbad CA, USA)

3.2.5 DNA bağlama reaksiyonu (Ligasyon)

PZR ya da agaroz jellerden geri kazanılan DNA parçalarının klonlanması ya da yeni bir vektöre aktarılıp tekrar kesilmesi için, bağlanma reaksiyonları yapıldı. DNA

parçalarının bağlanma reaksiyonlarında, T4 DNA ligaz enzimi ve bu enzime ait tampon çözeltileri (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanıldı.

DNA Bağlanma Reaksiyonu Karışımı

Vektör DNA	2 µL
DNA parçası	6 µL
DNA seyreltme tamponu	2 µL
T4 DNA ligaz tamponu (2X)	10 µL
T4 DNA ligaz	1 µL

Önce vektör DNA, DNA parçası ve DNA seyreltme tamponu, tüp içerisinde karıştırıldı. Ardından T4 DNA ligaz tamponu ve son olarak da enzim ilave edildi. Bu karışım 16 °C’de 12-16 saat tutularak bağlanma gerçekleştirildi. Eğer T4 Quick DNA ligaz (New England Biolabs, Herts, UK) enzimi kullanılmış ise, reaksiyonda DNA parçaları 8 µL olarak alınmış ve DNA seyreltme tamponu ilave edilmemiştir. Bu reaksiyon için inkübasyon oda sıcaklığında 5 dk gerçekleştirildi. Oluşturulan vektör son aşamada, doğrudan elektroporasyon ya da kimyasal transformasyon yolu ile konak hücrelere aktarıldı.

3.2.6 β-galaktozidaz testi

Test yapılacak bakteri kültürü, LB broth ortamına % 1 oranında inoküle edildi ve 37 °C’de 200 rpm çalkalama hızında 12 saat geliştirildi. Negatif kontrol olarak, β-galaktozidaz aktivitesi içermeyen *S. Typhimurium* LT2 suşu kullanıldı. Geliştirilen hücreler, yeni LB sıvı besiyeri ortamına inoküle edildi (% 1) ve 3 saat yukarıda belirtilen inkübasyon koşullarında geliştirildi (OD₆₀₀ 0.4-0.6 arası). Bu kültürler 20 dk buz banyosunda bekletildikten sonra, 2 mL kültür 4000 rpm’de 10 dakika (4 °C’de) santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst sıvının ortamdan uzaklaştırılmasından sonra hücre çökeltisi, buzda soğutulan 2 mL Z tampon içerisinde çözüldü. Hücrelerin optik yoğunluğu (OD₆₀₀), Z tampon çözeltisi şahit olarak kullanılmak suretiyle ölçüldü (UV-

VIS spectrophotometer, Shimadzu, Japan). Bu ortamdan alınan 0.5 mL hücre süspansiyonu, 0.5 mL Z tampon çözeltisi ile seyreltildi. Seyreltilen hücre süspansiyonu üzerine 100 µL kloroform ve 50 µL % 0.1 SDS ilave edilerek karıştırıldı. 28 °C su banyosunda 5 dakika inkübasyon uygulandı. Reaksiyon, 0.2 mL ONPG (o-nitrofenil-β-D-galaktozidaz, 4mg/mL, BioVectra, Price Edward Island, Canada) uygulanıp karıştırılarak başlatıldı ve sarı renk oluşuncaya kadar 28 °C su banyosunda bekletildi. Reaksiyon, uygun sarı renk oluşuncaya kadar sürdürüldü. Uygun sarı renk oluşumu, bu ortamın optik yoğunluğunun OD₄₂₀ de 0.6-0.9 arasına ulaşması ile değerlendirildi. Sarı renk oluşumu saptandıktan sonra (genellikle 1-2 saat arasında) 0.5 mL, 1 M Na₂CO₃ ilavesi ile reaksiyon durduruldu. Bu ortamlardan alınan 1'er mL hacimler, mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, kloroform ve hücre çökeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir tüpte üst sıvının optik yoğunluğu 420 nm ve 550 nm dalga boylarında ölçüldü. β-galaktozidaz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak saptandı:

$$\text{Miller Ünitesi} = 1000X \{ (OD_{420} - 1.75OD_{550}) / (T \times V \times OD_{600}) \}$$

* OD₄₂₀ ve OD₅₅₀: Reaksiyon karışımlarının optik yoğunluğu

* OD₆₀₀: Yıkanan hücre süspansiyonlarının hücre yoğunluğu

T= Dakika olarak reaksiyon zamanları

V= Denede kullanılan kültürün mL olarak hacmi

Laktoz operonunun tam indüksiyonunda 1500 ünite, indüklenmemiş laktoz operonu için ise 1.5–3 unite arası β-galaktozidaz aktivite ölçümleri tipiktir (Miller 1972, Griffith ve Wolf 2002).

Z Tampon Çözeltisi

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0.80 g
NaH ₂ HPO ₄ .H ₂ O	0.28 g
KCl (1 M)	1 mL
MgSO ₄ (1M)	0.05 mL
β-merkaptöetanol (0.05 M)	0.135 mL

Ortama, hacim 40 mL' ye ulaşıncaya kadar destile su ilave edildi ve tüm tuzlar çözüldü. Ortam pH'sı, 2N HCl kullanılarak, 7.0 olacak şekilde ayarlandı. Destile su ilavesi ile toplam hacim 50 mL' ye çıkarıldı. 0.45 µm membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle sterilize edildi. Hazırlanan çözelti 4 °C'de saklandı.

ONPG (o-nitrofenil-β-D-galaktozidaz) Çözeltisi

ONPG	0.004 g
Fosfat tampon	1 mL

Fosfat Tampon Çözeltisi

Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	1.61 g
NaH ₂ HPO ₄ . H ₂ O	0.55 g
Destile su	100 mL

Ortam pH'sı, 2N HCl kullanılarak, 7.0 olacak şekilde ayarlandı ve 0.45 µm membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilmek suretiyle sterilize edildi. Hazırlanan çözelti 4 °C'de saklandı.

3.2.7 *marT* geninin pBAD/gIII A vektörüne klonlanması

Aktivite kontrol testleri için *marT* geni, pBAD/gIII A vektörü kullanılmak suretiyle *E. coli*'nin indüklenebilir arabinoz BAD promotorunun önüne klonlandı. Bu klonlamada iki strateji kullanıldı:

İlk stratejide *marT* geni kendi ribozom bağlanma bölgesi, başlama ve sonlanma kodonlarını içerecek primerler kullanılarak klonlandı. Bu primerler, *SacI* (ileri primer: 5'GGAGCTCGGGACAATCCATGTCCTGCTACG 3') ve *PstI* (geri primer, 5'GCTGCAGTTACCCATGTGTCACCCCGCGG 3', 867 baz çiftlik PZR ürünü) kesim bölgeleri içerecek şekilde düzenlendi.

İkinci stratejide primer seti başlama ve bitiş kodonları içermeyecek şekilde düzenlendi. Burada amaç, pBAD vektöründe bulunan başlama, ribozom bağlanma ve sonlanma kodonlarını kullanmaktır. pBAD vektörünün klonlama bölgesinin sonunda (arabinoz BAD geninin sonu) altı adet histidin kodonu (6xhis tag) bulunmaktadır. PZR ürünü sonlanma kodonu içermediğinden, pBAD vektörünün içerdiği bu altı adet histidin bölgesi de, klonlanan genin ürününe (MarT proteinine) ilave edilir. Bu sayede MarT-his (histidin işaretli MarT proteini) üretilir. Bu tip protein üretimi için düzenlenen primerler, *SacI* (ileri primer: 5' GGAGCTCTCCTGCTACGCAGCCACAGCATC3') ve *PstI* (geri primer: 5'GCTGCAGCCCATGTGTCACCCCGCGG3', 856 baz çiftlik PZR ürünü) restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi içermektedir. Primer dizaynı için MacVector (Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılmış ve tüm primerler, Operon Technologies (Huntsville, AL, USA) firması tarafından üretilmiştir. Bu primerler kullanılarak elde edilen PZR ürünleri, TopoTA klonlama kitinden yararlanılarak (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) PCR 2.1 vektörüne klonlandı. Üretici firma önerileri doğrultusunda yapılan klonlamada kısaca aşağıda belirtilen aşamalar ve koşullar kullanıldı; 2 µL saflaştırılmış PZR ürünü, 2 µL steril destile su, 1 µL tuz çözeltisi ve 1 µL PCR 2.1 vektörü bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Bu ortam oda sıcaklığında 5 dk tutuldu. Bu aşamadan sonra söz konusu karışım, 50 µL *E. coli* Top10 hücreleri (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) üzerine aktarıldı. Buz üzerinde 30 dk tutulan hücre ortamı, 30 sn 42 °C'de ısı şokuna maruz bırakıldı ve üzerine 500 µL LB broth ilave edildi. Bu ortam 37 °C'de 1 saat karıştırılarak (200 rpm) inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi bitiminde bu karışım, X-gal (30 mg/L) içeren LB agar ortamlarına 200 µL olacak şekilde ilave edildi. 37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra, beyaz koloniler (PCR 2.1 vektörüne klonlanan gen, β-galaktosidaz genini inaktive etmektedir), öze ile kanamisin içeren LB broth ortamlarına alındı ve 37 °C'de 1 gece, 200 rpm çalkalama hızında geliştirildi. Bu geliştirilen hücrelerden plazmid izolasyonu, plazmid izolasyon kiti kullanılarak (Qiagen, Valencia, CA, USA) gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidlerin ilave fragmenti (PZR ürünü) içerip içermediği, *PstI-SacI* restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu kullanılarak kontrol edildi. Bu reaksiyonda 10 µL plazmid DNA, 2 µL tampon I, 1 µL *PstI* ve 1 µL *SacI* karışımı kullanıldı. Karışım 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve oluşan fragmentler % 1 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jel sistemine uygulanarak tanımlandı (867 ve 856

baz çifti büyüklükler esas alındı). Doğru klonlardan, deneyin daha ileri aşamalarında kullanılmak üzere stoklar hazırlandı.

Deneyin bir sonraki aşamasında; pBAD/gIII A vektörü içeren *E. coli* DH5 α suşu, 50 mL LB broth ortamında 1 gece geliştirildi (200 rpm, 37 °C). Bu kültürlerden, büyük ölçek plazmid izolasyonu yöntemi ile (Qiagen-tip 100 kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) hazırlanan pBAD/gIII A plazmid örnekleri, yukarıda tanımlanan şekilde, *Pst*I-*Sac*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. PCR 2.1 vektörüne klonlanan fragmentler de aynı şekilde kesildikten sonra; düzlemsel hale gelen pBAD/gIII A vektörleri ve fragmentler, agaroz jelden geri kazanıldı. Son aşamada fragmentler düzlemsel pBAD/gIII A vektörüne bağlandı (Sambrook ve Russell 2001). Doğru klonlardan, deneyin daha ileri aşamalarında kullanılmak üzere stoklar hazırlandı.

Doğru fragmentleri içeren plazmidler (her iki strateji için oluşturulan birer rekombinant plazmid), kontrol edilen kolonilerden izole edildikten sonra, elektrokompotent *S. Typhimurium* LT2 hücrelerine, elektroporasyon yolu ile aktarıldı. Transformasyona tabi tutulan ortamlar, 200 μ L'lik hacimler halinde karbenisilin (100 μ g/mL) içeren LB agar ortamlarına aktarıldı ve 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. İki farklı plazmid transformasyonu için, seçilen birer koloninin 1 gecelik kültürü; karbenisilin (100 μ g/mL) içeren LB broth ortamına aktarıldı ve 37 °C'de, 200 rpm çalkalama hızında, OD₆₀₀ = 0.5 oluncaya kadar (~ 2–3 saat) geliştirildi. Bu süre sonunda farklı oranlarda arabinoz (% 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002 ağırlık/hacim, Çizelge 3.1) hücre kültür ortamlarına aktarıldı. Kültürler aynı koşullarda, ilave 3 saat daha geliştirildi. Bu ortamlardan alınan 100 μ L örnekler, 100 μ L 2XSDS yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 10 μ L hacimler SDS-PAGE sisteminde yürütüldü. Naylon membranlara aktarılan jel bantları, Western lekelemeye tabi tutularak MisL protein üretim değişimleri belirlendi. MisL üretim düzeyleri ayrıca, β -galaktozidaz testi ile de kontrol edildi. Böylece bu rekombinant plazmidde *marT* geni ürününün MisL üretimini indükleyip indüklemediği, Western lekeleme analizleri yanında, β -galaktozidaz aktiviteleri de ölçülerek belirlendi (Dorsey vd. 2005).

Çizelge 3.1 Arabinoz konsantrasyonlarının hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler

Stok Çözelti	5 mL' ye Aktarılan Miktar	Arabinoz Konsantrasyonu
% 20	0.05 mL	% 0.2
% 2	0.05 mL	% 0.02
% 0.2	0.05 mL	% 0.002
% 0.02	0.05 mL	% 0.0002
% 0.002	0.05 mL	% 0.00002

3.2.8 Western lekeleme (blotting)

Protein belirlemede yarı sulu Western lekeleme yöntemi kullanıldı. Bu işlem için, önce SDS-PAGE jeli boyutunda kesilen Immobilon-P (PVDF) membran (Millipore Co., Billerica, MA, USA) metanol içerisine konarak 5 dk oda sıcaklığında karıştırma işlemi uygulandı. Bundan sonra 4 kez 5' er dk' lık sürelerle bidestile steril saf su ile karıştırılarak yıkandı. Transfer tampon çözeltisi (20 mL 5X Tris-Glisin Tamponu, 20 mM Metanol, 6mL Bidestile Saf Su) ile yıkanan Whatman kağıdı (Whatman 3MM Cellulose Paper, Whatman International Ltd., Maidstone, England) Biorad (Trans-Blot SD, Semi-Dry Cell) transfer hücresi (Biorad Lab. Inc., Richmond, CA, USA) alt yüzeyine konuldu. Aynı tampon içerisinde yıkanan membran, bu Whatman kağıdı üzerine yerleştirildi ve üzerine, protein yürütülen jel kondu. Cam bir pipet, jel üzerinde hafif bir şekilde yuvarlanarak hava kabarcıkları alındı ve en üst kısma, transfer tampon çözeltisi içerisinde ıslatılan 3 parça Whatman kağıdı (Whatman 3MM Cellulose Paper, Whatman International Ltd., Maidstone, England) yerleştirildi. Transfer hücresinin üst kapağı kapatıldıktan sonra, 60 dk süresince sabit elektrik akımı (konulan jel başına 150 mA ve en fazla 15 Volt) uygulandı. Transfer işleminden sonra membran, 100 mL blok tampon çözeltisine (25 g yağsız süt tozu, 250 µL Tween-20, 500 mL PBS, pH 7.4) ve karıştırıcı üzerinde 1 saat ya da 1 gece (12 saat) inkübasyona tabi tutuldu. 1 saatlik inkübasyonlar oda sıcaklığında, 1 gecelik inkübasyonlar 4°C'de ve blok tampon çözeltisine % 0.1 oranında sodyum azid ilave edilerek gerçekleştirildi. Ardından membran, 50 mL blok tampon çözeltisi içerisine 50 µL primer antibadi çözeltisi ile muamele edildi ve oda sıcaklığında 1 saat yavaş bir şekilde karıştırılarak inkübasyona

tabi tutuldu. Primer antibadi uygulaması bitiminde membran, her seferinde blok tampon içerisinde 5 dk süresince karıştırılarak (oda sıcaklığında) 3 kez yıkandı. Buradan alınan membran, ikinci antibadi çözeltisini (50 mL blok tampon çözeltisi içerisine 2.5 µL ikinci antibadi konularak hazırlandı) içeren plastik kaba aktarıldı ve aynı koşullarda 1 saat daha tutuldu. İkinci antibadi uygulanan membran, 3 kez blok tampon ve 3 kez de steril PBS çözeltisi kullanılarak son yıkama işleminden geçirildi (membran sistemleri yeni işlem için plastik kaplara transfer edilmeden önce, bu kaplar daima % 70 etanol ile temizlendi). Buradan alınarak koruyucu strece yerleştirilen transfer membranı üzerine Biorad Immune-Star substratı uygulandı ve 1 dk oda sıcaklığında bekletildi ve süre bitiminde substrat akıtıldı. Membran naylon koruyucu içerisine alındı ve transfer yüzeyi film ile temas edecek şekilde X-Ray film (Kodak Biomax MS film; Kodak Health Imaging, Chelon, France) içeren kasete (Spectronics Co., Wetsbury, New York, USA) yerleştirildi. Gelişim için farklı sürelerde bekletilen filmler, developer'a (X-Ray Developer LX-24, Eastman Kodak Co., New York, USA) yerleştirildi ve lekeler tanımlandı (Harlow ve Lane 1999).

5XTris-Glisin Tampon Çözeltisi

Tris	15.1 g
Glisin	94.0 g
SDS (% 10)	50 mL

Bu içerikler 700 mL saf su içerisinde çözüldükten sonra toplam hacim 1 litreye tamamlandı.

3.2.9 İmmün elektron mikroskopi

Düşük tuz konsantrasyonu içeren 4 mL LB broth ortamına *S. Typhimurium* NA23 suşu inoküle edildikten sonra optik yoğunluk (OD₆₀₀) 0.5 düzeyine ulaşınca kadar 37 °C'de inkübasyona tabi tutuldu. Kültürler daha sonra ortama, son konsantrasyonu % 0.02 olacak şekilde L-arabinoz ilave edilerek 3 saat daha inkübe edildi. MisL ototransporter üretiminin teşvikini esas alan bu uygulamadan sonra, anti-MisL

antiserumu kullanılarak, söz konusu proteinin hücre yüzeyindeki lokasyonu immün elektron mikroskopi yöntemiyle belirlendi.

İmmün altın işaretleme aşamasının ilk basamağında, fosfat ile tamponlanmış peptonlu su ile iki kez yıkanan bakteri süspansiyonu, 10 µL olacak şekilde elektron mikroskop gridlerine aktarıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Grid üzerindeki fazla süspansiyon akıtıldıktan sonra, üzerine % 1 oranında sığır serum albumini içeren fosfat ile tamponlanmış peptonlu su içerisinde 1/250 oranında seyreltilen MisL antibadi çözeltisinden 10 µL ilave edildi. Bu ortam oda sıcaklığında 20 dakika tutuldu ve bu süre sonunda gridler % 1 oranında sığır serum albumini içeren fosfat ile tamponlanmış peptonlu su (PBS) ile 1 dk yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, % 1 oranında sığır serum albumini içeren PBS içerisinde 1/20 oranında seyreltilen altın işaretli ikincil antibadi (Gold Labelled AntiGoat IgG, Sigma Chem Co. USA) 10 µL olacak şekilde ilave edildi ve tekrar 20 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Son aşamada gridler, % 1 oranında sığır serum albumini içeren PBS ile 1 dk yıkandı ve oda sıcaklığında tutularak kurutuldu. Elektron mikroskopik fotoğraflar Philips CM 120-A elektron mikroskobu kullanılarak alındı (Dorsey vd. 2005, Chessa vd. 2008a).

3.2.10 *Salmonella Typhimurium* 14028 suşunda *marT* geninin ifadesi

3.2.10.1 *marT* geninin PZR ile çoğaltılması

İlk olarak Luria Bertani (LB) broth besi ortamında 18 saat süre ile 37 °C’de 200 rpm çalkalama hızında geliştirilen *S. Typhimurium* ATCC14028 suşundan GenElute bakteriyel genomik DNA kiti (NA2120, Sigma Chem. Co., USA) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokole göre genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Sigma GenElute Bakterial Genomik DNA Kiti İzolasyon Protokolü:

1. 18 saat süre ile 37 °C’de 200 rpm çalkalama hızında geliştirilen *S. Typhimurium* ATCC14028 suşundan 1.5 mL alınarak steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm’de 2 dk süre ile santrifüj işlemi uygulandı. Üst sıvı ortamdan

uzaklaştırıldıktan sonra, elde edilecek genomik DNA miktarının artırılması amacı ile çökelti üzerine aktif kültürden 1 mL daha ilave edilerek aynı hız ve zamanda santrifüj işlemi yapıldı.

2. Çökelti 180 µL Liziz çözültisi (B 6678) içerisinde çözüldü. Süspansiyon üzerine 20 µL RNaz A (R 1648) eklendi, karıştırıldı ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, karışıma 20 µL proteinaz K (20 mg/mL) eklenip karıştırıldı ve 30 dk 55 °C’de inkübe edildi.
4. Hücrelerin parçalanması için, karışım üzerine 200 µL Liziz C çözültisi (B 8803) ilave edildi, 15 sn karıştırıldı ve 10 dk 55 °C’de inkübasyona tabi tutuldu.
5. İnkübasyon sırasında GenElute Miniprep bağlanma kolonlarının çalışmaya hazır hale getirilmesi amacı ile her kolona 500 µL kolon hazırlık çözültisi aktarıldı ve kolonlar 2 mL hacminde mikrosantrifüj tüpleri içerisine yerleştirildi. 12000 rpm’de 1 dk santrifüj basamağından sonra, mikrosantrifüj tüplerine süzülen sıvı uzaklaştırıldı.
6. Hücreleri içeren çözülti üzerine 200 µL % 100’lük etanol eklenerek 10 sn süresince karıştırıldı.
7. Hücreleri içeren çözültinin tamamı, daha önceden hazırlanan kolonlara aktarıldı ve 7000 rpm’de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı. Kolonlar 2 mL’lik yeni mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi.
8. Kolonlar üzerine 500 µL Yıkama çözültisi O (Wash Solution O, W 0263) aktarıldı ve 7000 rpm’de 1 dk santrifüj uygulandıktan sonra, kolonlar 2 mL hacminde başka bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
9. Konsantre yıkama çözültisinin (B 6553) etanol kullanılarak seyreltilmesi sonucu hazırlanan çözültiden 500’er µL kolonlara aktarıldı ve 14000 rpm’de 1 dk süresince santrifüj edildi. Etanol kalıntısının gözlenmesi durumunda santrifüj tekrarlandı ve kolonlar temiz 2 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi.
10. 200 µL, 1mM Tris (pH 8) kolonların merkezine aktarıldı, 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 7000 rpm’de 1 dk süresince santrifüj işlemine tabi tutuldu.
11. Aynı işlem 100 µL 1mM Tris (pH 8) ilavesi ile tekrar edilerek, toplam hacimde 300 µL genomik DNA çözültisi elde edildi.

marT geninin çoğaltılmasında kullanılacak primerlere eklenen restriksiyon endonükleaz tanıma serilerinin hangi enzime ait olacağını belirlemede, enzimin çoğaltılacak gen içerisinde kesim bölgesi içermemesi ve aynı enzimlerin, kullanılacak olan pBAD24 vektörünün klonlama bölgesinde de kesim yapmasına dikkat edildi. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin hedef gen içerisinde kesim bölgesinin olup olmadığının araştırılmasında Webcutter 2.0 (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>) programından yararlanıldı ve *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin bu çalışma için uygun olduğu sonucuna varıldı.

marT geninin tamamının çoğaltılması amacıyla tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) koşulları: 94 °C'de 2 dk, 30 döngü: 94 °C'de 15 sn, 49 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1dk ve son basamak olarak 72 °C'de 5 dk olarak belirlendi.

3.2.10.2 Elektrokompotent hücrelerin hazırlanması

% 1 inokülasyon oranı ile LB broth ortamına (2 mL) aktarılan *Salmonella* suşları, 37 °C'de ve 200 rpm çalkalama hızında 12 saat geliştirildi. Buradan 1 mL alınarak 100 mL LB ortamına ekim yapıldı ve OD₆₀₀ 0.4-0.6 oranına ulaşmaya kadar (yaklaşık 3 saat) 37 °C'de ve 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona tabi tutuldu. Bu zaman zarfında % 10 gliserol çözeltisi buz banyosunda soğutuldu. Hücreler 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek (+4 °C) çöktürüldü. Çöktürülen hücreler, buz banyosunda soğutulmuş steril destile su içerisinde (50 mL) çözüldü. Bu ortam tekrar 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek (+4 °C) çöktürüldü ve 25 mL buz banyosunda soğutulmuş steril destile su içerisinde çözüldü. Hücre süspansiyonu son santrifüj işleminin ardından (5000 rpm, +4 °C, 10 dk) 400 µL soğuk % 10 gliserol içerisinde çözüldü. Buz banyosunda 30 dk bekletilen bu ortam, daha sonra 50 µL' lik hacimlere bölündü ve tüpler -80 °C'de saklandı (Dagert ve Erlich 1979, Nishimura vd. 1990).

3.2.10.3 Elektroporasyon

Plazmid ya da vektör DNA (>3 µg, <10 µg) örneği, 50 µL elektrokompotent hücre ile karıştırıldı. Bu karışım daha önce buz banyosunda soğutulmuş elektroporasyon (Bio-Rad Gene Pulser, Hercules, CA, USA) kuvvetlerine (0.2 cm) aktarıldı. Elektroporasyon 25 µF'de, 2.5 K volt ve 200 ohm koşullarında sabit zamanlı olarak (tek vuruş) gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda hücreler 1 mL SOC (% 0.5 maya özütü, % 2.0 tripton, 10 mM NaCl, 2.5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM glukoz, Teknova, Hollister, CA, USA) ortamına alındı ve 37 °C'de 1 saat bekletildi (hücreler T7 polimeraz içeriyor ise, sıcaklık 30 °C olarak değiştirildi). Hücreler 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve seçim ortamında elektrotransformantlar seçildi (Nishumura vd. 1990).

3.2.10.4 Arabinoz varlığında *marT* üretiminin teşviki, RNA izolasyonu ve cDNA üretimi

Uygun antibiyotikleri içeren LB broth ortamlarında 37 °C'de 1 gece geliştirilen MZ1627 (*S. Typhimurium* Δ*marT*+pNA01) ve MZ1629 (*S. Typhimurium* Δ*marT*+pBAD24) suşları, uygun antibiyotikler ilave edilmiş 200 mL LB broth besi ortamına % 1 oranında inoküle edildi. 200 rpm çalkalama hızında, 37 °C'de OD₆₀₀=0.5 düzeyine kadar geliştirilen kültür ortamlarına, *marT* geninin ifadesi için optimum düzey olarak belirlenen % 0.02 oranında L-arabinoz eklendi ve inkübasyona devam edildi. Arabinoz ilavesinden 20 dakika, 1 saat ve 5 saat sonra 25'er mL örnekler alınarak, üzerlerine 5 mL buzda soğutulmuş % 5 asidik fenol / % 95 EtOH çözeltisinde ilave edildi ve 5000 rpm'de, 4 °C'de, 20 dk süresince santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrasında elde edilen hücre çökeltisi, 1 mL TE tampon (pH 7.5) ile yıkandı ve çökelti kullanılabilecek şekilde -80 °C'de muhafaza edildi.

Arabinoz indüksiyonu uygulanan bakteri çökeltileri, bir sonraki basamakta RNA izolasyonunda kullanıldı. RNA izolasyonu için Promega SV total RNA izolasyon kitinden (Promega Co. Madison, USA, Cat No. NZ3100) yararlanıldı. Elde edilen RNA örnekleri % 1.5 oranında agaroz içeren jelde yürütüldü ve UV ışık altında görüntülendi.

Promega SV total RNA izolasyon Kiti Protokolü:

- 1) -80 °C'de muhafaza edilen bakteri çökeltileri, taze hazırlanan ve 50 mg/mL oranında lizozim içeren 200 µL TE tampon içerisinde çözüldü ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- 2) Karışım üzerine 150 µL SV RNA liziz tamponu ve 700 µL RNA dilüsyon tamponu aktararak, iyice karışması sağlandı. Bu karışım 70 °C'de 3 dakika inkübasyona tabi tutuldu.
- 3) Karışıma, 400 µL % 95'lik EtOH eklenerek 3-4 defa pipetlendi ve 14,000 rpm'de 10 dk süresince santrifüj işlemi uygulandı.
- 4) Karışım Spin kolon sistemine aktararak 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 5) Tüp içerisine geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, membran üzerine 600 µL SV RNA yıkama çözeltisi aktararak 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı.
- 6) Bu basamaklar uygulanırken bir taraftan DNaz inkübasyon karışımı hazırlandı: reaksiyon başına 40 µL merkez tamponu + 5 µL 0.09M MnCl₂ + 5 µL DNaz I enzimi olacak şekilde karışım hazırlanarak pipet aracılığı ile karıştırıldı.
- 7) Her membran üzerine 50 µL DNaz inkübasyon karışımı aktararak 15 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- 8) İnkübasyon süresi tamamlandığında membran üzerine 200 µL SV DNaz durdurma çözeltisi aktarıldı ve 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj uygulandı.
- 9) Süzülen sıvı uzaklaştırıldı ve membran üzerine 600 µL SV RNA çözeltisi transfer edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 10) Tüp içerisinde biriken sıvı atıldıktan sonra, membrana 250 µL SV RNA yıkama çözeltisi aktararak 14000 rpm'de 2 dk santrifüj işlemi uygulandı.
- 11) Kolonun yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transferinin ardından, membrana 100 µL nükleaz içermeyen destile su aktarıldı ve 1-5 dk beklendi. Ardından 14,000 rpm'de 1 dk süresince santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Son aşamada RNA örneğinin konsantrasyonu nanodrop yardımı ile belirlendi ve kullanılacağı zamana dek -80 °C'de muhafaza edildi.

Elde edilen RNA örnekleri, daha sonra Q-PZR denemesinde yararlanılacak olan cDNA sentezinde kullanıldı. RNA örneklerinden cDNA sentezinde Superscript II RT cDNA

sentez kitinden (Invitrogene, Carlsbad CA, USA) yararlanıldı. RNA örneklerinden cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği, % 2 oranında agaroz içeren jeller ile kontrol edildikten sonra Q-PZR basamağına geçildi.

Superscript II RT cDNA sentez protokolü:

Toplam reaksiyon hacmi 1ng-5µg RNA içerecek şekilde 20 µL olmalıdır.

1. Aşağıda belirtilen bileşenler nükleaz içermeyen bir tüp içerisinde karıştırıldı :
Oligo (dt) (500µg/mL) ya da 50-250 ng rastgele primer..... 1 µL
1ng-5 µg RNA.....x µL
1 µL dNTP karışımı (her biri 10mM)..... 1 µL
Steril destile su.....son hacim
12 µL olacak şekilde ilave edildi.
2. Karışım 65 °C’de 5 dk inkübe edildikten sonra buz üstünde soğutuldu. Karışım üzerine:
5X First strand tamponu.....4 µL
0.1M DTT.....2 µL
RNase OUT (40 ünite/µL).....1 µL ilave edildi
3. Tüpün içeriği yavaş bir şekilde karıştırıldı (rastgele primerler kullanılıyor ise 25 °C’de 2 dk inkübasyon basamağı uygulanır).
4. İnkübasyon sonrasında örnek üzerine 1 µL (200 ünite) SuperScript II RT ilave edildi ve pipet kullanılarak karıştırıldı (eğer 1µg’dan daha az miktarda RNA kullanılmış ise SuperScript II RT miktarı 0.25 µL’ye düşürülebilir. Son hacim 20 µL’ye tamamlanmalıdır).
5. 42 °C’de 50 dk inkübasyona tabi tutuldu.
6. Reaksiyon 70 °C’de 15 dk ısı işlem uygulaması sonucu durduruldu.

3.2.11 Q-PCR yöntemi ile mikrodizin çalışması için en uygun zaman dilliminin belirlenmesi

Yürüttüğümüz çalışma sırasında kurgulanan denemede amaç, mikrodizin sistemleri kullanılarak, pBAD24 plazmidine aktratılan *marT* geninin ifade düzeyinin, gelişme

ortamına arabinoz ilavesi ile değişiminin belirlenmesidir. Böylece misL regülasyonun yanı sıra, *marT* ifadesindeki artışa bağlı olarak hücrede ifade düzeyi değişen diğer genlerin belirlenmesi mümkün olacaktır.

Bu denemenin başlatılması için öncelikle MarT ve dolayısı ile misL üretiminin en uygun olduğu zaman diliminin belirlenmesi işlemi gerçekleştirildi. *marT* ve *misL* genlerine özgü primerler dizayn edildikten sonra, *marT* ve *misL* genlerinin optimum üretim zamanları tanımlandı. Primer dizileri sırası ile: *misL* ileri primer: 5' TACTCACGGCGCGAATACT3', geri primer: 5' ACGTAAATATTGGCCGATCC3'; *marT* ileri primer: 5' ATACACCACCATGCCGTCTT3', geri primer: 5' AATCGCCTGGCTTCATTATC3' kontrol olarak kullanılan *gapA* ileri primer: 5' GGAACGCCATAACCAGTCAG3', geri primer: 5' AACCCAGAAAACCGTTGAC3' olarak belirlendi. PZR karışımı son konsantrasyonu 200 ng olacak şekilde cDNA, ileri ve geri primerler ve 2X Q-PZR Supermix BioPioneer karıştırılarak hazırlandı. Reaksiyon koşulları: 95 °C'de 15 dk, 40 döngü boyunca 95 °C'de 15 sn, 55 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 30 sn olarak uygulandı. Q-PCR sonucunda elde edilen ürün miktarı hesaplanmak suretiyle mikrodizin denemelerinde kullanılacak en uygun zaman aralığı belirlendi (Tükel vd. 2007).

3.2.12 Mikrodizin denemeleri

3.2.12.1 RNA örneklerinin işaretlenmesi ve mikrodizin denemesine hazırlanması

Q-PCR çalışması sonucunda belirlenen zaman dilimlerine ait RNA örnekleri mikrodizin slaytlarına uygulamadan önce, farklı renkte ışına yapan 2 boya ile işaretlendi. Bu amaç için GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) firmasından sağlanan Cy5TM-5 dCTP (PA55021) ve Cy3TM-3 dCTP (PA53021) boyları kullanıldı. Bu boylar ışığa karşı hassas olduğu için RNA işaretlemesi işleminin karanlık bir ortamda gerçekleştirilmesine dikkat edildi. Çalışmamız sırasında, işaretlenecek RNA konsantrasyonu 30 µg olarak belirlendi ve istenilen konsantrasyondaki RNA ile işaretleme çalışmaları gerçekleştirildi. Bu denemede çalışılacak örnek çiftleri aşağıda verildiği gibi düzenlendi:

Örnek adı	İşaretlendiği boya
MZ1627 20 min	Cy3
MZ1629 20 min	Cy5
MZ1627 1s	Cy5
MZ1629 1s	Cy3

RNA örneklerinin işaretlenmesi

1. Son konsantrasyon 30 µg olacak şekilde alınan RNA örnekleri, son hacim 28-30 µL olana dek vakum santrifüj sisteminde kurutuldu.
2. RNA örneği üzerine 2 µL rastgele heksamer N₆ (2 µg/µL) eklendi ve pipet kullanılarak karıştırıldı.
3. 70 °C’de 10 dk süresince inkübe edilen örnekler daha sonra buz üzerinde soğumaya bırakıldı.
4. Taze olarak hazırlanan ana karışımdan 26 µL her bir örnek üzerine aktarıldı ve hassas bir şekilde karıştırıldı.

Ana Karışım

0.1 M DTT	6 µL
1. zincir tamponu	12 µL
1.2 µL nükleotit karışımı	1.2 µL (25 mM dATP, dTTP, dGTP/ 10mM dCTP)
Superscript II (RT)	4 µL
RNazin (RNaz inhibitör)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	0.8 µL
Toplam hacim	26 µL

5. Örnekler üzerine işaretlenecekleri boyalardan 4 µL aktarıldı ve 42 °C’de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Bu basamaktan itibaren örneklerin ışıktan korunmalarına özen gösterildi. Deneme sırasında kontrol olarak kullanılacak örnek Cy5-dCTP, deneme örneği ise Cy3-dCTP ile işaretlendi.

6. İnkübasyon süresi tamamlandığında örnekler üzerine 2 µL Superscript II aktarıldı, yavaş bir şekilde karıştırıldı ve yeniden 42 °C’de 60 dk inkübasyona tabi tutuldu.
7. Örnekler üzerine 3 µL 1M NaOH ilave edildikten sonra, 70 °C’de 10 dk tutuldu.
8. Her bir örneğe 3 µL 1M HCl ilave edilerek karıştırıldı ve örnekler temizlenene dek -80 °C’de muhafaza edildi.

İşaretlenmesi gerçekleştirilen RNA örnekleri daha sonra QIAquick PCR saflaştırma kiti izlenmek suretiyle temizlendi ve mikrodizin slaytlarına uygulanmaya hazır hale getirildi. Örnekler temizlendikten sonra hemen kullanılmayacak ise, ışık almayacak şekilde -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.12.2 Mikrodizin slaytlarının hazırlanması, hibridizasyonu ve analizi

Slaytların analiz işlemindeki basamaklar aşağıda belirtildiği sıra ile gerçekleştirilmiştir (Porwollik vd. 2004).

Ön hibridizasyon:

1. Ön hibridizasyon çözeltisi hibridizasyondan önce 42 °C’ ye kadar ısıtıldı.
2. Slaytlar % 0.1’lik SDS çözeltisinde 2 dakika yıkandı.
3. Daha sonra slaytlar 2 dakika boyunca destile suda yıkandı.
4. Slaytlar ön-hibridizasyon çözeltisine alınarak, hibridizasyon fırınında çevirilmek suretiyle, 42 °C’de 45 dakika süresince inkübe edildi.
5. Ön hibridizasyondan sonra slaytlar 2 defa 2’şer dakika süre ile destile suda yıkandı ve santrifüj işlemi uygulanarak kurutuldu.

Hibridizasyon:

Hibridizasyondan aşamasından önce, kullanılacak olan 2xhibridizasyon çözeltisi 70 °C su banyosunda ısıtıldı.

1. Daha önceden işaretlenen RNA örnekleri, hibridizasyon çözeltisi ile (40 µL işaretlenmiş prob + 40 µL 2x hibridizasyon çözeltisi) karıştırıldı.
2. Hazırlanan prob karışımı 95 °C’de 5 dk süresince inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrasında 30 sn santrifüj uygulanması ile sıvı alındı.

4. Mikrodizin slaytları Corning Hybridization çemberi içerisine yerleştirildi. Prob, pipet yardımıyla slayt üzerine aktarıldı ve üzerine cam slayt kapatıldı. Örnek mikrodizin slaytı yüzeyine aktarılırken, hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Çember kapatıldıktan sonra 42 °C 'de 1 gece inkübasyona bırakılarak hibridizasyon gerçekleştirildi.

Hibridizasyon sonrası yıkama:

1. Hibridizasyon çemberi, cam slayt yüzeyi üstte kalacak şekilde söküldü.
2. Mikrodizin slaytı 2X SSC, % 0.1 SDS içerisinde 42 °C'de 5 dk süresince çalkalanarak yıkandı.
3. Verinin bulunduğu kenarlara dokunulmamasına dikkat edilerek, slayt 0.1XSSC, % 0.1 SDS çözeltisine transfer edildi ve oda sıcaklığında 10 dk süresince çalkalandı.
4. Mikrodizin slaytı, oda sıcaklığındaki 0.1XSSC çözeltisinde 1 dk süresince çalkalamak suretiyle yıkandı ve bu basamak 4 kez tekrarlandı.
5. Son olarak 10 sn süresince destile su ile yıkanan slayt, vakumlu santrifüj uygulaması ile kurutuldu ve lazer ışığı altında taranmaya hazır hale geldi.

Ön hibridizasyon ve hibridizasyon sırasında kullanılan çözeltiler

2XSSC / % 0.1 SDS, kullanılmadan önce 42 °C' ye ısıtılmalıdır	
20x SSC	100 mL
% 10 SDS	10 mL
dH2O	890 mL
Toplam	1000 mL

0.1x SSC / % 0.1 SDS	
20x SSC	5 mL
% 10 SDS	10 mL
dH2O	985 mL
Toplam	1000 mL

0.1x SSC	
20x SSC	5 mL
dH2O	995 mL
Toplam	1000 mL

% 0.1 SDS	
% 10 SDS	10 mL
dH2O	990 mL
Toplam	1000 mL

20x SSC (1 litre çözelti için)

175.3g NaCl
88.2g Sodyum sitrat
800 mL distile su içerisinde çözülerek pH 7.02 ayarlandı. Bu çözelti ön-hibridizasyon çözeltisi için stok olarak kullanıldı

10x SDS çözeltisi

50 g SDS
500 mL distile su
Bu çözelti ön hibridizasyon çözeltisi için stok olarak kullanıldı

Ön hibridizasyon çözeltisi

Form amid	25 mL
20x SSC	25 mL
% 10 SDS	1 mL
BSA (0.01g) (BSA- Albumin Bovine)	10mg
ddH ₂ O	49mL

2X Hibridizasyon tamponu

% 50 Form amid	500 µL
10x SSC	500 µL
%0.2 SDS	20 µL

Mikrodizin slaytları ScanArray™ Express (Packard Bioscience, Meridien, USA) cihazı kullanılarak, 633 nm ve 543 nm lazer ışıkları altında tarandı. Elde edilen ışımaya sonuçları, QantArray Version 3.0 programı kullanılarak analiz edildi. Denemede kullanılan örnek çiftleri için mikrodizin denemesi 3 kez tekrarlandı ve elde edilen verilerin ortalaması alınmak sureti ile sonuçlar değerlendirildi.

3.2.13 Fibronektinin fragmentasyonu

Sığır fibronektininin (FN) sınırlı proteolizi Sekiguchi ve Hakomori (1980) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. 0.1 mL sığır FN (1 mg/mL) (Sigma Chem. Co. USA), 0.005 mL termolizin (0.1 mg/mL) (Sigma Chem. Co. USA) ile muamele edildi ve oda sıcaklığında 4 saat tutuldu. Son konsantrasyonda 1 mM olacak şekilde EDTA ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Enzimatik kesime uğratılan FN (0.004 mg/kuyu) SDS-PAGE sisteminde tanımlandı. Örnekler hem Coomassie brilliant blue ile boyanarak görüntülendi ve hem de Immobilon-P (PVDF) membrana aktarılarak Western lekeleme işlemine tabi tutuldu. Membran 1 saat blok tamponunda oda

sıcaklığında bekletildikten sonra 70 nM GST-MisL ya da 70 nM GST (blok tamponda hazırlanmış) ile oda sıcaklığında 90 dk muamele edildi.

Membran PBS'de (pH 7.4) yıkandıktan sonra, bağlanan GST-MisL ya da GST 1/1000 keçi anti-GST primer antibadi (Sigma Chem Co. USA) ve monoklonal anti-keçi IgG alkali fosfataz ikincil antibadi ile işaretlenerek tanımlandı (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.2.14 Glutation S-transferaz (GST) füzyon proteinlerinin saflaştırılması

Karbenisilin (% 0.1) içeren 2 L LB ortamı 50 mL *E. coli*/pGEX4T-2 ile inoküle edilerek OD₆₀₀ = 0.6 düzeyine ulaşıncaya dek 37 °C'de inkübasyona tabi tutuldu. Yaklaşık 3-4 saat sonra kültür ortamına 1 mL (1M) IPTG (izoprapil-β-D-tiogalaktozit, Ambion Inc., Austin, TX, USA) aktarılarak, inkübasyona 3 saat daha devam edildi. İndüksiyon öncesi toplam protein lizatları IPTG ilave edilmeyen hücre kültürlerinden yapıldı. İndüksiyon sonrasında hücreler 7,000 rpm de 20 dakika (4 °C) santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltisi buzda soğutulan ve proteaz inhibitörü içeren 10 mL PBS'de çözüldü. Bu hücreler French Press'de (French Press, Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA) 12,000 psi basınçta 3 kez muamele edildi ve 15,000 rpm'de (4 °C) 45 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

Saflaştırma işleminin bir sonraki basamağında glutatyon sefaroze hazırlanmış bilyeler hazırlandı. Yavaş bir şekilde karıştırılan % 75 glutatyon sefaroze (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA) 1.5 mL alınarak, 50 mL lik falkon tüpe aktarıldı. Bu ortam 1800 rpm'de 8 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu ve üst sıvı ortamdaki yavaşça aspire edildi. Sefaroz bilyeler 20 mL buzda soğutularak PBS içerisinde çözüldü ve bir önceki santrifüj işlemi tekrar edildi. Oluşan üst sıvı aspire edildikten sonra, sefaroze bilyeler 2 mL PBS içerisinde çözüldü. Bu ortam üzerine French press'e tabi tutularak hazırlanan hücreler ilave edildi ve 4 °C'de 30 dakika süreyle yavaş bir şekilde karıştırıldı. Füzyon proteininin geri kazanımı için, Qiagen kolonlara yüklenen ortamın süzülmesi beklendi. Kolon matriksi buzda soğutulan 10 mL PBS ile 4 kez yıkandıktan sonra 1 mL glutatyon geri kazanma tamponu (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA) ile

muamele edildi ve oda sıcaklığına 10 dk tutuldu. Bu aşama 5 kez tekrar edilerek füzyon proteini saflaştırıldı (Dorsey vd. 2005).

3.2.15 Histidin işaretli füzyon proteinlerinin saflaştırılması

Karbenisilin (% 0.1) içeren 1 L LB broth üzerine 50 mL *E. coli*/ pET101/D aktif kültürü ilave edilerek 37 °C'de OD₆₀₀= 0.6 oluncaya dek geliştirildi (yaklaşık 3-4 saat). Bu kültürden 1 mL alındıktan sonra, 1 mL (1M) IPTG ilave edilerek 3 saat daha aynı koşullarda inkübasyona devam edildi. Toplam hücre protein lizatları indüksiyon öncesi ve sonrası alınan örneklerde oluşturuldu. Ana kültürler 7,000 rpm de 20 dakika (4 °C) santrifüj edilerek çöktürüldü ve çökelti 8 mL liziz tamponunda çözüldü (50 nM NaH₂PO₄, 300 nM NaCl, 10 nM İmidazol). Üzerine 1 mg/mL olacak şekilde lizozim ilave edildi ve buzda 30 dk tutuldu. Bu çözeltiye sonikasyon, 200-300 W/10 sn koşullarında altı kez uygulandı (Branson Cleaning Equipment Company, Shelton, Connecticut, USA). Daha sonra lizat 15,000 rpm'de 45 dk (4 °C) santrifüj edildi. Üst sıvıya % 50 NiNTA bilye (1 mL/5 mL; Qiagen, Valencia, CA, USA) ilave edilerek 4 °C'de 60 dk karıştırıldı. Kolonlara yüklenerek bu sıvının kolondan akması sağlandı. Buzda soğutulan 4 mL yıkama tamponu (50 nM NaH₂PO₄, 300 nM NaCl, 20 nM İmidazol, Qiagen, Valencia, CA, USA) ile bu ortam 2 kez yıkandı ve 0.5 mL geri kazanma tamponu (50nM NaH₂PO₄, 300nM NaCl, 250nM İmidazol; Qiagen, Valencia, CA, USA) ile muamele edilerek işlem tamamlandı (Chessa vd. 2008b).

3.2.16 Katı faz bağlanma deneyi

96 kuyucuklu plakalar (Maxisorb, Nunc, eBioscience, Inc. San Diego, CA, USA) 0.05 mL sığır plazma fibronektini (FN) (Sigma Chem. Co. USA) ile kaplandı ve diğer proteinlerle (100 mM Tris.HCl, pH 8 içerisinde hazırlanmış) muamele edilerek 4 °C'de 12 saat inkübe edildi. İlave bağlanma bölgeleri kuyu başına 0.2 mL blok tampon (% 3 w/v yağsız süt, % 0.02 v/v Tween 20+PBS, pH 7.4) ilave edilerek bloke edildi. Blok tampon 1 saat sonra ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyular dH₂O ile 3 kez yıkandı. Test ligandı (0.05 mL PBS, pH 7.4 içerisinde hazırlanmış) inhibitör varlığında ve yokluğunda ortama ilave edildi ve oda sıcaklığında 90 dk tutuldu. Kuyular destile su ile

3 kez yıkandıktan sonra, GST ya da GST- MisL primer antibadisi olarak 1/1000 oranında seyreltilen keçi anti-GST antiserumu (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA), sekonder antibadisi olarak ise 1/5000 oranında seyreltilmiş monoklonal anti-keçi IgG alkali fosfataz konjugantı (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA) kullanıldı. Her bir kuyucuktaki alkali fosfataz aktivitesi (Sigma Chem. Co. USA) 1 mg/mL PNPP (P-nitrofenil fosfat; 100 mM glisin, 2 mM MgCl₂ ve 1 mM ZnCl₂ , Sigma Chem. Co. USA) ilavesi ile tanımlandı. Ürünün birikimi, Biorad Microplate Reader Model 68 (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) kullanılarak 410 absorbansta izlendi (Salonen vd. 1984).

3.2.17 Birlikte çöktürme deneyi

S. Typhimurium FB4 ve FB5 suşları, misL proteininin üretiminin indüksiyonu için % 0.02 L-arabinoz varlığında 3 saat geliştirildi. Bu süre sonunda santrifüj edilerek çöktürülen hücreler PBS içerisinde hazırlanan % 1'lik kazein blok çözeltisi ile muamele edildi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Her bir kültür, blok tamponunda fibronektin (0.05 mg, Sigma Chem. Co. USA) ya da saflaştırılan GST-Hep-2 bölgesi (0.05 mg) ile muamele edildi ve hücreler santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürüldü. Hücre çökeltisi PBS ile 5 kez yıkandı. Hücrelerin, GST-Hep-2 proteinlerini çözeltide bağlayıp çöktürdüğünü belirlemek için, toplam hücre lizatları SDS-PAGE sistemlerinde ayrıldı ve anti fibronektin ya da anti-GST (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA) antiserumlar kullanılmak suretiyle Western lekeleme analizlerine tabi tutuldu (Liao vd. 2009).

3.2.18 Fibronektinin deglikolizasyonu

Denemede GlycoProfile™II enzimatik N-Deglikolizasyon kiti (Sigma Chem. Co. USA) kullanıldı. Peptit N-glikolidaz F (PNGazF, Sigma Chem. Co. USA) N-bağlı glikanların glikoproteinlerden uzaklaştırılması amacı ile kullanıldı. Bu denemede bağlanma bölgesindeki asparajinin, aspartik aside deaminasyonu esas alınmaktadır. 90 µL fibronektin ya da RNaz B (Sigma Chem. Co. USA) standardına (1.1 mg/mL) % 2 oktil β-D-glukopironidaz ve 100 mM 2-merkaptoetanol içeren çözeltiden 5 µL aktarıldı ve

100° C de 10 dakika tutuldu. Karışım oda sıcaklığında soğutuldu ve üzerine 5 µL 1X reaksiyon tamponu aktarıldı. Deglikolizasyon etkinliği SDS-PAGE sistemlerinde kontrol edildi (Zheng vd. 1994).

3.2.19 Konjugasyon

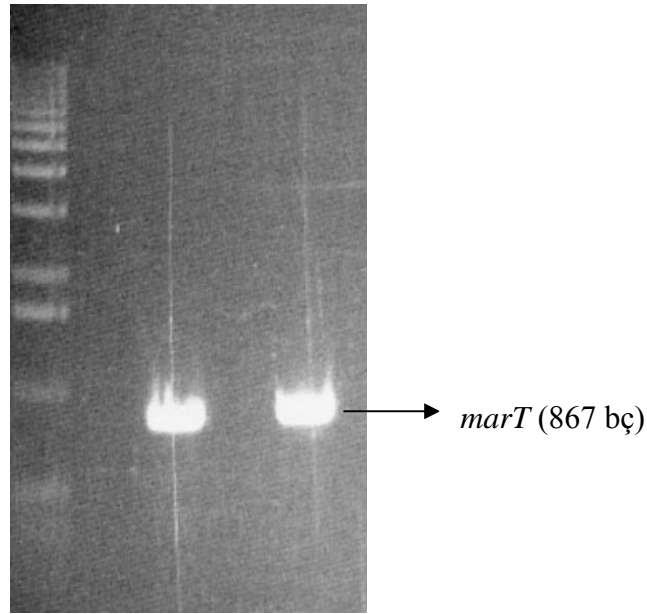
Konjugasyon denemeleri için seçilen verici ve alıcı suş kültürleri, LB broth ortamında hazırlandı. Konjugal eşleştirme için geç eksponensiyel fazdaki kültürler (37 °C’de 6-8 saat 200 rpm de karıştırılarak inkübe edilmek suretiyle üretildi) kullanıldı. Mikrosantrifüj tüplerine 1 mL olarak alınan kültürler, 13000 rpm de 30 sn santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen hücreler, 1 mL 10 mM MgSO₄ içerisinde çözüldü. Her bir suş için alınan 0.5 mL hacimler karıştırıldı ve 13000 rpm de 30 sn santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre karışımı çökeltisi daha sonra 0.45 µm çapındaki membran filtreye emdirildi (Millipore Co. Billerica, MA, USA). Bu işlemi takiben filtreler LB agar ortamı üzerine yerleştirildi ve 37 °C’de 4 saat inkübe edildi. Eşleştirme denemelerinden sonra bakteri karışımı 1 mL 10 mM MgSO₄ içerisinde çözüldü, PBS içerisinde seri dilüsyonları hazırlandı ve özel antibiyotikleri içeren seçici LB agar ortamlarına ekildi. Yalnız verici ve alıcı suşların ekildiği LB ortamları ise şahit olarak kullanıldı. 37 °C’de 12 saat inkübasyondan sonra koloni sayımları yapılarak, verici hücre başına konjugasyon sıklığı saptandı (Sanderson ve Roth 1983, Camacho ve Casadesus 2002).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 MisL Ototransporter Proteininin Üretimini Teşviki

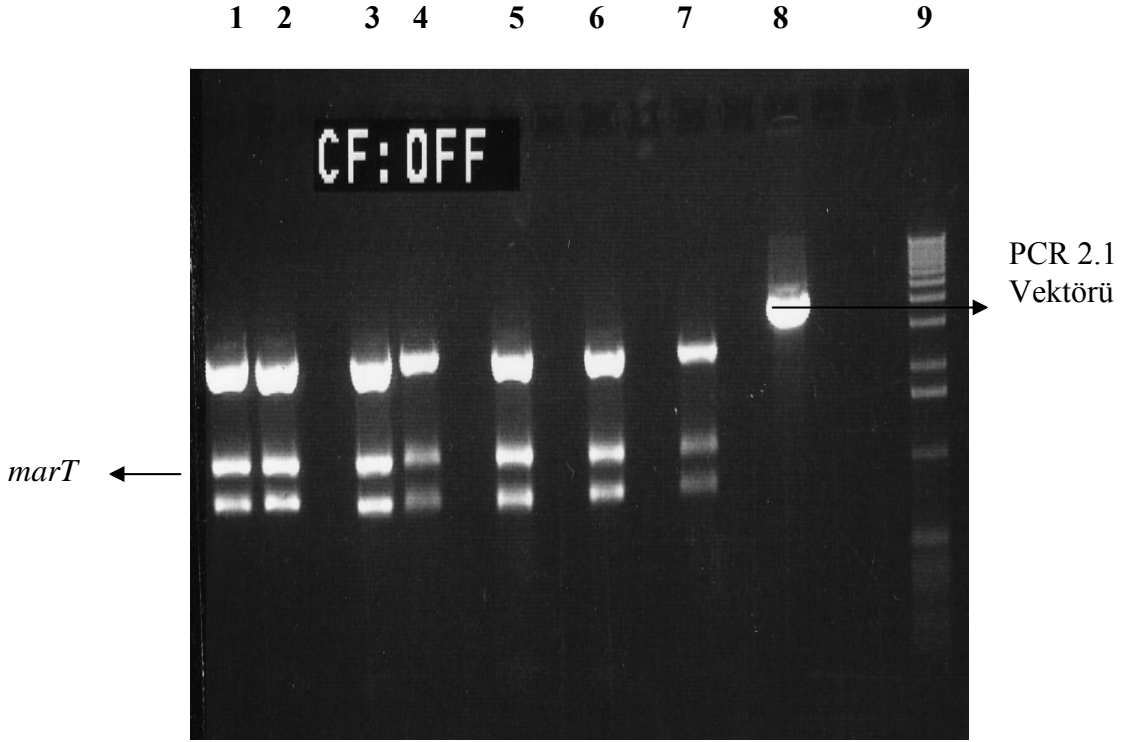
MisL ototransporter proteininin üretimini teşviki çalışmaları, pozitif regülatör *marT* geninin arabinoz varlığında indüklenen bir promotor içeren pBAD/gIII A vektörüne klonlanması ve *Salmonella* Typhimurium MA2 (Tükel vd. 2007) suşuna aktarılması yolu ile gerçekleştirilmiştir.

İlk aşamada *marT* genine özgü dizayn edilen primerler (*marT* geni için ileri primer: 5' GGAGCTCCGGGGACAATCCATGTCCTGCTACG 3'; *SacI* kesim bölgesi, ribozom bağlanma bölgesi ve kendi stop kodonunu içeriyor; *marT* geni için geri primer: 5' GCTGCAGTACCCATGTGTCACCCCGCGG 3', *PstI* kesim bölgesi içeriyor) kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünü (*marT* yapısal geni, 867 baz çifti) elde edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *marT* geni PZR ürünü

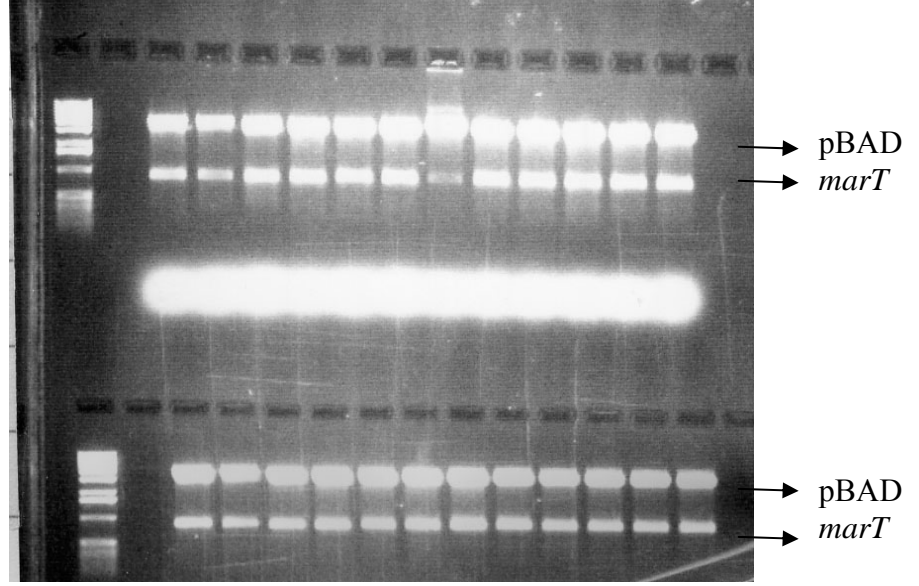
İkinci aşamada çoğaltılan gen ürünü, stabilizasyonunun sağlanması amacıyla PCR 2.1 vektörüne klonlanarak, *Escherichia coli* DH5a suşuna elektroporasyon yolu ile aktarılmıştır. Transformantlar, PCR 2.1 vektörünün içerdiği kanamisin dirençlilik (Km^r , 100 $\mu\text{g/ml}$) esas alınarak tanımlanmıştır. Bu transformantlardan izole edilen PCR 2.1 vektöründe *marT* geni varlığı, *Pst*I ve *Sac*I ikili restriksiyon endonükleaz kesimleri ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.2). Tüm klonlarda söz konusu kesimler sonucunda 858 bp insertin tanımlanması ile klonların doğruluğu saptanmıştır.



Şekil 4.2 PCR 2.1 Vektörüne *marT* geni insersiyonunun kontrolü

Son aşamada jelden geri kazanılan *marT* geni, *Pst*I ve *Sac*I ile kesilen pBAD/gIII A vektörüne, arabinoz promotörü klonlama bölgesinden bağlanmış (Şekil 4.3) ve kimyasal transformasyon yolu ile *S. Typhimurium* LT2 suşuna aktarılmıştır. Transformantların seçiminde pBAD vektörünün içerdiği amfisilin dirençlilik (Amp^r , 100 $\mu\text{g/ml}$) özelliğinden yararlanılmıştır. Transformantlarda *marT* geni içeren pBAD/gIII A

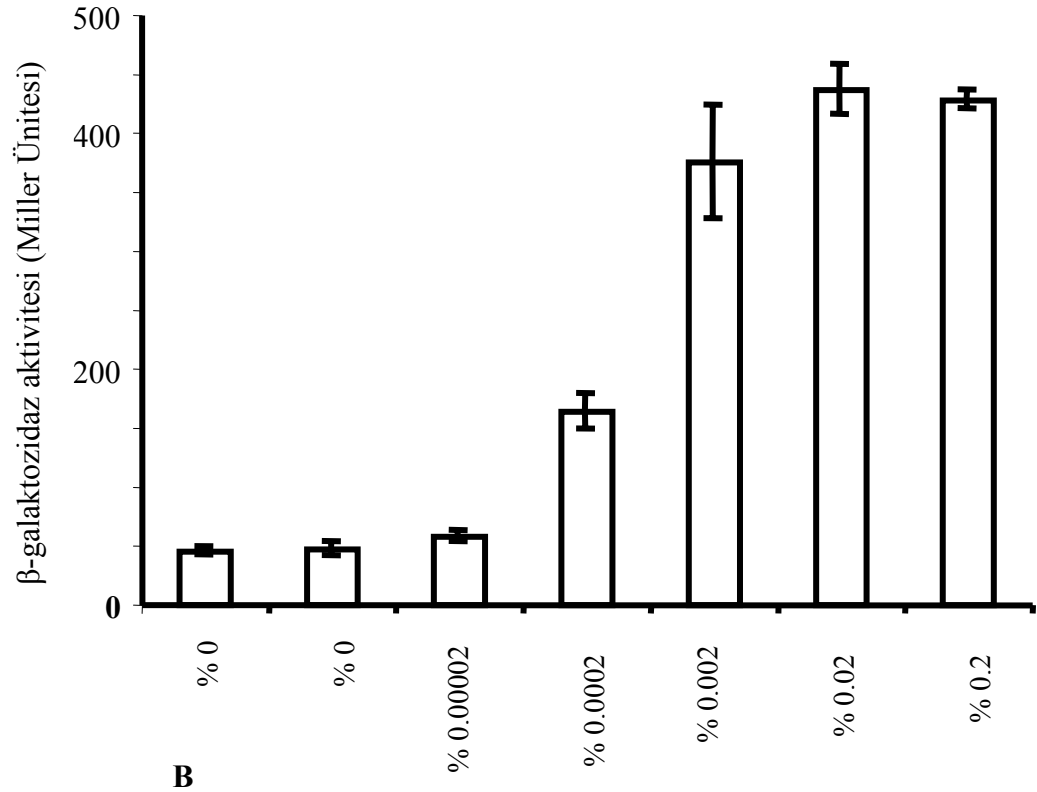
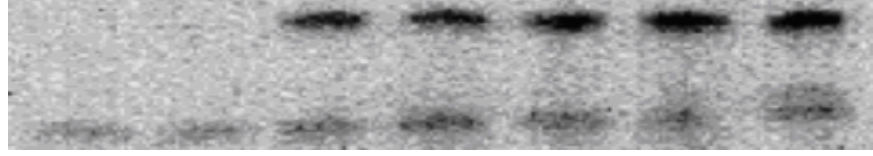
vektörü, söz konusu plazmidin izolasyonu ve *Pst*I ve *Sac*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Transformantlarda *marT* geni içeren pBAD/gIII vektörü varlığının *Pst*I ve *Sac*I enzim kesimi ile kontrolü

pBAD/gIII vektörü aktarılan *S. Typhimurium* NA23 (MA2 transformantı) suşunda yürütülen indüksiyon çalışmaları sonucunda; β -galaktozidaz aktivitesinin, üreme ortamında % 0.0002 arabinoz varlığında, indüksiyon yapılmayan koşullardan farklanmaya başladığı ve % 0.02 arabinoz varlığında 460 Miller ünitesine ulaştığı saptanmıştır. Arabinoz bulunmayan ortamda geliştirilen *S. Typhimurium* NA23 suşunda ise bu düzey 40 Miller ünitesi düzeyinde bulunmuştur (Şekil 4.4.B). Bu suşta aynı arabinoz konsantrasyonunda yürütülen indüksiyon çalışmaları sonucunda ise, Western lekeleme tekniği ile tespit edilebilen MisL proteini üretiminin % 0.000002 arabinoz varlığında başladığı ve arabinoz konsantrasyonu varlığına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.4.a).

A



Arabinox Konsantrasyonu (%)

Şekil 4.4.a. *LacZYA::misL* Füzyonu içeren *S. Typhimurium* NA23 suşunda arabinox konsantrasyonuna bağlı MisL üretimi, b. β-galaktozidaz aktivite artışı

MisL-*lac* transkripsiyonel füzyonu ile yürütülen çalışmalar, söz konusu proteinin *S. Typhimurium*'da in vitro koşullarda üretilmediğini göstermiştir. Bununla birlikte *S. Typhimurium*'un makrofajlara girişi aşamasında, bu proteinin üretildiği Western lekeleme yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır (Blanc-Potard vd. 1999, Eriksson vd. 2003). Bu özelliği, *S. Typhimurium*'un patojenitesinin ilk aşamasında önemli bir rol

oynayan MisL ototransporter proteininin in vivo ve in vitro fonksiyonel analizini güçleştiren ana unsurdur. Bu güçlüğün aşılması amacı ile değişik araştırmacılar, MisL yapısal geninin değişik pBAD vektörlerine klonlanmasını ve arabinoz tarafından indüklenen bir promotora bağlı olarak teşvikini gerçekleştirmiştir (Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007). Özellikle MisL ototransporter proteininin pozitif regülatörü olan *marT* geninin tanımlanmasından sonra, in vitro koşullarda MisL üretiminde temel yaklaşım; yapısal gen kopyalarının artırılması suretiyle bu proteininin üretimi yerine, aktif regülatör proteinin konakçı sistemde ifadesi yönünde değişme göstermiştir. Bunun temel nedeni, yapısal genin ilave kopyalarının özellikle stabilite sorunu yaratması ve ayrıca çoğu durumda klonlama stratejisinden kaynaklanan inaktif protein üretimidir (Srivatsan vd. 2008). Bakteriyel fizyoloji çalışmalarında genellikle klonlanacak bir genin indüklenebilir bir promotordan transkripsiyonu esas alınmaktadır. Yapısal genlerin bu indüklenebilir promotorlar altında klonlanmasında, söz konusu gen kopyalarının kromozomal DNA üzerinde bulunması halinde tercih edilen yol, kromozomal DNA üzerindeki gen ya da ilave kopyaların inaktivasyonu, hatta delesyonudur. Zira kısmi olarak baskılanmış genlerde düşük düzeyde ifade, indüklenebilir promotor altında çalıştırılan aynı genin klonlanan kopyasının ifadesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Guzman vd. 1995, Srivatsan vd. 2008). MisL ototransporter proteininin *marT* geni tarafından gerçekleştirilen pozitif regülasyon kinetikleri, regülatörün bulunmadığı koşullarda böylesi düşük düzeyde gen ifadesinin gerçekleşebileceğine işaret etmektedir (Tükel vd. 2007, Retamal vd. 2010). Tüm bu veriler ışığında, *misL* geninin homolog konakçıda ifade edilmesi ve saflaştırılarak biyolojik fonksiyonlarının tanımlanması için en etkin yol olarak, *marT* regülatör geninin arabinoz tarafından indüklenen bir promotor içeren pBAD/gIII A vektörüne aktarıldıktan sonra doğal *S. Typhimurium* suşlarına transformasyonu ve bu sayede homolog *misL* geninin aktivasyonu stratejisi seçilmiştir. pBAD vektörlerinde bulunan ve arabinoz tarafından indüklenen promotor, hem pozitif ve hem de negatif bir regülatör olan AraC proteini tarafından kontrol edilmektedir. Arabinoz varlığında promotor aktive edilmekte, arabinoz yokluğunda ise promotordan transkripsiyon çok düşük düzeyde gerçekleşmektedir. Promotor etkinliğinde kritik değer, indüksiyonda kullanılan arabinozun konsantrasyonudur. Çalışmalarımız sonucunda, % 0.02 arabinoz varlığında sağlanan yüksek MisL üretim düzeyi, füzyon protein üretimi için literatür verilerinde

tanımlanan ideal konsantrasyon sınırları içerisinde (Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007, Retamal vd. 2010).

MisL ototransporter proteininin pozitif regülatörü olan *marT* geninin ifadesinin indüksiyonu ile MisL üretiminin teşviki, doğrudan yapısal genin klonlanması söz konusu olmadığından, homolog konakçı sistemlerde fonksiyonel analiz çalışmalarında büyük önem taşımaktadır.

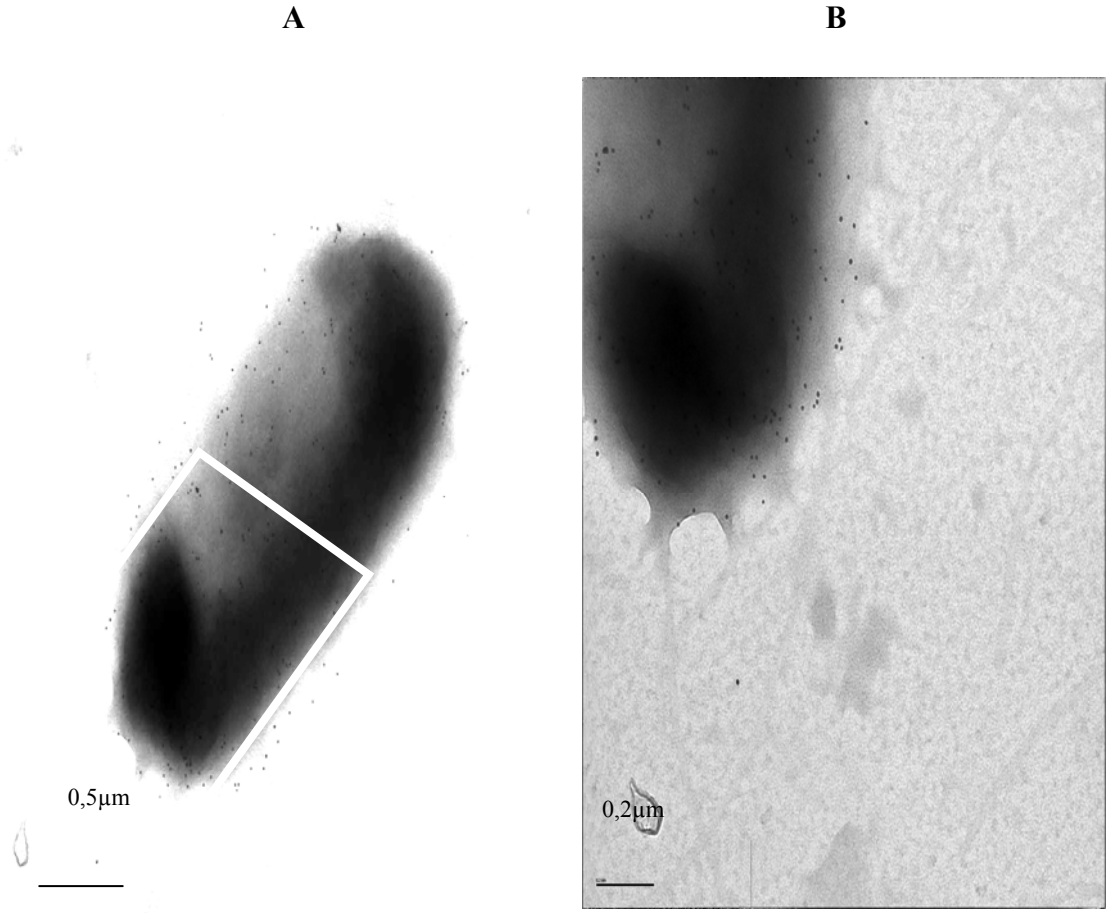
4.2 MisL Ototransporter Proteininin Hücresel Lokasyonunun Tanımlanması

Bu araştırmada, MisL antiserumu ile gerçekleştirilen immün elektron mikroskopi çalışmaları sonucunda MisL ototransporter proteininin, *S. Typhimurium* NA23 transformantında ancak arabinoz varlığında üretildiği ve hücre dışı yüzeyinde lokalize olduğu (Şekil 4.5) saptanmıştır. Arabinoz indüksiyonu yapılmayan, ancak diğer tüm koşulları aynı olan *S. Typhimurium* NA23 hücrelerinde ise misL proteininin üretilmediği belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu bulgu MisL proteininin in vitro koşullarda üretilmediğinin ilk kesin kanıtını oluşturmaktadır. Zira daha önce yürütülen çalışmalarda *MisL:lacZYA* füzyonu gerçekleştirilen rekombinantlarda ya β -galaktozidaz aktivitelerine bakılarak ya da Western lekeleme yöntemi kullanılarak MisL üretimi kontrol edilmiştir (Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular da MisL proteininin in vitro koşullarda üretilmediğine işaret etmiştir. Ancak söz konusu çalışmalarda füzyon proteinlerin kullanımı nedeni ile, rekombinasyonun doğasından kaynaklanacak β -galaktozidaz enzim aktivitesi değişiklikleri ya da yine MisL antibadilerinin füzyon proteinleri ile düşük düzeyde özgüllük taşıyan bağlanma karakteristikleri, bu bulguların kesinlik kazanmasını engelleyen ana unsurlardır.

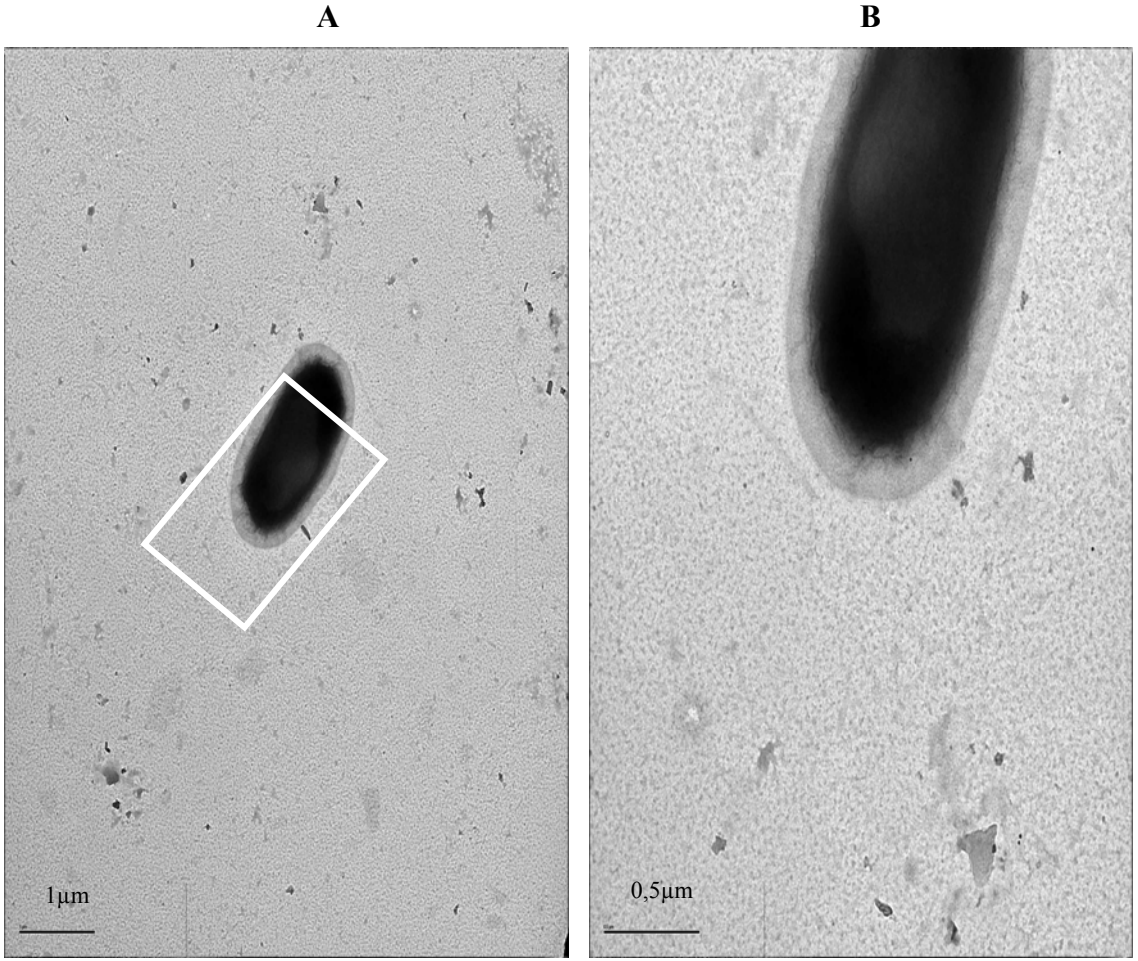
İmmün elektron mikroskopi görüntüleri, misL proteininin, dış yüzeye salgılanan kapsüler polisakkaritlerin üzerinde biriktiğine ve hücreye düzensiz dallanan bir dış yapı özelliği kazandırdığına işaret etmektedir. *Salmonella* cinsi dışındaki bakteriler tarafından üretilen adhezif özellikteki ototransporter proteinler ile yürütülen çalışmalarda, söz konusu proteinlerin özellikle iç yolcu domaininin hücre dışı yüzeyinde lokalize olduğu ve bu sayede konakçı epiteline hücreler arası bağlanma materyali ile

ilişkilenererek (fibronektin ya da kollajen) tutunduğu saptanmıştır. MisL üzerinde yürütülen tek bağlanma çalışmasında ise, söz konusu proteinin sadece fibronektine özgül bir bağlanma gösterdiği in vitro koşullarda örneklenmiştir. Bu çalışmada cam slaytlara bağlanan saf fibronektin kullanılmıştır. Aynı koşullarda kollajenin kullanılması durumunda ise özgül bağlanma aktivitesi tanımlanmamıştır (Henderson ve Nataro 2001, Oomen vd. 2004, Dorsey vd. 2005, Santos vd. 2009).

Bu çalışmada elde edilen immün elektron mikroskopi bulguları, yukarıda özetlenen literatür verileri ile birleştirildiğinde; MisL proteininin sadece konakçı epitel hücrelerine protein-protein interaksyonu ile bağlanmadığı, *S. Typhimurium* dış yüzeyine lokalize olmada ise karbonhidrat-protein interaksyonlarını kullandığına işaret etmektedir. Bu özelliği ile MisL, tamamen hücre dışına salgılanan bazı ototransporter proteinlerden ayrılmaktadır. MisL'in de içinde bulunduğu AIDA ailesi ototransporterlerde, iç yolcu domaininin, hücre dış yüzeyi ve duvar yapıları ile ilişkilenmede bir çapa görevi gördüğü belirlenmiştir. Ancak söz konusu interaksyonların doğası bugüne kadar tanımlanmamıştır (Henderson vd. 2004, Shultis vd. 2006, Scaria vd. 2008, Dieye vd. 2009). *Salmonella* ototransporter proteini MisL'in kapsüler polisakkaritler yanında, olası hücre duvarı protein-karbonhidrat interaksyonlarının doğasının tanımlanması, bu interaksyonun kontrolü ile *S. Typhimurium* virülanslığının azaltılması açısından kritik bir önem taşımaktadır.



Şekil 4.5.a. % 0.02 Arabinoz varlığında indüklenen *S. Typhimurium* NA23 transformantında MisL proteini lokalizasyonunun immün elektronmikroskopik görüntüsü, b. bu bölgenin büyütülmüş hali (27500X)

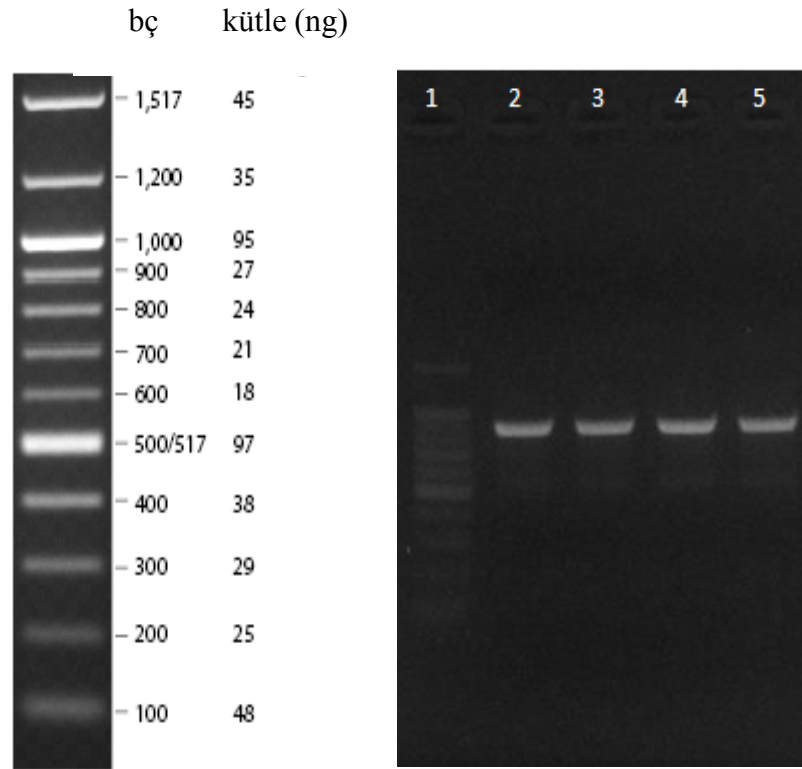


Şekil 4.6.a. Arabinoz indüksiyonu yapılmayan *S. Typhimurium* NA23 transformantının immün elektronmikroskopik görüntüsü, b. işaretli bölgenin büyütülmüş hali (27500X)

4.3 MisL Ototransporter Proteininin Regülasyon Karakteristiklerinin Tanımlanması

MisL ototransporter proteininin pozitif regülatörü olan *marT* gen ürününün (Tükel vd. 2007) *misL* ototransporter proteini üzerindeki ifade etkinliğinin ve diğer regülasyon karakteristiklerinin araştırılması için, *marT* geninin *S. Typhimurium* 14028 suşunda arabinoz varlığında indüklenen bir promotora sahip olan pBAD24 vektörü aracılığı ile ifadesi sağlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle 18 saatlik aktif *S. Typhimurium* 14028 suşundan bakteriyel genomik DNA kiti (NA2120, Sigma, Che. Co. USA) kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen genomik DNA örneğinden

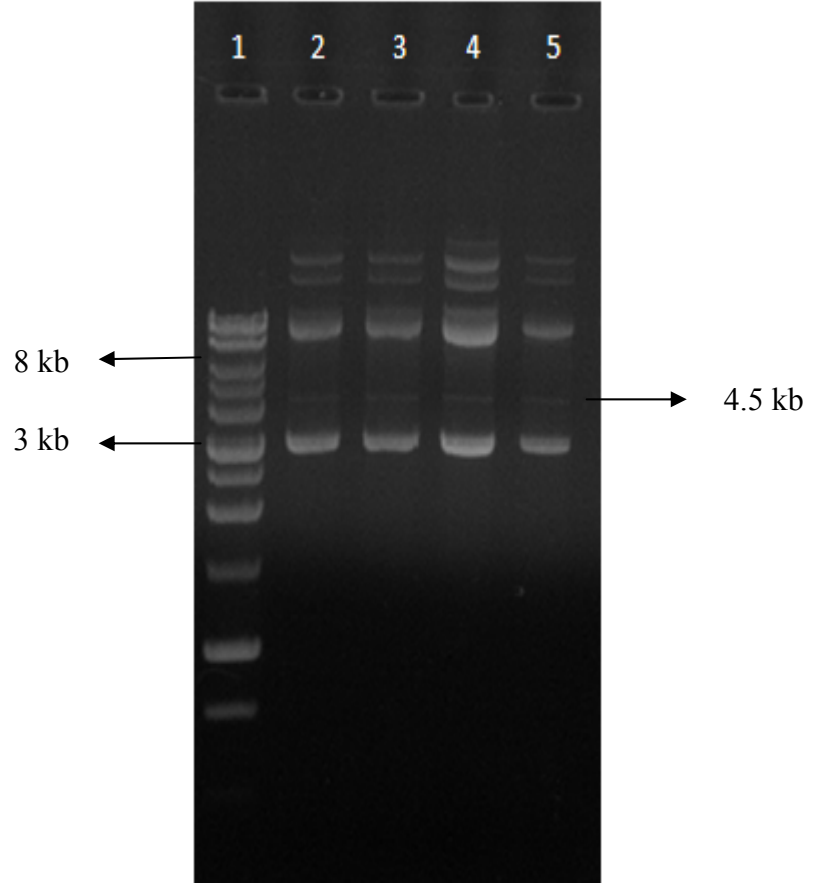
marT geni (STM3759, 858 bç) ileri primer: 5' ACGATTCACCATGTCCTGCTACGCAG 3' (*EcoRI* restriksiyon enzimi kesim bölgesi), geri primer: 5' ATCTGCAGTTACCCATGTGTCACCCC 3' (*PstI* restiriksiyon enzimi kesim bölgesi) primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır (Şekil 4.7). İstenilen genin çoğaltılması için kullanılacak primerler tasarlanırken, primerlere restriksiyon endonükleaz enzimi tanıma serileri eklenmiştir.



Şekil 4.7 *S. Typhimurium* ATCC14028 suşu genomik DNA'sından çoğaltılan *marT* geni

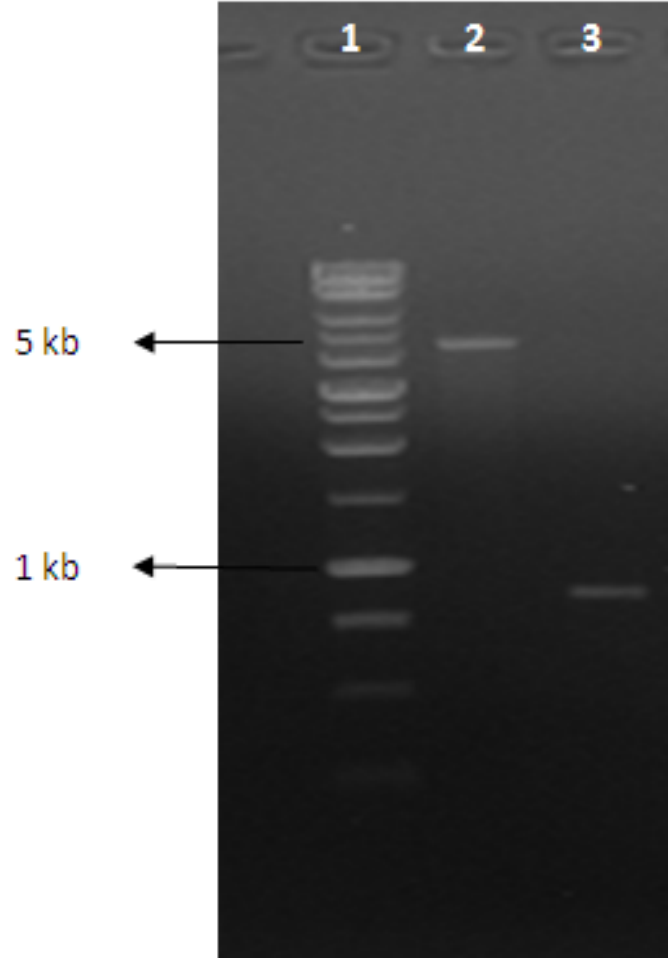
Kuyu1: 100 bç moleküler marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 bç, New England BioLabs), Kuyu 2-5: PZR ürünleri

Uygun primerler kullanılarak çoğaltılan *marT* geni (858 bç) QIAquick PCR saflaştırma kiti (Qiagen, USA) ile temizlenmiş ve pBAD24 vektörüne aktarılmadan önce hem pBAD24 vektörü hem de *marT* geni *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile ikili kesime tabi tutulmuştur (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8 pBAD24 plazmid vektörünün % 0.8 oranında agaroz içeren jeldeki görüntüsü

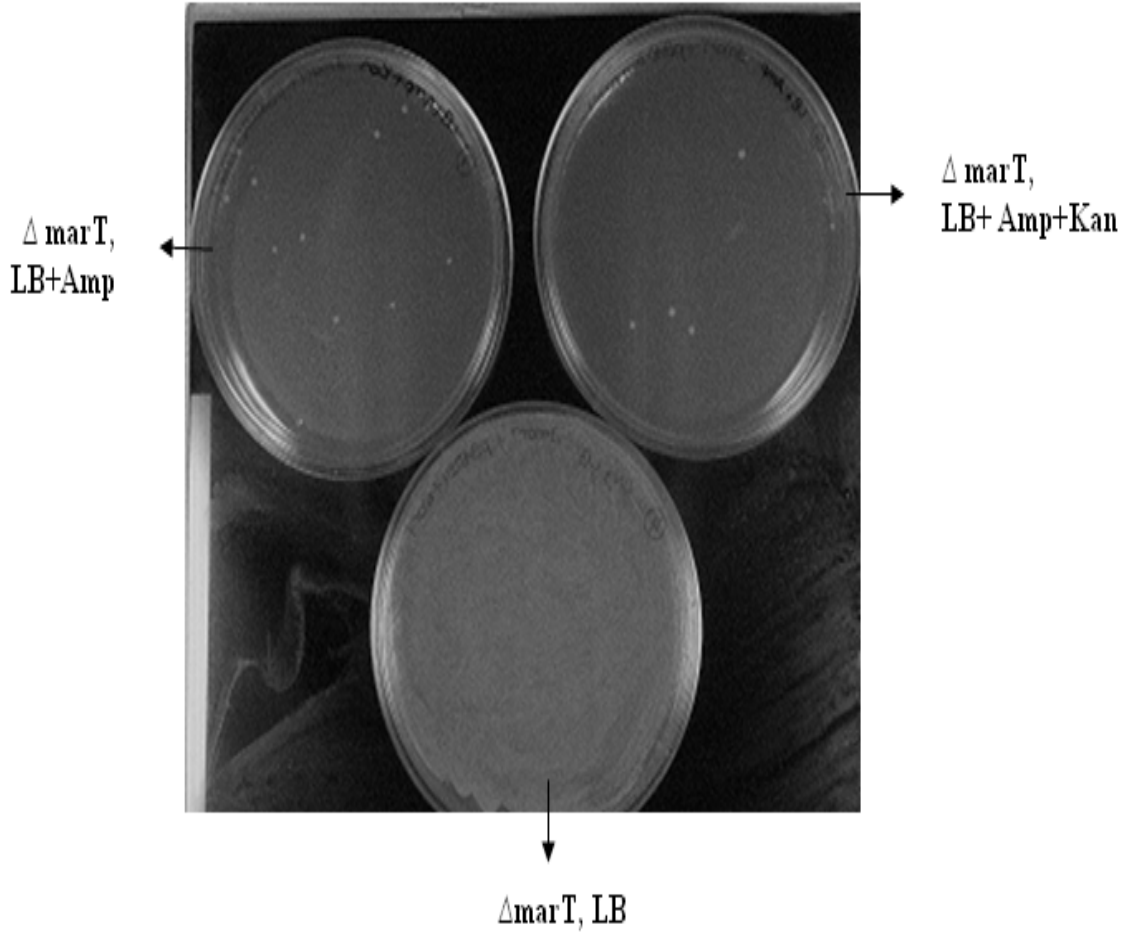
Kuyu 1: 1 kb DNA marker, Kuyu 2-5: pBAD24 plazmid DNA örnekleri



Şekil 4.9 pBAD24 plazmid vektörü ve *marT* geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesimi sonrası agaroz jel görüntüleri.

Kuyu 1: 1 kb DNA marker, Kuyu 2: pBAD24 vektörünün *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesimi, Kuyu 3: *marT* geninin *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesimi

Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi gerçekleştirilen ve kesimin doğru şekilde meydana geldiği agaroz jel elektroforezi ile belirlenen plazmid DNA örneklerinde, bir sonraki basamakta defosforilasyon reaksiyonu gerçekleştirilerek plazmid vektörünün 5' fosfat grubu uzaklaştırılmış ve ligasyon etkinliğinin artırılması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra, defosforile pBAD24 plazmidini ile *marT* geninin ligasyonu ve ardından kompetent *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve *S. Typhimurium* 14028 $\Delta marT$ suşlarına transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10).

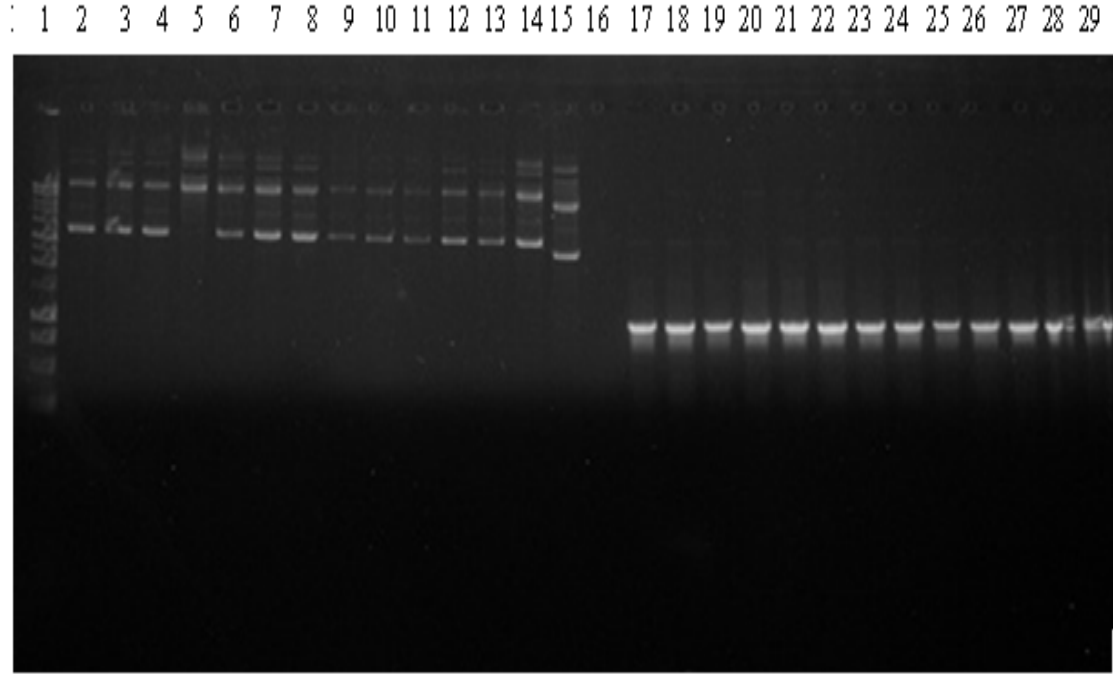


Şekil 4.10 *S. Typhimurium* 14028 suşuna ($\Delta marT$) pNA01 (*marT* geninin aktarıldığı pBAD24 vektörü) plazmidinin transformasyonu sonucu oluşan transformantların antibiyotik içeren LB agar ortamlarında gelişimi

pBAD24 plazmidinin içerdiği ampisilin ve *S. Typhimurium* 14028 $\Delta marT$ suşunun içerdiği kanamisin dirençlilik özelliklerine göre seçilen transformantlarda hedef *marT* genini taşıyan plazmidlerin varlığı, moleküler büyüklükleri esas alınarak doğrulanmıştır (Şekil 4.11).

marT geninin aktarımının gerçekleştirildiği pBAD24 plazmid DNA örneklerinde *marT* geninin varlığı; ayrıca pBAD24 vektörünün klonlama bölgesine spesifik olarak dizayn edilen ileri primer 5' TTAGCGGATCCTACCTGACG 3' ve geri primer 5' CTGGCAGTTCCTACTCTCG 3' kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucunda 858 bp'lik *marT* geninin çoğaltılması ile kesinlik kazanmıştır (Şekil 4.11). *marT* genini

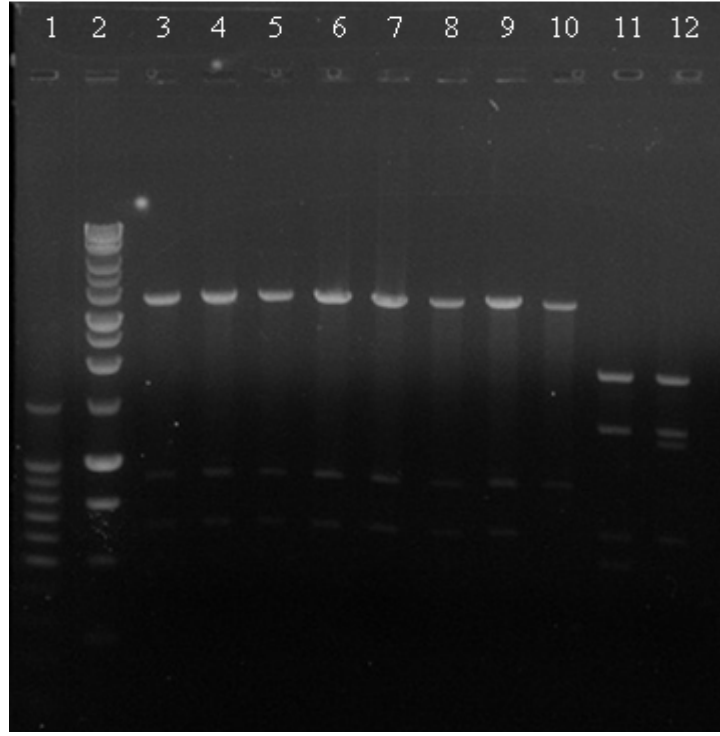
içeren pBAD24 plazmid vektörü pNA01 olarak isimlendirilmiştir. Antibiyotik içeren ortamlardan seçilen transformantlara, kültür koleksiyonuna alınmadan önce MZ numaraları verilmiştir. Bu numaralandırmaya göre; MZ1627: pNA01 plazmidini içeren $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028 suşunu, MZ1629: doğal pBAD24 plazmidini içeren $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028 suşunu ifade etmektedir.



Şekil 4.11 pNA01 plazmid DNA'sı ve bu plazmid DNA'sından PZR ile çoğaltılan *marT* geni

Kuyu 1: 1 kb moleküler marker, Kuyu 2-14: pNA01 plazmid DNA'sı (transformasyon sonrasında farklı $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028 kolonilerden izole edilen plazmid DNA'lar), Kuyu 15: pBAD24, Kuyu 16: Negatif kontrol (su), Kuyu 17-29: pNA01 plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PZR sonucu çoğaltılan *marT* geni

marT geninin pBAD24 vektörüne aktarımının PZR ile doğrulanmasının ardından bir sonraki basamakta, *marT* geninin pBAD24 vektörüne giriş yönünün kontrol edilmesi amacı ile farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak ikili kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. *EcoRI*+*EcoRV* ikili kesimi sonrasında tanımlanan yaklaşık 660 bç'lik ve *EcoRI*+*SSpI* ikili kesimi sonrasında tanımlanan 556, 675, 1358 ve 1953 bazlık bantlar *marT* geninin pNA01 plazmidine doğru yönde bağlandığını göstermiştir (Şekil 4.12).

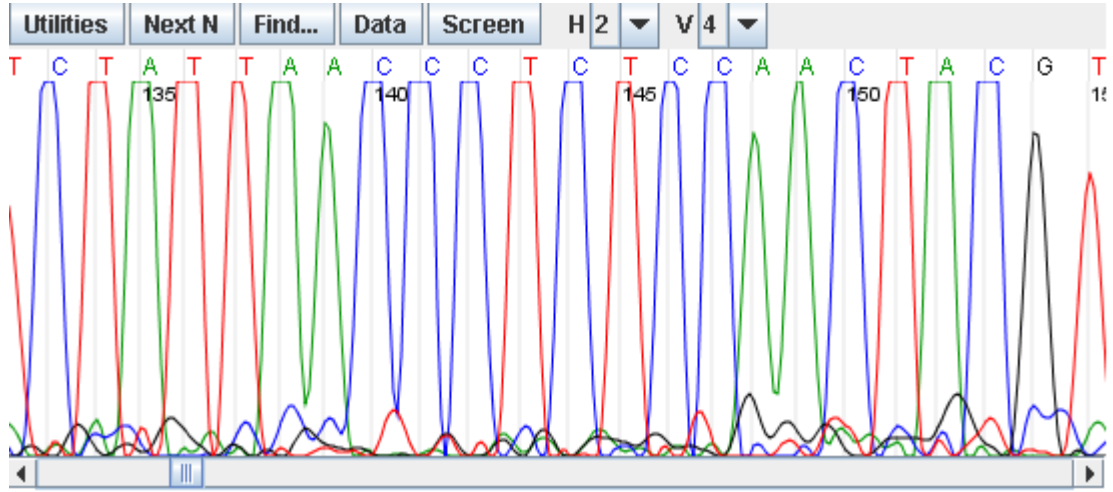


Şekil 4.12 pNA01 ve pBAD24 vektörlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan bantların agaroz jel görüntüleri

Kuyu 1	100 bp marker
Kuyu 2	1 kb marker
Kuyu 3	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 4	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 5	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 6	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 7	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 8	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 9	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+EcoRV</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 10	pBAD24 <i>EcoRI+EcoRI</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 11	pBAD24 <i>EcoRI+SspI</i> ikili enzim kesimi
Kuyu 12	pNA01 plazmid DNA'sı <i>EcoRI+SspI</i> ikili enzim kesimi

PNA01 plazmidine *marT* geninin giriş yönünün tekrar kontrol edilmesi amacı ile izole edilen plazmidlerin klonlama bölgeleri, evrensel pBAD24 primerleri kullanılarak (ileri primer 5' ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC 3' ve geri primer 5' GAT TTA ATC TGT ATC AGG 3') (Retrogene, Forster City, CA, USA) çoğaltılmış ve dizi analizine tabi tutulmuştur (Vaccine Research Institute, San Diego, CA, USA). PZR ürününün dizi

analizi sonucunda, aktarılan genin *marT* ve vektöre giriş yönünün de doğru olduğu bir defa daha kanıtlanmıştır (Şekil 4.13).



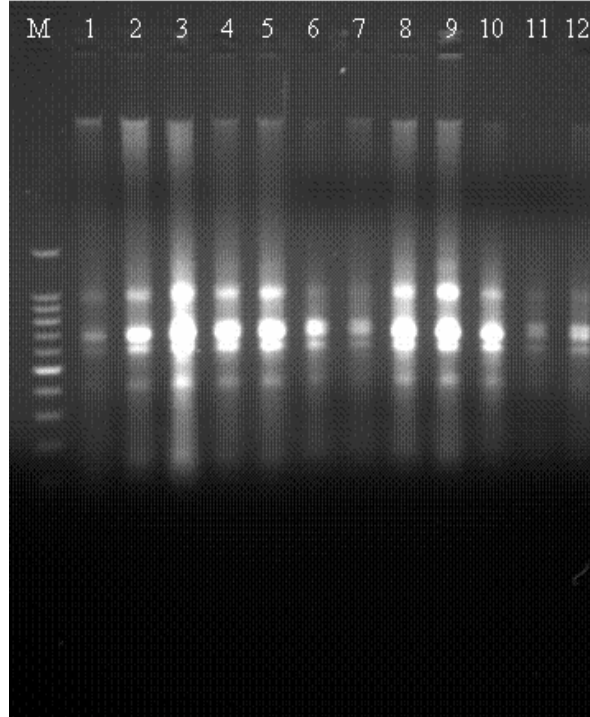
CGCTTTTATCGCNCTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCAGGAGGAATT
ACCATGTCCTGCTACGCAGCCACAGCATCAGACTATACTCAGTGGTGTCTATTAACCCT
TCCAACACTACGTTATGTTTTGGCATGGTAACAATGCGATGTTATGGATAATTAACGATAATATT
GAATTTAATCCAGAAATGAATCGCCTGGCTTCATTATCGAGGCCAGATCTCAACATTATTCT
GACAACGCCCGCCAGCCGCTGCTTGC GCCTTCTGCTGGAAAACGCCCCCTCCGTCGTCTCAC
AAACAAACATTCTTTCAAAAAGTGTGGGAAGAAGACGGCATGGTGGTGTTCGGCAAATACGCT
TTATCAGAATATCTCCATTATTCGCCGCGGATTACGTACCGTTGGCGAAAATGAAGATACGCT
TGATAATCACGGTTCCGCGTAGAGGCTTTTACAGATTGAGCCAGGTGTGAGCCTCATGACCATC
CGCAAAGACTTCGCTCAGGCAATAGAAAAAAGGGTGAGACGCCACCGCGTATGTCAGGGC
GTTGGTTTAAACATTATGTACCTGTACTTTGGATGACCGGGACATTTGCTGTCGGTATTTTGG
TTGGCACTATAAGCTGGCAAACCGTTCCCGATAAGGATTTTTACGATCGCTACACGCTGGTT
GAAACAACCTCAGGGCTGTCATTTTTTCTCGCGGAATGAAGATATCGAAAGCGGCAGCCGCTT
TGCAAGCTATAAGTCAATGATTCTAAAAACCGGTATGGATTGTCAGAAATACCCATGGGTCT
ATTCCCTTCCAGCAGTCGCACCCAGCGGTTACNGGCATTGATTTGTCAGCAA

Şekil 4.13 MZ1627 transformantından izole edilen plazmidin (pNA01) baz dizi analizi

Sarı olarak işaretlenen kısım vektörün klonlama bölgesinden önce bulunan dizileri, gri olarak işaretlenen kısım *marT* geninin çoğaltılmasında kullanılan ileri primer dizisini, altı çizili AGGAG Shine-Delgarno serisini (ribozom bağlanma bölgesi) ve yine altı çizili ATG dizisi ise başlama kodonunu ifade etmektedir. Geriye kalan dizi ise *marT* gen dizisini göstermektedir.

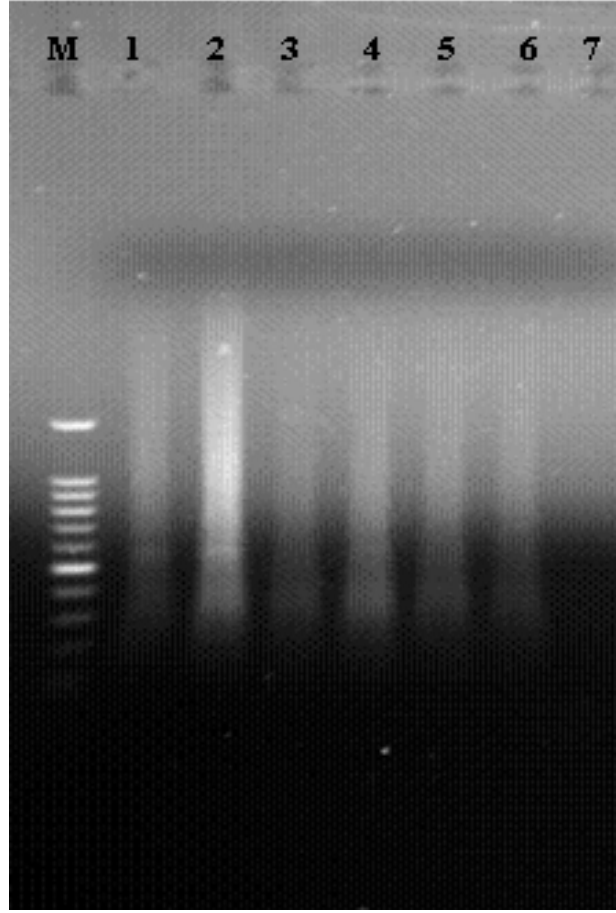
Bir sonraki basamakta, bakteri üreme ortamına arabinoz ilave edilerek geliştirilen mutant ve doğal tip *S. Typhimurium* suşlarından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonu sonrasında (Şekil 4.14) Q-PCR yöntemi ile *marT* geninin üretiminin ortama arabinoz ilavesinden 20 dakika ve 1 saat sonra maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiş ve çalışmalara bu zaman dilimdeki örnekler ile devam edilmiştir. Superscript II RT cDNA sentez kiti (Sigma, Chem. Co. USA) kullanılmak sureti ile RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve agaroz jellerde cDNA örneklerinin saflığı kontrol edildikten sonra (Şekil 4.15) örnekler Cy5TM-5 dCTP (PA55021) ve Cy3TM-3 dCTP (PA53021) boya ile işaretlenmiştir. Örneklerin mikrodizin slaytları (Nimblegene, Northern Marina Islands, USA) üzerinde hibridizasyonu gerçekleştirildikten sonra, mikrodizin analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.14 MZ1627 ve MZ1629 örneklerinden arabinoz ilavesinden sonra izole edilen RNA örnekleri.

Kuyu 1: 100bp moleküler marker, Kuyu 2: MZ1627 20 dk-1, Kuyu 3: MZ1627 20 dk-2, Kuyu 4: MZ1627 1s-1, Kuyu 5: MZ1627 1s-2, Kuyu 6: MZ1627 1s-2 tekrar, Kuyu 7: MZ1627 5s-1, Kuyu 8: MZ1627 5s-2, Kuyu 9: MZ1629 20dk-1, Kuyu 10: MZ1629 20dk-2, Kuyu 11: MZ1629 1s-1, Kuyu 12: MZ1629 5s-1, Kuyu 13: MZ1629 5s-2



Şekil 4.15 MZ1627 ve MZ1629 bakterilerinden izole edilen RNA örnekleri kullanılarak sentezlenen cDNA'ların agaroz jeldeki görüntüleri

3 paralel halinde gerçekleştirilen mikrodizin denemelerine ait slaytlar WebArrayDB (www.webarraydb.org) programı kullanılarak analiz edilmiş ve ifade düzeyinde azalış belirlenen genler, Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 MarT regülatör proteini varlığında ifade düzeyinde azalma belirlenen genler

Gen adı	Görevi
<i>dps</i>	Stresten sorumlu DNA-bağlanma proteini
<i>yliH</i>	Olası sitoplazmik protein
<i>wraB</i>	Trp-baskılayıcı bağlanma proteini
<i>flgK</i>	Flagella biyosentezi, kanca – boşluk protein 1
<i>flgL</i>	Flagella biyosentezi, kanca – boşluk protein
<i>osmE</i>	Fonksiyonu bilinmeyen zarf proteini
<i>manZ</i>	Şeker spesifik PTS ailesi, mannoz-spesifik enzim IID
<i>cheM</i>	Metil akseptör kemostaz protein II (MCPII), aspartat reseptör proteini
<i>cheA</i>	sensor histitin protein kinaz
<i>motB</i>	Flagellar motor dönüşün düzenleyicisi
<i>fliA</i>	RNA polimerazın sigma F (sigma 28) faktörü, geç flagella genlerinin transkripsiyonunu düzenlemektedir
<i>fliC</i>	Flagella biyosentezi; flagellin, filament yapısal protein

MarT regülatör proteini varlığında ifadesi azalan ilk gen *dps* geni olarak tanımlanmıştır. *S. enterica* üzerinde yürütülen çalışmalarda, Dps proteininin oksidatif strese karşı dirençlilikten sorumlu bir DNA bağlanma proteini olduğu saptanmıştır. Bu proteinin üretimi *Salmonella* hücrelerinin makrofajlar tarafından fagosite edilmesinden sonra gerçekleşmektedir. Bu sayede *Salmonella* hücreleri fagositlerin içerisindeki oksidatif stres koşullarına karşı direnç gösterebilmekte, çoğalabilmekte ve virülanslığını sürdürebilmektedir (Libby vd. 1994, Tsois vd. 1995, Halsey vd. 2004). Mikrodizin sonuçları MarT proteininin, *dps* genlerinin negatif regülatörü olduğuna işaret

etmektedir. Bu durum fagositik koşullarda MarT üretiminin engellenmesi suretiyle *dps* genlerinin üzerindeki baskılamanın kalkması ile açıklanabilir.

İfadesi azalan bir diğer gen olan *yliH* (BssR) üzerinde çok az bilgi bulunmaktadır. Ancak *E. coli*'de yürütülen mutasyon analizleri sonucunda, bu proteinin söz konusu bakteride biyofilm oluşumunu ve hareketliliği engelleyen negatif bir regülatör olduğu tanımlanmıştır (Domka vd. 2006). Bununla birlikte, *Salmonella*'da yürütülen benzer çalışmalarda, *yliH* geninin ifade edildiği koşullarda hareketlilik ve adhezif özelliklerin çok az değiştiği, biyofilm oluşumunun ise hiç etkilenmediği saptanmıştır (Park vd. 2007). Bu veriler dikkate alındığında, *yliH* geninin *Salmonella*'daki fonksiyonunun farklı olduğu ortaya çıkmaktadır. *S. Typhimurium*'da *yliH* geninin fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi, MarT regülatörünün bu gen üzerindeki negatif regülasyon karakteristiklerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. *yliH* gibi homolog genlerin, farklı organizmalarda farklı fonksiyonlar göstermesinin moleküler düzeyde açıklanması, söz konusu organizmaların farklılaşma süreçlerinin tanımlanmasına önemli katkılarda bulunacaktır.

MarT regülatör proteini varlığında azalan en ilginç gen grubu; flagellar biyosentez aşamalarında etkin proteinleri kodlayan *motB*, *flgK*, *flgL*, *fliA* (sigma 28) ve *fliC* genleridir. Bu durum MarT üretiminin flagella biyosentezini negatif yönde ve etkin bir şekilde regüle ettiğine işaret etmektedir. *fliA* (sigma 28) hariç, bu genlerin tamamı flagella biyosentezinde III sınıf promotörlerden transkribe edilen geç aşama genleridir. Söz konusu genlerin tümünün transkripsiyonunu gerçekleştiren RNA polimeraz haloenzim kompleksinin sigma faktörü *fliA* geni ürünüdür (sigma 28) (Chilcott ve Hughes 2000, Cano vd. 2002, Kazmierczak vd. 2005, Chessa vd. 2008a). Sigma 28 faktörü olmaksızın flagellar biyosentezin geç aşama genlerinin transkripsiyonu mümkün olmayacağından, MarT regülatör proteininin bu grup genler içerisinde yalnız *fliA* geninin doğrudan negatif regülatörü olduğunu söylemek olasıdır. MarT proteininin, *S. Typhimurium*'da flagellar biyosentez geç aşama genlerinin negatif regülatörü olarak davranması, esasen flagellanın sentezi esnasında hücre yüzeyi ile ilişkili diğer virülans faktörlerinin fonksiyonu ya da ifadesini engelleme özelliği ile açıklanabilir. *S. Typhimurium*'da flagellanın konakçı hücre işgalinde önemli birçok proteinin

fonksiyonunu engellediği öne sürölmüştür. Diğer yandan *Salmonella*'nın mide gibi asit çevrelerde bu stres koşulluna adaptasyon amacı ile flagella biyosentezini durdurduğu saptanmıştır. Mutasyon çalışmalarından elde edilen bazı bulgular da, flagella biyosentezi yapamayan değişik *Salmonella* mutantlarının virölanslığının düşmediğini göstermiştir (Strauss 1995, Adams vd. 2001, Chessa vd. 2008b). Ancak flagella biyosentezinin ve özellikle bazı flagella alt ünitelerinin *Salmonella* virölanslığında çok etkin olduğunu gösteren araştırma bulguları da mevcuttur (Kazmierczak vd. 2005, Barnhart ve Chapman 2006, Santos vd. 2009, Barker vd. 2010). Yukarıda özetlenen literatür verileri, flagellar yapıların ve hareketliliğin *Salmonella* patojenitesindeki rolünün halen açık olmadığına işaret etmektedir. Bizim alışmamızda elde edilen veriler, *S. Typhimurium*'da flagellar yapıların in vivo koşullarda konakçı doku adaptasyonunu ve virölans faktörlerin fonksiyonlarını engellendiği tezini destekler niteliktedir. Bu durumun kesinlik kazanabilmesi için *marT* geni aktive edilmemiş ve edilmiş mutantlar ile hayvan model sistemlerde kalıcılık çalışmalarının yürütölmesi ve sigma 28 geni promotörü ile MarT proteininin özgül interaksiyonunun tanımlanması gerekmektedir.

MarT regölatör proteini varlığında ifadesi azalan protein WraB, *Salmonella*'da triptofan biyosentezi represörüne (TrpR) bağlanmak suretiyle onu aktive eden, bir diğer ifade ile triptofan biyosentez genlerinin transkripsiyonunu dolaylı bir şekilde baskılayan bir regölatördür (Kim ve Surette 2003). *Salmonella* konakçı sisteme dahil olduğunda karşılaştığı en önemli stres koşullarından biri besinsel yetersizliktir. Bu koşula adaptasyonun en genel yolu ise amino asit biyosentez yollarının aktivasyonudur (Coldham ve Woodward 2004, Hamilton vd. 2009, White vd. 2010). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, MarT regölatörünün in vivo koşullarda triptofan biyosentezi üzerindeki baskılamayı kaldıracak mekanizmayı regüle etmesi anlam kazanmaktadır.

İfadesi azalan gen grubunda yer alan *osmE*, *S. enterica* ve *E. coli*'de yüksek ozmolaritenin olduğu koşullarda üretimi teşvik edildiği bilinen bir zarf proteimidir. Ancak fonksiyonu henüz tanımlanamamıştır. Bu proteinin ifadesinin üssel üreme fazının ortasında transkripsiyonel bir regölatör aracılığı ile baskılandığı, *E. coli*'de

yürütülen çalışmalar sonucu belirlenmiştir. *E. coli*'de *osmE* geninin negatif regülatörü Fis olarak adlandırılan bir proteindir. Ancak *Salmonella*'da söz konusu genin regülasyonu üzerinde bir çalışma bulunmamaktadır (Bordes vd. 2002, Sonck vd. 2009, White vd. 2010). Çalışmamızda gerçekleştirilen mikrodizin sonuçları bu genin *S. Typhimurium*'daki negatif regülatörünün MisL proteini olduğunu göstermektedir.

manZ geni, mannoz spesifik fosfotransferaz enzim sisteminin IID alt ünitesini kodlamakta ve bu enzim kompleksinde transmembran taşıyıcı görevini üstlenmektedir. Mannoza spesifik taşıyıcı proteinlerin mutasyonel ve evrimsel analizleri, bu enzim sistemlerinin *S. enterica* ve *E. coli*'de epitelyal yüzeylere adaptasyonun ve simbiyotik ilişkinin gelişmesinde rol oynadığına işaret etmektedir. Bazı araştırmalarda söz konusu enzim genlerinin inaktivasyonunun *S. enterica* ve *E. coli*'de virülanslığı düşürdüğü ifade edilmekle birlikte, bu bulgular kesinlik kazanmamıştır (Turner vd. 1998, Alteri vd. 2009, Zuniga vd. 2009). Çalışmamızda elde edilen ve enfeksiyon sürecinde MarT proteininin *S. Typhimurium*'da ManZ üretiminin negatif transkripsiyonel regülatörü olduğu bulgusu, mannoza taşıyıcı proteinlerin enterik bakterilerde simbiyotik ilişki üzerine etkili olduğunu savunan evrimsel görüşü destekler niteliktedir.

MarT regülatörü varlığında ifadesi azalan son grup proteinler bakteriyel kemotakside rol oynayan CheA ve CheM (MCP-II) olarak belirlenmiştir. CheA, 654 amino asit içeren dimerik yapıda ve bakteriyel kemotakside sinyal transdüksiyonunu gerçekleştiren bir protein kinaz enzimidir. CheA, histidin aminoasitlerinden otofosforile olduktan sonra bu fosforil gruplarını iki sitoplazmik efektör proteine (CheY ve CheB) iletir. CheY doğrudan flagella bazal yapısı ile ilişkilendirilerek flagellar hareketi başlatır. Eğer ortamda kimyasal çekiciler var ise, metil akseptör kemostaz proteinleri (MCP-I, MCP-II ve MCP-III) bir metiltransferaz enzimi tarafından geri dönüşebilir şekilde metillenmekte ve kimyasal çekiciye doğru hareketi yapacak şekilde flagellayı aktive etmektedir (Chelsky ve Dahlquist 1980, Tawa ve Stewart 1994, Frye vd. 2007, Barker vd. 2010). MarT proteininin *cheA* ve *cheM* genlerinin negatif regülatörü olduğu bulgusu, flagellar biyosentez aşamalarında etkin proteinleri kodlayan *motB*, *flgK*, *flgL*, *fliA* (sigma 28) ve *fliC* genlerinin de MarT tarafından negatif regüle edilmesi sonuçları ile paralellik taşımaktadır. Bu bulgular beraber yorumlandığında, *S. Typhimurium*'un mide asitliliğine

toleransının sağlanmasında, hareket yeteneğini kaybetmesinin (baskılanmasının) önemli bir rolü olduğu ortaya çıkmaktadır.

MarT proteininin varlığında pozitif regüle edilen genler ise Çizelge 4.2’de, fonksiyonları da açıklanarak belirtilmiştir.

MarT varlığında artış gösteren ribozomal proteinler; L2 (50 S ribozom alt ünitesinde yer alan ve peptidil transferaz aktivitesi gösteren protein), L16 (50 S ribozom alt ünitesinde yer alan, 23 S ribozomal alt ünitesine bağlanarak peptidil transferaz aktivitesi merkezinde lokalize olan ve bu yolla aktif ribozom konformasyonunun oluşumuna katkıda bulunan protein), S3/S10 (30 S ribozom alt ünitesinde bulunan ve yine 30 S ribozom alt ünitesi proteini S14 ile birleşerek 16 S ribozomal RNA molekülünün, ribozomda amino asile tRNA’nın yerleştiği “A” bölgesine lokalize olmasını sağlayan protein), L4 (50 S ribozom alt ünitesinde yer alan ve S10 operonunu transkripsiyonel düzeyde regüle eden protein), S10 (30 S ribozom alt ünitesinde yer alan ve tRNA’nın ribozom ile ilişkilmesinde görev yapan, ayrıca translasyon uzama faktörü gibi davranan protein), L23 (50 S ribozom alt ünitesinde yer alan ve 23 S rRNA molekülüne erken bağlanan protein. Bu sayede 50 S ribozomunun birleşmesi sürecinde diğer proteinlerin bağlanmasını regüle eder), L3 (50 S ribozom alt ünitesinde yer alan ve 23 S rRNA molekülünün 3’ ucuna bağlanarak, diğer ribozomal proteinlerin sıralı bir şekilde birleşmesi için başlangıç noktasını oluşturan protein) ve EF-Ts

Çizelge 4.2 MarT regülatör proteini varlığında ifade düzeyinde artış belirlenen genler

Gen adı	Görevi
<i>aceE</i>	Pürivat dehidrogenaz, dehidrogenaz bileşeni
<i>aceF</i>	Pürivat dehidrogenaz , dihidrolipoamit asetiltransferaz bileşeni
<i>lpdA</i>	Lipoamit dehidrogenaz ; 2-okzodehidrogenaz ve purivat bileşeni
<i>tsf</i>	Protein zincir uzama faktörü; EF-Ts
<i>allC</i>	Allantoat amidohidrolaz
<i>cydA</i>	Sitokrom bd terminal oksidaz, polipeptit altünite I
<i>cydB</i>	Sitokrom bd terminal oksidaz polipeptit altünite II
<i>wzzB</i>	Lipopolisakkarit zincirinin O-antijeninin büyüklük belirleme regülatörü
<i>rplP</i>	50S ribozomal alt ünitesi, protein L16
<i>rpsC</i>	30S ribozomal alt ünitesi protein S3
<i>rplB</i>	50S ribozomal alt ünitesi protein L2
<i>rplW</i>	50S ribozomal alt ünitesi protein L23
<i>rplD</i>	50S ribozomal alt ünitesi protein L4, S10 operonunun ifade regülatörü
<i>rplC</i>	50S ribozomal alt ünitesi, protein L3
<i>rpsJ</i>	30S ribozomal alt ünitesi, protein S10
<i>rmbA</i>	Olası sitoplazmik protein
<i>misL</i>	Ototransporter protein
<i>fidL</i>	Olası iç membran proteini
<i>marT</i>	Transkripsiyonel regülatör
<i>slsA</i>	Olası iç membran proteini
<i>cpxP</i>	Ekstrasitoplazmik toksisitenin engelleyicisi bir periplazmik protein

(protein sentezi zincir uzama faktörü) olarak tanımlanmıştır. *Salmonella* konakçı sistemine dahil olduğunda; asit, tuz, besinsel azlık gibi temel stres faktörlerine maruz kalması yanında, MisL ototransporter proteininin de dahil olduğu birçok virülans faktörün sentezini başlatmak zorundadır. Özetle bu bakteri, metabolizmasını yeni koşullara adaptasyon ve çoğalmanın sağlanacağı şekilde yönlendirir. Değişik çalışmalarda, *Salmonella*'nın konakçı sisteme dahil olması halinde metabolik

kapasitesinin düştüğü ve makrofaj hücre kültürlerinde toplam genlerinin sadece % 21'inin ifade edildiği belirlenmiştir (Stelzl vd. 2001, O'Connor vd. 2004, Kirthi vd. 2006, Uthe vd. 2007, Raghunathan vd. 2009). MarT regülatörü, daha önce de ifade edildiği gibi, ancak *S. Typhimurium*'un konakçı sisteme dahil olması halinde üretilmektedir. Bu durumda, yukarıda tanımlanan ribozomal protein genlerinin MarT tarafından pozitif regülasyonu, sentez kapasitesine değil, protein sentezinin güçlü bir şekilde regüle edildiğine işaret etmektedir. Zira MarT varlığında ifadesi artan tüm ribozomal proteinler, ribozom birleşmesi ve fonksiyonunu regüle eden proteinlerdir. Özellikle metabolik kapasitenin düştüğü konakçı sistem koşullarında ribozomal proteinlerin sentezinin regülasyonunun sıkı bir şekilde yapılması ve protein sentezinin doğruluğunu kontrol edecek enzimlerin üretim düzeyinin artırılması hücre enerjisinin ekonomik kullanımı açısından hayati bir önem taşımaktadır. Bu esaslar doğrultusunda MarT'nin söz konusu ribozomal proteinlerin üretimini teşvik etmesi anlamlıdır.

MarT varlığında ifadesi artan *aceE* ve *aceF* genleri, piruvat dehidrogenaz enziminin, sırasıyla dehidrogenaz ve dihidrolipoamit asetil transferaz bileşenleri olan proteinleri kodlamaktadır. Piruvat dehidrogenaz multienzim kompleksi, piruvatın asetil koenzim A'ya (Asetil-CoA) oksidatif dekarboksilasyonunu katalize etmektedir. *aceE* ve *aceF* genleri bakımından mutant *Salmonella* suşları aerobik koşullarda gelişme için asetata ihtiyaç duymaktadır. MarT varlığında ifadesi artan *lpdA* geni ürünü lipoamit dehidrogenaz da, kesintiye uğramış tri karbon asidi (TCA) çevriminde anahtar bir enzim olan, okzalglutarat dehidrogenaz komplekslerinin oluşumu için zorunlu bir bileşendir (Eisenreich vd. 2010). Değişik araştırmalarda; yukarıda tanımlanan enzim aktivitelerinin zorunlu olduğu asetat metabolizmasının ya da kesintiye uğramış tri karbon asidi çevriminin *Salmonella* ve *E. coli* suşlarında virülanslığı artırdığı belirlenmiştir (Jeyaseelan ve Guest 1980, Marcado-Lubo vd. 2009, Sonck vd. 2009, Eisenreich vd. 2010). Bu bilgiler, *S. Typhimurium*'um gerek mide bağırsak sisteminde ve gerekse hücre içi koşullarda enerji metabolizmasını düzenlemek ve virülansını artırmak için piruvatın hızlı bir şekilde Asetil-CoA'ya çevrimine ve bazı durumlarda kesintiye uğramış TCA döngüsüne ihtiyaç duyduğuna işaret etmektedir. Bu durum MarT varlığında *aceE*, *aceF* ve *lpdA* ve genlerinin ifadesinin artışıyla açıklanmaktadır.

Allantoat amidohidrolaz enzimini kodlayan genin (*allC*) MarT varlığında ifadesinin artışı, *Salmonella*'nın da içinde bulunduğu birçok enterik bakteri için anaerobik koşullarda, purin ve primidinlerin parçalanma ürünü olan allantoinin başlıca azot (bazen karbon) kaynağını teşkil etmesi ile açıklanabilir. Zira bu genin indüksiyonu, özellikle fagozomlar içerisinde oluşan anaerobik koşullarda *Salmonella*'nın gelişimini destekleyecektir (Matiasovicova vd. 2007, Kingsley vd. 2009). Sitokrom bd terminal oksidaz enzimi yapısal genlerinin (*cydA* ve *cydB*) MarT regülatörü tarafından pozitif regülasyonu, allantoat amidohidrolaz'da olduğu gibi, oksijen miktarının azaldığı koşullarda adaptasyonu sağlama görevi görmektedir. Söz konusu genlerin inaktive edildiği *E. coli* mutantlarında üremenin durma fazında canlı kalma oranı belirgin bir şekilde düşmektedir. Aynı şekilde değişik patojen bakterilerde oksijenin azaldığı koşullarda bu genlerin yokluğunda gelişimin önemli ölçüde yavaşladığı belirlenmiştir. Zira anaerobik koşullarda oluşan dioksijen elektronları, sitokrom bd terminal oksidazın etkin rol oynadığı dioksijen bağımlı solunum zincirinde kullanılmaktadır (Kana vd. 2001, Kingsley vd. 2009).

MarT'nin pozitif regülatör olarak görev aldığı bir diğer gen lipopolisakkarit zincirinin O-antijeninin büyüklük belirleme regülatörü olan *wzzB* geni olarak tanımlanmıştır. Patojenik *Salmonella* serovaryeteleri tarafından üretilen diğer proteinler ile birlikte, lipopolisakkaritler (LPS) konakçı hücre işgalinde çok önemli bir rol üstlenmektedir. *wzzB* geni, özellikle hücrelerin aktif gelişimi sürecinde kısa S-OAg antijen zincirinin üretiminden sorumludur ve bu genin delesyonu halinde *Shigella* ve *Salmonella*'nın invazivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Carter vd. 2007, Santos vd. 2009). Üssel gelişme fazındaki *S. Typhimurium* kültürlerinden mikrodizin denemelerinin yapılmış oluşu, yukarıda özetlenen literatür verilerinin paralelinde sonuçların elde edilmesine yol açmıştır. Bu bulgular hücre işgalinin erken aşamasında kısa S-OAg antijen zincirinin üretildiğini doğrulamaktadır.

Mikrodizin sonuçlarına göre MarT tarafından pozitif regüle edilen grup genler; *rmbA* (dizi homolojisi esas alınarak olası bir sitoplazmik protein tanımı yapılmıştır), *misL* (ototransporter protein), *fidL* (dizi homolojisi esas alınarak olası bir iç membran proteini tanımı yapılmıştır), *marT* (transkripsiyonel regülatör) ve *slsA* (dizi homolojisi

esas alınarak olası bir iç membran proteini tanımı yapılmıştır) olarak tanımlanmıştır. *Salmonella* patojenite adası III'de (SPI-III) tanımlanan bu genler, komşu genler olup; *rmbA*, *misL*, *fidL*, *marT* ve *slsA* sırasıyla kesintisiz bir şekilde birbirini takip etmektedir. Bu grupta *fidL* ve *marT* operon oluşturmakta, diğer genler ise bağımsız transkribe edilmektedir. Yukarıda da ifade edildiği gibi, bu gen grubu içerisinde yalnız MisL ve MarT proteinlerinin fonksiyonu hücresel süreçlerde tanımlanmıştır. Amino asit dizi homolojileri esas alınarak adlandırılan diğer proteinlerin fonksiyonları hakkında ise herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Daha önce DNA jel kayma deneyleri ile MarT proteininin MisL ototransporter proteinini kodlayan genin pozitif regülatörü olduğu saptanmıştır (Blanc-Potard vd. 1999, Dorsey vd. 2005, Tükel vd. 2007, Retamal vd. 2010). Bu çalışma jel kayma denemelerine kesinlik kazandırmıştır. Araştırma sonuçları, aynı zamanda *rmbA*, *misL*, *fidL*, *marT* ve *slsA* genlerinin regülön organizasyonu içerdiğini kanıtlamaktadır. MarT proteininin, bu regülönün ve özellikle *marT-fidL* operonunun otoregülatörü olduğunun belirlenmesi, bu grup içerisindeki genlerin *S. Typhimurium* virülansı için önemli olduğunun çok güçlü kanıtıdır. Bu nedenle söz konusu gen grubunda fonksiyonel analizlerin tamamlanması büyük önem taşımaktadır.

MarT proteini varlığında pozitif yönde regüle edildiği belirlenen son gen olan *cpxP* geni, hücre zarfı stres yanıtının oluşturulmasından ve bu yanıtın gerekli olmadığı koşullarda *cpx* ikili regülatör sisteminin baskılanmasından sorumlu bir proteindir. *cpx* ikili regülatör sistemleri hücre zarfı (iç zar, periplazma ve dış zar sistemlerinin kapladığı sitoplazma dışı bölge) stabilitesini bozan her türlü etkinin oluşturduğu strese karşı, stres yanıtı sağlanmasından sorumludur. Bu yanıt; hatalı katlanan ya da yanlış bölgede lokalize olan proteinlerin parçalanması, zarf proteinleri şaperonlarının üretiminin teşviki ve stres faktörlerine karşı yanıt trafiğini oluşturan değişik faktörlerin aktive edilmesi sonucu meydana getirilmektedir. Sistem; *cpxA* (membran bağımlı sensör histidin kinaz), *cpxR* (sitoplazmik yanıt regülatörü) ve *cpxP*'den oluşmaktadır. *cpxP* hatalı katlanan ya da yanlış bölgede lokalize olan proteinlere spesifik olarak bağlanmak suretiyle, bu proteinleri ikili regülatör sistem tarafından aktive edilen parçalayıcı proteinlere hedef haline getirmekte ve değişik zarf stresi faktörleri tarafından meydana gelen bu sonucun ortadan kaldırılmasında rol oynamaktadır. Stres koşulu ortadan kalktığında ve dolayısı ile hatalı üretilen ya da yanlış bölgeye lokalize olan proteinlerin

varlığı zarf bölgesinde azaldığında ya da yok olduğunda ise, CpxP proteini ikincil hedefi olan CpxA'ya bağlanmakta ve ikili regülatör sistemi bloke etmektedir. Yapılan araştırmalarda CpxP proteininin özellikle asit stresi başta olmak üzere, değişik çevresel stres koşulları altında aktive edildiği belirlenmiştir. *Salmonella* konakçı sisteme dahil olduğunda ilk karşılaştığı çevresel stres, mide asitliğinden kaynaklanan stres koşuludur (Danese ve Silhavy 1998, Raivio vd. 2000, Santos vd. 2009, Jarvik vd. 2010). MarT proteininin, *cpxP*'nin pozitif regülasyonunu yönetmesi, muhtemelen *marT*-*fidL* operonunun da asit indüklenebilir bir operon olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tespitin kesinlik kazanması için in vivo koşulların taklit edildiği deney düzeneklerinde *marT* promotörü aktivasyon kinetiklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

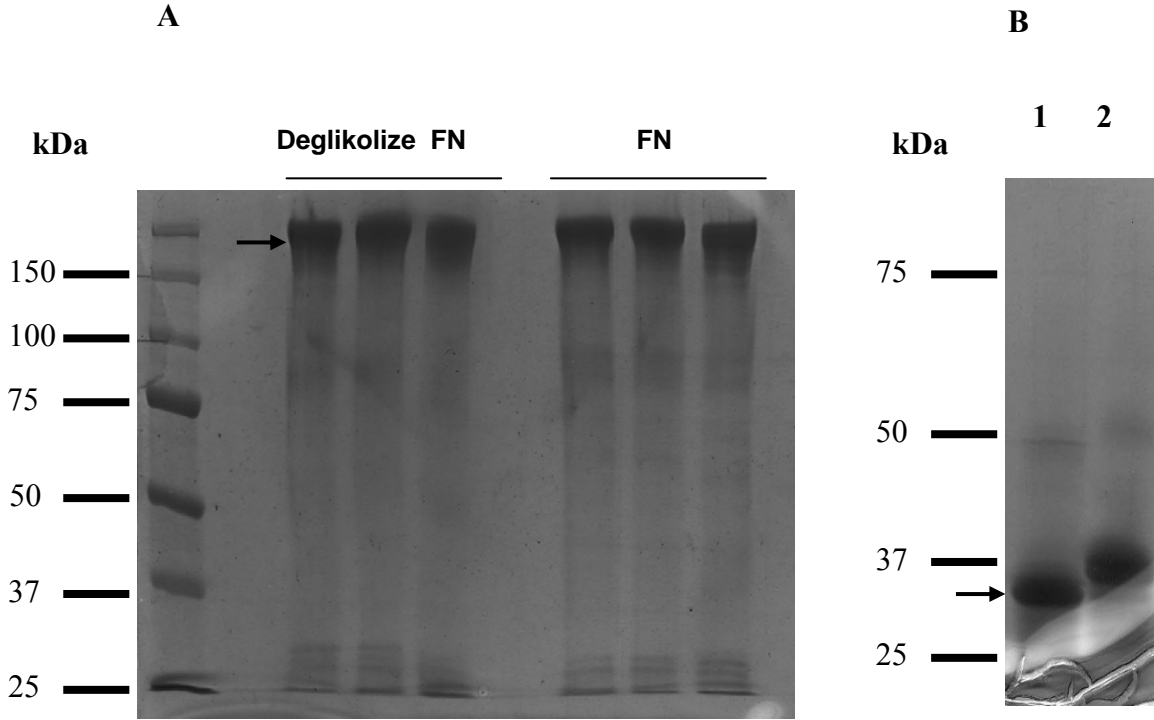
4.4 MisL Proteininin Fibronektine (FN) Bağlanma Karakteristiklerinin Tanımlanması

4.4.1 Fibronektin deglikolizasyonunun MisL bağlanması üzerine etkisi

MisL ototransporter proteininin fibronektine bağlanma karakteristiklerinin belirlenmesi çalışmalarının ilk aşamasında, MisL proteininin fibronektine bağlanmasında karbonhidrat yan gruplarının rolü olup olmadığı araştırılmıştır.

MisL yolcu domaininin fibronektine, bu proteinde yer alan glikan gruplarından bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için; öncelikle MisL proteininin deglikolize ve glikolize FN'e bağlanma karakteristikleri, in vitro katı faz bağlanma deneyleri ile araştırılmıştır. FN'in deglikolizasyonunda GlycoProfile™ II deglikolizasyon kitinden (Sigma Chem. Co. USA) yararlanılmıştır. Peptit N-glikozidaz F (PNGaseF), FN'den, N-bağlı glikanların uzaklaştırılması amacı ile kullanılmıştır. Bu uygulama deglikolize protein stabilitesini korumakta, yalnız glikan bağlanma bölgesindeki asparajinin deaminasyonu sonucu aspartik asit oluşumuna yol açmaktadır (Hagglund vd. 2007). Denemede deglikolizasyon etkinliği SDS-PAGE yöntemi ile test edilmiştir. Bu testte deglikolize edilen moleküllerin jel üzerindeki hareketliliğinde kaymalar, deglikolizasyonun başarılı olduğuna işaret etmektedir. FN büyük moleküler ağırlıkta bir protein olduğundan, moleküler büyüklük değişiminden kaynaklanan kaymanın tanımlanması oldukça zordur. Fibronektinin çöktürülmesinde denatürasyon uygulandığı için, deglikolizasyon

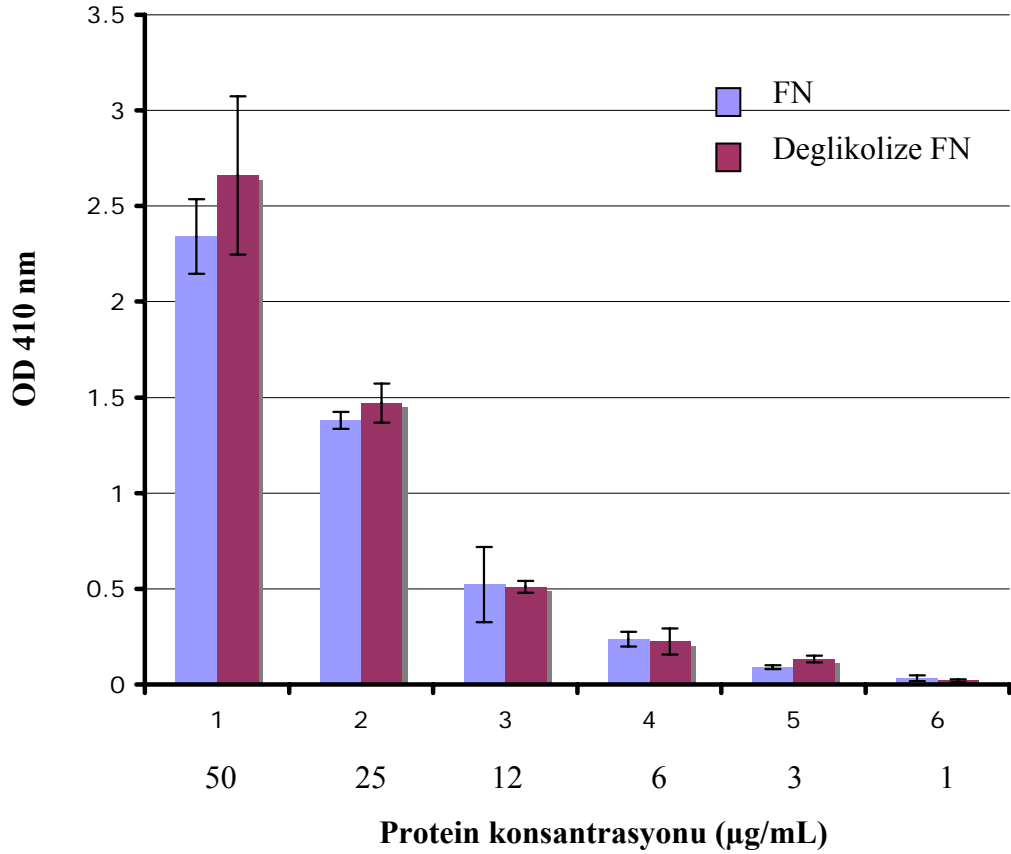
aşamasında denatürasyon uygulanmamıştır. Bu çalışmada, deneyin doğruluğunun kontrolünde RNaz B kullanılmış ve FN ile aynı koşullarda deglikolizasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.16.A ve B). Şahit RNaz B örneğinde açıkça görüldüğü gibi (Şekil 4.16.B), deglikolizasyon sonucu belirgin bir kayma gerçekleşmiştir. Bu sonuç, denemenin doğruluğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.16.a. N-bağlı deglikolize edilmiş Fibronektin (okla gösterilen deglikolize FN), b. N-bağlı deglikolize edilmiş RNaz B (okla gösterilen deglikolize RNaz B)

GST-MisL proteininin fibronektine ya da N-bağlı deglikolize fibronektine bağlanma özellikleri 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Kuyucuk başına 2µg FN ya da N-bağlı deglikolize FN ile kaplama yapılmış ve üzerlerine artan konsantrasyonlarda MisL (50µL, fosfat ile tamponlanmış fizyolojik tuzlu su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır) ilave edilmiştir. Bağlanan GST-MisL komplekslerinin belirlenmesinde, Anti-GST antiserum kullanılmıştır. Artan GST-MisL konsantrasyonuna bağlı olarak, MisL'in deglikolize ve doğal fibronektin formlarına (glikolize) eşit düzeyde artan bir etkinlikte bağlanma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.17). Bu bulgular, MisL'in fibronektine bağlanmasında glikan gruplarının bir rolü olmadığını kanıtlamaktadır.

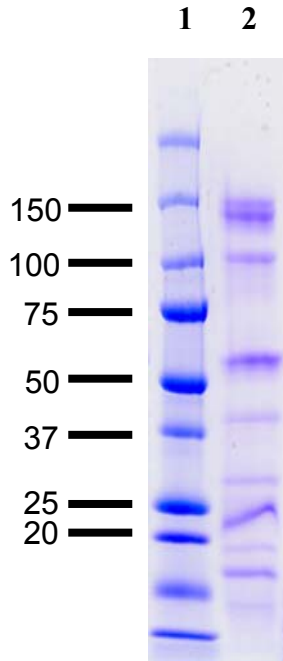
MisL ototransporter proteininin fibronektine özgül bağlanma gösterdiğinin tespit edildiği ilk ve halen tek olan araştırmada, söz konusu denemeler plakalara tutundurulmuş doğal fibronektin ile yürütülmüştür (Dorsey vd. 2005). Dolayısıyla söz konusu bağlanmanın, posttranslasyonel modifikasyon sürecinde fibronektine ilave edilen glikan yan gruplarından mı yoksa doğrudan proteinden mi kaynaklandığı bugüne kadar bilinmemektedir. Doğal fibronektin ve deglikolize edilmiş fibronektin ile yürüttüğümüz deneme sonuçları, MisL ototransporter proteininin fibronektine protein-protein interaksyonu ile bağlandığını saptayan ilk bulgulardır.



Şekil 4.17 Artan konsantrasyonlardaki GST-MisL proteininin fibronektine (mavi kolonlar) ve N-bağlı deglikolize fibronektine (kırmızı kolonlar) bağlanma etkinliği

4.4.2 Fibronektinin termolizin fragmentlerine ayrılması ve MisL bağlanma domaininin belirlenmesi

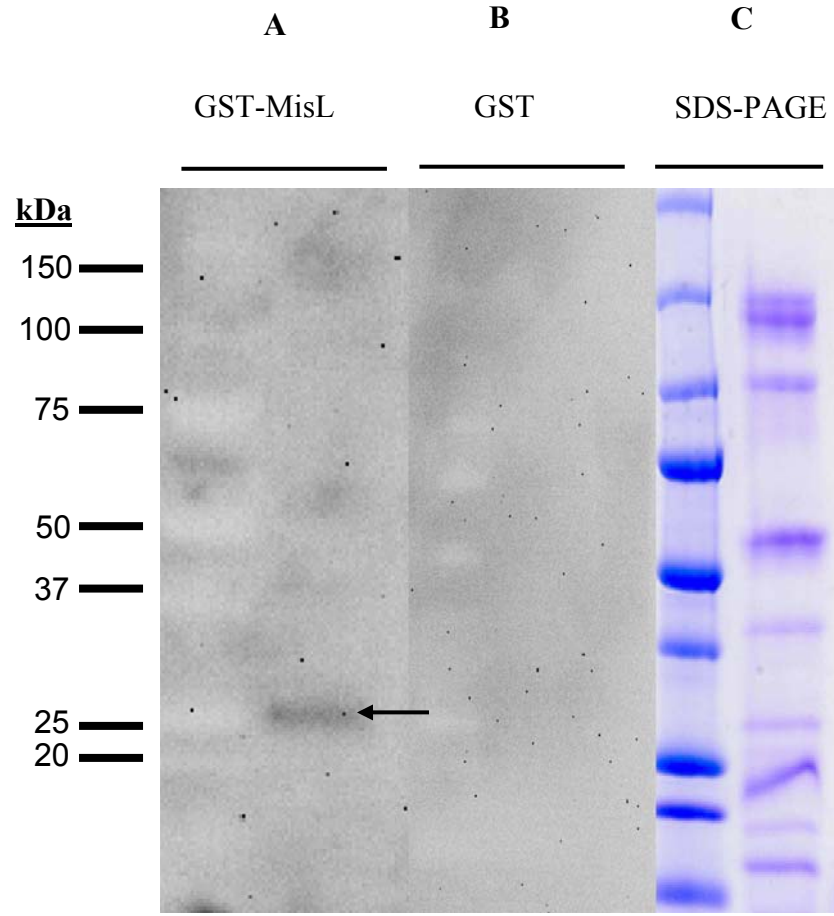
Fibronektin plazmada genellikle benzer fakat aynı olmayan çift zincirden oluşan dimer formunda bulunmaktadır. Her bir zincir yaklaşık 250 kDa büyüklüğündedir. Bir çift disülfid bağı, zincirlerin C-terminalinin bağlanarak ilişkilenmesinde rol oynamaktadır. Her bir zincirde 30 adet zincirler arası disülfid bağı ve iki sülfidril grubu bulunmaktadır. Moleküler büyüklük varyasyonu, 14 FnIII ve 15 FnIII tekrar modüllerinin arasına giren dizilerden (V bölgeleri) kaynaklanmaktadır. Domainler arasındaki bu esnek serilerin limitli proteoliz aracılığı ile hidrolize edilmesi sonucu, aktivite ve konformasyon değişikliğine uğramamış karakteristik protein fragmentleri oluşturulabilmektedir (Bershadsky vd. 2003, Tan vd. 2004, Astrof vd. 2007). Çalışmamızda, *Bacillus thermoproteolyticus* tarafından üretilen bir proteolitik enzim olan termolizin'in sığır fibronektini üzerinde oluşturduğu fragmentler SDS-PAGE sisteminde tanımlanmıştır. Sığır fibronektininin limitli proteolizi sonucunda yaklaşık; 140 kDa, 120 kDa, 60 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa and 10 kDa büyüklüğünde fragmentler belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Termolizin'in sığır fibronektini üzerinde oluşturduğu fragmentler. Moleküler büyüklük markeri (1), termolitik fibronektin fragmentleri (2; 0.004 mg)

Fibronectinin termolizin ile kısmi parçalanması sonucunda oluşan peptit fragmentleri SDS-PAGE sisteminde tanımlandıktan sonra, naylon membrana transfer edilmiş ve bu membrana 70 nM GST-MisL uygulanmıştır. Western lekeleme denemesinde aynı muameleye tabi tutulmuş membrana 70 nM GST uygulaması ise kontrol olarak gerçekleştirilmiştir. Yıkama aşamasını takiben membranlar anti- GST antiserum ve ikinci bir keçi/tavşan AP konjuge antiserum ile muamele edilmiştir. İmmünstar substrat ile yapılan belirleme denemesinde, sadece 25 kDa büyüklükteki fragment bölgesinde sinyal belirlenmiştir. GST-MisL yerine, GST kullanılan kontrol denemede ise bağlanma sinyali saptanamamıştır (Şekil 4.19). Bu bulgular, GST-MisL proteininin sadece 25 kDa büyüklükteki termolitik fibronectin fragmentine bağlandığını göstermektedir.

25 kDa büyüklükte termolitik fragmentin karakterizasyonu için, N-terminal amino asit dizisi analizine gönderilen örneklerde, 8 amino asit AVTTIPAP (Alanin, Valin, Treonin, Treonin, İzölösün, Prolin, Alanin, Prolin) dizisi belirlenmiştir (Vaccine Research Institute, San Diego, USA). Bu dizi, sığır fibronectini heparin II bağlanma bölgesi (Hep II) FNIII 12 tekrar modülü ile tamamen aynı pozisyonda bulunmuştur. Tüm bu veriler, GST-MisL proteininin, fibronectinin Hep-II domainine bağlandığına işaret etmektedir.

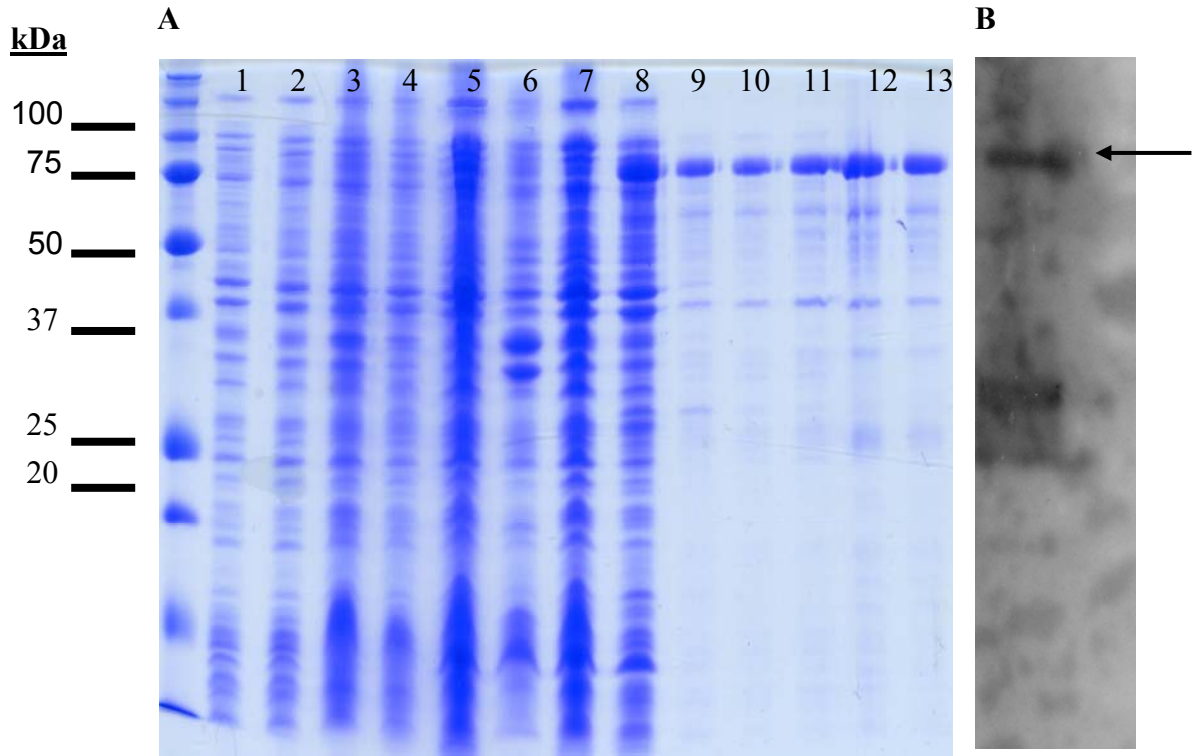


Şekil 4.19 GST-MisL füzyon proteininin fibronektin fragmentlerine bağlanma özgülüğü

Termolitik FN fragmentlerinin (0.004 mg) GST-MisL (A) ve GST (B) ile verdiği reaksiyon. Commasie brilliant blue boyası ile boyanan jellerde termolitik fragmentlerin görünümü (C)

MisL ototransporter proteininin fibronektin Hep-2 domainine bağlandığının kesin bir şekilde kanıtlanması için, ikinci aşamada doza bağlı bağlanma karakteristikleri incelenmiştir. FNIII 10 ile FNIII 15 fragmentlerini içeren ve histidin ile işaretli olan Hep-2 bölgesi, rekombinant plazmid pTRC HisC'ye sahip bir *E. coli* suşu kullanılarak saflaştırılmıştır (Kapila vd. 1997). Hep II, *E. coli* suşunun IPTG varlığında indüksiyonu sonucu üretilmiş ve 6xHis-tag füzyon proteini NiNTA agaroz kolonlar kullanılarak kazanılmıştır. 6xHis-tag Hep-2 bölgesinin farklı saflaştırmalar ile elde edilen fraksiyonları Şekil 4.20.a.b'de görülmektedir. Son aşamada elde edilen saflaştırılmış Hep-II bölgesi 75 kDa moleküler büyüklükte belirlenmiştir. Western lekeleme yöntemi

sonucunda aynı zamanda, saflaştırılan bölgenin Hep-2 bölgesi olduğu, primer antibadi olarak anti-His antiserum ve sekonder antibadi olarak monoklonal anti-fare/tavşan IgG (Jackson ImmunoReserach, Madison, USA) kullanılmak suretiyle elde edilen sinyal sonucu tanımlanmıştır (Şekil 4.20.b).



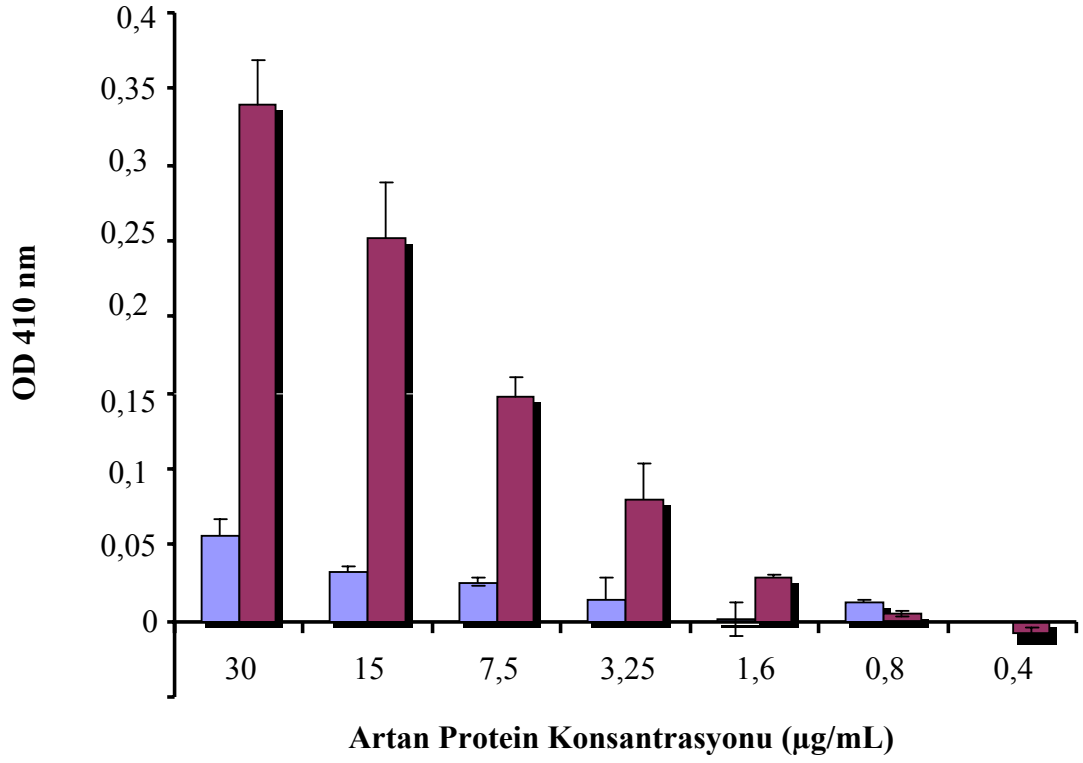
Şekil 4.20.a. Saflaştırma işlemine tabi tutulan 6xHis-tag FNIII 10-15 füzyon proteininin farklı aşamalarındaki fraksiyonlarının SDS-PAGE, b. Western lekeleme sisteminde izlenmesi

Hatlar; (1) ve (2): *E. coli* DH5 α / pTRC HisC suşunun IPTG ile indüksiyondan önceki toplam protein içerikleri; (3) ve (4): *E. coli* DH5 α / pTRC HisC suşunun IPTG ile 3 saat indüksiyondan sonrasındaki toplam protein içerikleri; (5): çözünmeyen fraksiyon; (6): çözünen fraksiyon; (7); akış fraksiyonu; (8 and 9) yıkama fraksiyonları; (10- 13) saflaştırılan fraksiyonlar (a). Saflaştırılan proteinin Western lekeleme analizi; lekeler, bir anti- His antibadi ve alkali fosfataz ile konjuge edilen bir anti-fare/tavşan antibadi kullanılarak elde edilmiştir (b)

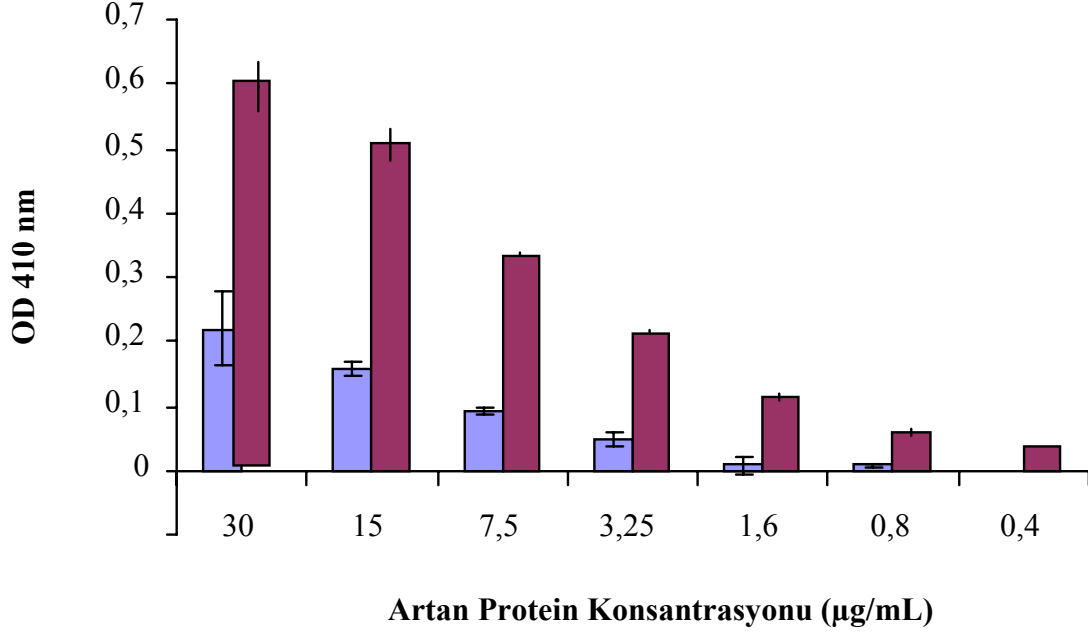
GST-MisL proteininin fibronektinin Hep-2 bölgesine bağlanma özgülüğünün belirlenmesi amacı ile yürütülen katı faz bağlanma denemelerinde 6xHis-tag FNIII 10-15 füzyon proteini kullanılmıştır. Bu deneme kısaca, ya kuyu başına 2 μ g fibronektin (Kontrol, Şekil 4.21.a) ya da kuyu başına 2 μ g saflaştırılmış 6xHis-tag Hep-2 bölgesi (Şekil 4.21.b) ile kaplanmış 96 kuyucuklu plakalarda yürütülmüştür. Bağlanma, artan

konsantrasyonlarda GST-MisL ya da GST kullanımı sonucu ELISA okuyucu (American Instrument Exchange Inc.Haverhill, MA, USA) sistemlerinde tespit edilmiştir. Denemelerde GST-MisL ve GST proteinlerinin belirlenmesi için GST antiserum kullanılmıştır. Şekil 4.21.a.b, GST- MisL füzyon proteininin fibronektine ve fibronektinin Hep-II bölgesine özgül bir şekilde ve doz artışı ile paralel bir şekilde daha yüksek ilgi ile bağlandığına, ancak GST için aynı özgüllüğü göstermediğine işaret etmektedir. Bu veriler de MisL'in fibronektinin Hep-II bölgesine özgül bir şekilde bağlandığını kesin bir şekilde kanıtlamaktadır.

Fibronektinin Hep-II domaini fibronektinin fokal adhezyonunu ve aktin stres fibrillerinin oluşumunu kontrol etmektedir. Değişik patojen bakterilerin virulanslığında rol alan yapısal elemanların, konakçı sistemlerde fibronektinin Hep-II domaini ile ilişkileneren hücre işgalinin ilk aşaması olan epitel dokuya tutunmayı gerçekleştirdiği bilinmektedir (Pozzi vd. 2009, Wolfram vd. 2009, Singh vd. 2010). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar *S. Typhimurium* tarafından üretilen MisL ototransporter proteininin fibronektinin Hep-II domainine bağlandığını gösteren ilk bulgulardır. Çalışmamızda elde edilen bu sonuç, MisL ototransporter proteininin, yukarıda tanımlanan özgül protein-protein interaksyonu nedeni ile, *S. Typhimurium* patojenitesinde çok önemli bir fonksiyon üstlendiğini göstermektedir.



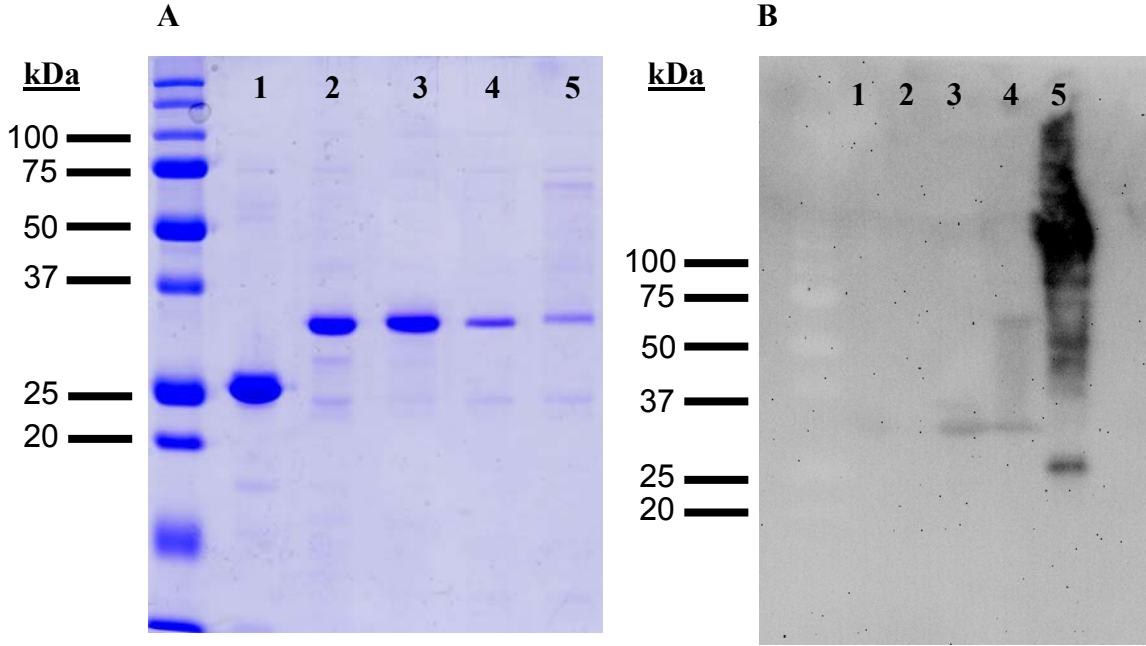
Şekil 4.21.a. GST (Mavi) ve GST-MisL (kırmızı) proteinlerinin artan konsantrasyonlarının fibronektine (2 µg/mL) bağlanma etkinlikleri



Şekil 4.21.b. GST (Mavi) ve GST-MisL (kırmızı) proteinlerinin artan konsantrasyonlarının saflaştırılmış 6xHis-tag Hep-2 bölgesine (2 µg/mL) bağlanma etkinlikleri

4.4.3 MisL proteininin Hep-2 domaini içerisindeki bağlanma bölgesinin haritalanması

Fibronektinin Hep-2 bölgesi; 4 farklı modül içermektedir. Bunlar; FNIII 10, FNIII 12, FNIII 13 ve FNIII 14 olarak adlandırılmaktadır (Singh vd. 2010). MisL proteininin Hep-2 bölgesinde yer alan bu modüllere bağlanma aktivitesinin belirlenmesi için, söz konusu modüllerin GST-füzyonlarını içeren *Escherichia coli* K-12 suşu kullanılmıştır. Hep-II bağlanma bölgesi modülleri, glutatyon sefaroz kolonlarda saflaştırılmış ve son fraksiyonlar SDS-PAGE sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.22.a). Western blot analizleri ise anti-FN antiserum, kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.22.b) .

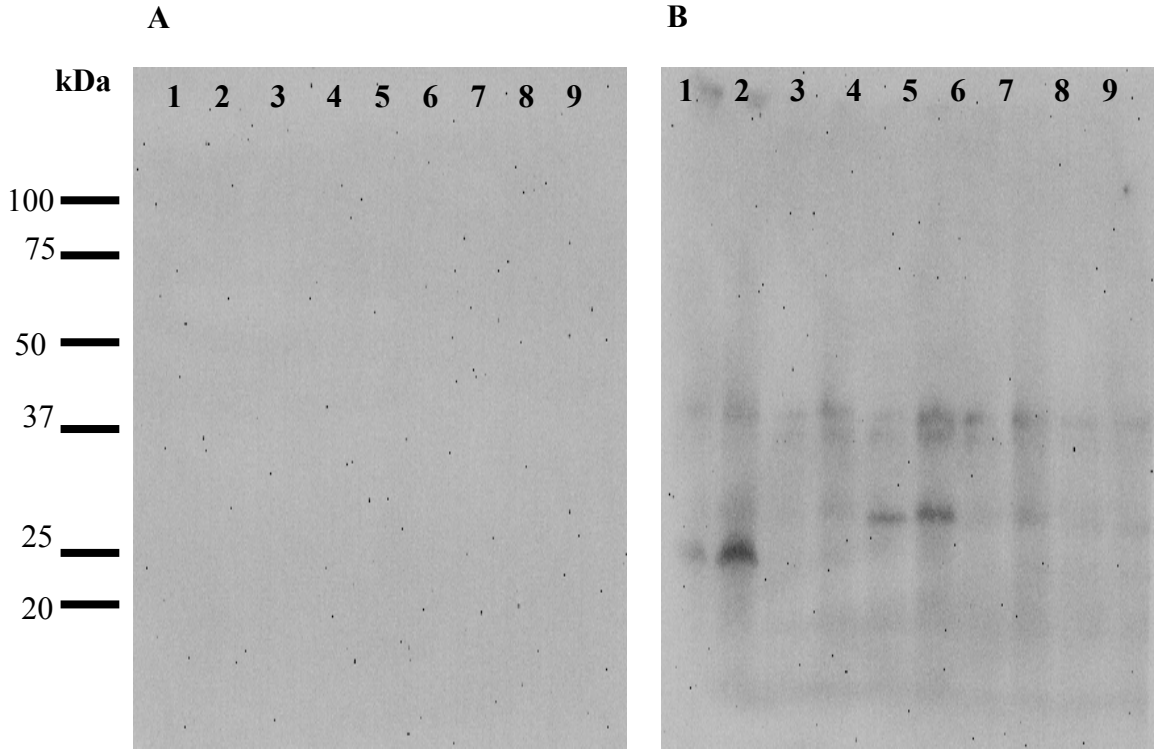


Şekil 4.22 Saflaştırılan fibronektin füzyon proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü

A; hat 1: GST; 2: GST- FNIII 10; 3: GST- FNIII 12; 4: GST- FNIII 13; 5: GST- FNIII 14) ve Western lekeleme yöntemi ile tanımlanması (B; hat 1: GST-FNIII 10; 2, GST- FNIII 12; 3: GST- FNIII 13; 4: GST- FNIII 14; 5: tam fibronektin

Saflaştırılan fibronektin füzyon proteinleri yürütülen beraber çöktürme denemesinde *S. Typhimurium* FB4 ve FB5 (MisL proteininin üretiminin indüksiyonu için bu bakteriler % 0.02 arabinoz varlığında geliştirilmiştir) kullanılmıştır. Her bir kültür GST- FNIII 10, GST- FNIII 12, GST- FNIII 13 ve GST- FNIII 14 (her biri 0.05 mg) ile muamele edilmiştir. Denemede kontrol olarak kültürler GST (0.05 mg) ile muamele edilmiş ve hücreler çöktürülerek toplanmıştır. Hücrelerle beraber çöken fibronektin füzyon proteinlerinin belirlenmesinde anti-FN ve anti-GST antiserumları kullanılmıştır. Bu deneme sonucunda ne *S. Typhimurium* FB4 ne de FB5 hiç bir fibronektin füzyon proteinine (Şekil 4.23.a) ve GST proteinine (Şekil 4.23.b) spesifik bağlanma göstermemiştir. GST için belirlenen bantlar büyük olasılıkla spesifik olmayan bağlanmaya işaret etmektedir.

Tüm bu bulgular, fibronektinin Hep-II domaininin değişik modüllerinin değil, tümünün birlikte MisL spesifik bir bağlanma içerdiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.23 GST, GST- FNIII 10, GST-FNIII 12, GST-FNIII 13 ya da GST-FNIII 14'in % 0.02 L-arabinoz varlığında ve düşük tuz konsantrasyonunda geliştirilen *S. Typhimurium* FB4 (hatlar; 1,3,5,7,9) ve FB5 (hatlar; 2,4,6,8,10) suşlarında bağlanma karakteristikleri

Toplam hücre lizatları SDS-PAGE sisteminde ayrılmış ve GST-FN proteinlerinin bu hücre lizatlarına bağlanma karakteristikleri, anti-FN antiserum (A) ve anti-GST antiserum (B) kullanılarak Western lekeleme yöntemi ile belirlenmiştir

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında elde edilen bulguların evrensel bilime katkısını aşağıdaki başlıklar altında toplamak olasıdır.

1. MisL ototransporter proteini gibi, patojen bakterilerin virülanslığında rol oynayan ancak, *in vitro* kültür koşullarında üretilmeyen proteinlerin homolog konakçılarda üretiminde; katabolit indüksiyonu yapılabilen promotörlere sahip salgı vektörlerine, üretimi istenilen proteinin pozitif regülatörünün klonlanması ve hedef konakçıya aktarımı stratejisi, başarılı bir şekilde uygulanabilir. Bu sayede üretilen proteinin genetik organizasyonuna bir müdahale bulunmaksızın, *in vivo* koşullar taklit edilebilir. Bu da söz konusu proteinin katıldığı fizyolojik süreçlerin ve kontrol ettiği fenotipin tanımlanmasında önemli avantajlar sağlamaktadır.
2. Yukarıda ifade edilen strateji kullanılarak, MisL ototransporter proteininin hücre yüzeyine salgılanan bir protein olduğu ve ekzopolisakkaritlerle ilişkilenecek *S. Typhimurium* hücre zarfının en dış tabakasını oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, MisL'in de AIDA ailesi ototransporter proteinler ile ortak davranış gösterdiğinin ve patojen-konakçı ilişkisinde rol aldığının yeni bir kanıtıdır.
3. MisL ototransporter proteininin pozitif transkripsiyonel regülatörü olan *marT* geninin, *S. Typhimurium*'daki diğer regülasyon karakteristikleri mikrodizin analizleri sonucu belirlenmiş ve bu regülatörün virülanslığı baskılayan bazı genlerin negatif, konakçı sisteme giriş sonucu oluşan stres faktörlerine adaptasyonda rol oynayan bazı genlerin ise pozitif regülatörü olduğu saptanmıştır. Özetle, *marT* *S. Typhimurium*'da global bir regülatördür. Çalışmamızda ilk kez tespit edilen bu özellik, *Salmonella* enfeksiyonunun anlaşılması ve kontrolüne yeni boyutlar kazandıracak nitelikte öneme sahiptir. Bu bulgular, *marT* geni bakımından mutant suşlarla konakçı sistemlerde yürütülecek çalışmalara ışık tutacaktır. Diğer yandan, enterik bakterilerde *marT* homologlarının tespiti ve bunların regülasyon karakteristiklerinin belirlenmesi,

söz konusu mikroorganizmalarda patojenitenin evriminin açıklanmasına yeni boyutlar kazandıracaktır.

4. MisL ototransporter proteininin patojen-konakçı ilişkisinde rol aldığı, daha önceden de öngörülmekle birlikte, bugüne kadar moleküler kanıtlarla ortaya konulmamıştır. Çalışmamızda, MisL ototransporter proteininin epitel doku bağ materyali fibronektine, protein-protein interaksyonu ile bağlandığı ve bu bağlanmada fibronektin proteininde yer alan glikan grupların bir rolü olmadığı belirlenmiştir. Detaylandırılan analizlerde ise, MisL ototransporter proteininin fibronektin bağlanma bölgesinin, bu proteinin yapısında bulunan heparin II (Hep-II) domaini üzerinde olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen bu bulgular, *S. Typhimurium* konakçı sisteme dahil olduğunda, bağırsak epitel hücrelerine tutunma mekanizmasının tanımlanmasında anahtar rol oynayacak nitelik taşımaktadır. Zira çalışmamızda MisL proteininin hücre yüzeyine salgılandığında fimbriya yapılarını maskeleyecek şekilde organize olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, MisL proteininin epitel dokuya tutunmada fimbriya yapılarından daha önemli bir görev gördüğüne işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P. and O'Connor, C.D. 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics*, 1, 597-607.
- Alteri, C.J., Smith, S.N. and Mobley, H.L.T. 2009. Fitness of *Escherichia coli* during Urinary Tract Infection Requires Gluconeogenesis and the TCA Cycle. *PLoS Pathogens*, 5, e1000448.
- Astrof, S., Crowley, D., George, E.L., Fukuda, T., Sekiguchi, K., Hanahan, D. and Hynes, R.O. 2004. Direct test of potential roles of EIIIA and EIIB alternatively spliced segments of fibronectin in physiological and tumor angiogenesis. *Molecular Cell Biology*, 24, 8662–8670.
- Astrof, S., Crowley, D. and Hynes, R.O. 2007. Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Developmental Biology*, 311, 11-24.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. Volume 1. John Wiley & Sons Inc. USA. Unit 2.
- Barker, C.S., Meshcheryakova, I.V., Kostyukova, A.S. and Samatey, F.A. 2010. FliO Regulation of FliP in the Formation of the *Salmonella enterica* Flagellum. *PLoS Genetics*, 6(9), e1001143.
- Barnhart, M.M. and Chapman, M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131–147.
- Baumler, A.J., Tsois, R.M., Bove, F.A., Kusters, J.G., Hoffmann, S. and Heffron, F. 1996a. The *pef* fimbrial operon of *S. Typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infection and Immunity*, 64, 61-68.
- Baumler, A.J., Tsois, R.M. and Heffron, F. 1996b. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *S. Typhimurium*. *Infection and Immunity*, 64, 61-68.
- Baumler, A.J., Tsois, R.M., Van der Velden, A., Stojilkovic, I. and Heffron, F. 1996c. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Journal of Bacteriology*, 183, 207-213.
- Bershadsky, A.D., Balaban, N.Q. and Geiger, B. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 677-695.

- Beuzon, C.R., Meresse, S. and Unsworth, K.E. 2000. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of sifA. *EMBO Journal*, 19, 3235-3249.
- Blanc-Potard, A.B. and Groisman, E.A. 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO Journal*, 16, 5376-5385.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J. and Groisman, E.A. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 181, 998-1004.
- Boekema, B.K.H.L., Van Putten, J.P.M., Stockhofe-Zurwieden, N. and Smith, H.E. 2004. Host cell contact-induced transcription of the Type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 72(2), 691-700.
- Bolton, A.J., Osborne, M.P. and Stephen, J. 2000. Comparative study of the invasiveness of *Salmonella* serotypes Typhimurium, Choleraesuis and Dublin for Caco-2 cells, HEp-2 cells and rabbit ileal epithelia. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 503-511.
- Bordes, P., Bouvier, J., Conter, A., Kolb, A. and Gutierrez, C. 2002. Transient repressor effect of Fis on the growth phase-regulated osmE promoter of *Escherichia coli* K12. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(2), 206-13.
- Bourzac, K.M. and Guillemin, K. 2005. *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cellular Microbiology*, 7(7), 911-919.
- Bueno, S.M., Wozniak, A., Leiva, E.D., Riquelme, S.A., Carreno, L.J., Hardt, W.D., Riedel, C.A. and Kalergis, A.M. 2010. *Salmonella* pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology*, 130, 273-287.
- Burkholder, K.M. and Bhunia, A.K. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Gut Pathogens*, 1, 14.
- Camacho, E.M. and Casadesus, C. 2002. Conjugal Transfer of The Virulence Plasmid of *Salmonella enterica* is Regulated by The Leucine-Responsive Regulatory Protein and DNA Adenine Methylation. *Molecular Microbiology*, 44: 1589-1598.
- Cano, D.A., Domínguez-Bernal, G., Tierrez, A., Portillo, F. G. and Casadesu's, J. 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene igaA. *Genetics*, 162, 1513-1523.

- Carter, J.A., Blondel, C.J., Zaldivar, M., Alvarez, S.A., Marolda, C.L., Valvano, M.A. and Contreras, I. 2007. O-antigen modal chain length in *Shigella flexneri* 2a is growth-regulated through RfaH-mediated transcriptional control of the *wzy* gene. *Microbiology*, 153, 3499–3507.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. and Hensel, M. 2002. *Salmonella* pathogenicity Island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *Journal of Experimental Medicine*, 195, 1155-1166.
- Chelsky, D. and Dahlquist, R.W. 1980. Structural studies of methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*: evidence for multiple methylation sites. *PNAS USA*, 77, 2434-2438.
- Chessa, D., Dorsey, C.W., Winter, M.G. and Baumler, A.J. 2008b. Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *Journal of Biological Chemistry*, 28, 8118-8124.
- Chessa, D., Winter, M.G., Nuccio, S.P., Tükel, C. and Baumler, A.J. 2008a. *RosE* represses fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 68, 573-587.
- Chilcott, G.S. and Hughes, K.T. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 694–708.
- Choi, J., Shin, D., Yoon, H., Kim, J., Lee, C.R., Kim, M. and Seok, Y.J. 2010. *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIA^{NTR}-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *PNAS*, doi: 1000759107.
- Coldham, N.G., and Woodward, M.J. 2004. Characterization of the *Salmonella typhimurium* proteome by semi-automated two dimensional HPLC-mass spectrometry: detection of proteins implicated in multiple antibiotic resistance. *Journal of Proteome Research*, 3, 595–603.
- Coombes, B.K., Coburn, B.A., Potter, A.A., Gomis, S., Mirakhur, K. and Li, Y. 2005. Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infection and Immunity*, 73(11), 7161-7169.
- Dagert, M. and Erlich, S.D. 1979. Prolonged Incubation in Calcium Chloride Improves The Competence of *Escherichia coli* Cells. *Gene*, 6, 23-28.
- Danese, P.N. and Silhavy, T.J. 1998. CpxP, a Stress-Combative Member of the Cpx Regulon. *Journal of Bacteriology*, 180 (4), 831–839.
- Desvaux, M., Parham, N.J. and Henderson, I.R. 2004. The autotransporter secretion system. *Research in Microbiology*, 155, 53–60.

- Dieye, Y., Ameiss, K., Mellata, M., and Curtiss, R.III. 2009. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI) 1 contributes more than SPI-II to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol*, **9**(1), 3. doi:10.1186/1471-2180-9-3. PMID:19126220.
- Domka, J., Lee, J. and Wood, T.K. 2006. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 2449-2459.
- Dorsey, C.W., Laarakker, M.C., Humphries, A.D., Weening, E.H. and Baumler, A.J. 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Molecular Microbiology*, **57**, 196–211.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J. and Goebel, W. 2010. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 401-412.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A. and Furtmary, H. 1981. Shapes, domain organization and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *Journal of Molecular Biology*, **150**, 97-120.
- Erickson, H.P. 1994. Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *PNAS USA*, **91**, 10114-10118.
- Eriksson, S., Chambers, B.J. and Rhen, M. 2003. Nitric oxide produced by murine dendritic cells is cytotoxic for intracellular *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *Scandinavian Journal of Immunology*, **58**, 493–502.
- Fitzgerald, C., Sherwood, R., Gheesling, L.L., Brenner, F.W. and Patricia, I. 2003. Fields molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(10), 6099–6105.
- Frye, J., Karlinsey, J.E., Felise, H.R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M. and Hughes, K.T. 2006. Identification of flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **188**, 2233-2243.
- Frye, J.G., Jesse, T., Long, F., Rondeau, G., Porwollik, S., McClelland, M., Jackson, C.R. and Englen, M. 2007. DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **27**, 138–151.
- Galan, J.E and Curtiss R.III. 1989. Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella* Typhimurium. *Microbial Pathogenesis*, **6**(6), 433-43.
- Galan, J.E. 2001. *Salmonella* interactions with host cells: Type III secretion at work. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, **17**, 53–86.

- Galan, J.E. 2008. Energizing Type III secretion machines: what is fuel?. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15, 127-128.
- Gee, E.P., Ingber, D.E. and Stultz, C.M. 2008. Fibronectin unfolding revisited: modeling cell traction-mediated unfolding of the tenth type-III repeat. *PLOS One*, 3, e2373.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. and Lithgow, T. 2004. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *Journal of Cell Biology*, 164, 19–24.
- Gentschev, I., Dietrich, G. and Goebel, W. 2002. The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends in Microbiology*, 10, 39–45.
- Gerlach, R.G. and Hensel, M. 2006. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 401–415.
- Gerlach, R.G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A. and Hardt, W.D. 2007. *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiology*, 9(7), 1934-1950.
- Ghigo, J.M. and Wandersman, C. 1992. Cloning, nucleotide sequence and characterization of the gene encoding the *Erwinia chrysanthemi* B374 PrtA metalloprotease: a third metalloprotease secreted via a C-terminal secretion signal. *Molecular Genetics and Genomics*, 236, 135–144.
- Gibson, D.L., White, A.P., Rajotte, C.M. and Kay, W.W. 2007. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology*, 153, 1131-1140.
- Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C. and Azadi, P. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188, 7722–7730.
- Griffith, K.L. and Wolf, R.E. 2002. Measuring β -Galactosidase Activity in Bacteria: Cell Growth, Permeabilization, and Enzyme Assays in 96 Well Arrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 397-402.
- Groisman, E.A. and Ochman, H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, 87, 791–94.
- Gunzel, D., Kucharski, L.M., Kehres, D.G., Romero, M.F. and Maguire, M.E. 2006. The MgtC virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na⁺,K⁺-ATPase. *Journal of Bacteriology*, 188, 5586–5594.

- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *Journal of Bacteriology*, 177, 4121–4130.
- Hagglund, P., Matthiesen, R., Elortza, F., Højrup, P., Roepstorff, P., Jensen, O.N. and Bunkenborg, J. 2007. An enzymatic deglycosylation scheme enabling identification of core fucosylated N-glycans and O-glycosylation site mapping of human plasma proteins. *Journal of Proteome Research*, 6(8),3021-31.
- Halsey, T.A., Vazquez-Torres, A., Gravdahl, D.J., Fang, F.C. and Libby, S.J. 2004. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. *Infection and Immunity*, 72, 1155–1158.
- Hamilton, S., Bongaerts, R.J., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., Lappin-Scott, H.M. and Hinton, J.C.D. 2009. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, 10, 599.
- Harlow, E. and Lane, D. 1999. *Using Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Helms, M., Etherlberg, S. and Molbak, K. 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 859-867.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. and Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 692–744.
- Henderson, I.R. and Nataro, J.P. 2001. Virulence Functions of Autotransporter Proteins, *Infection and Immunity*, 69(3), 1231-1243.
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E.A. and Ochman, H. 2010. Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *Journal of Bacteriology*, 192, 560-567.
- Jeyaseelan, K. and Guest, J.R. 1980. Isolation and properties of pyruvate dehydrogenase complex mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of General Microbiology*, 120(2), 385-392.
- Kana, B.D., Weinstein, E.A., Avarbock, D., Dawes, S.S., Rubin, H. and Mizrahi, V. 2001. Characterization of the *cydAB*-Encoded Cytochrome *bd* Oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 83(24), 7076-7086.
- Kapila, Y.L., Niu, J., and Johnson, P.W. 1997. The high affinity heparin-binding domain and the V region of fibronectin mediate invasion of human oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18932–18938.

- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M. and Boor, K.J. 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 527–543.
- Kim, W. and Surette, M.G. 2003. Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biological Procedures Online*, 5, 189–196.
- Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M.E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C.A., Heyderman, R.S. and Dougan, G. 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Research*, 19(12), 2279-2287.
- Kirithi, N., Roy-Chaudhuri, B., Kelley, T. and Culver, G.M. 2006. A novel single amino acid change in small subunit ribosomal protein S5 has profound effects on translational fidelity. *RNA*, 12, 2080-2091.
- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I. and Koronakis, V. 1995. Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC domain mutants of HlyB. *Molecular Microbiology*, 16, 87–96.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lawrenz, M.B., Lenz, J.D. and Miller, V.L. 2009. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infection and Immunity*, 77, 317-326.
- Lee, C.A., Silva, M., Siber, A.M., Kelly, A., Galyov, J.E. and McCormick, B.A. 2000. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *PNAS*, 97(22), 12283-12288.
- Liao, H.I., Olson, C.A., Hwang, S., Deng, H., Baric, R.S., Roberts, R.W., Sun, R. and Baric, R.S. 2009. mRNA display design of fibronectin-based intrabodies that detect and inhibit severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 17512-17520.
- Libby, S.J., Goebel, W., Ludwig, A., Buchmeier, N., Bowe, F., Fang, F.C., Guiney, D.G., Songer, J.G. and Heffron, F. 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *PNAS USA*, 91, 489-493.
- Lucas, R.L. and Lee, C.A. 2000. Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella* typhimurium. *Molecular Microbiology*, 36, 1024-1033.

- Maqueda, A., Moyano, J.V., Hernandez Del Cerro, M., Peters, D.M. and Garcia-Pardo, A. 2007. The heparin III-binding domain of fibronectin (III 4-5 repeats) binds to fibronectin and inhibits fibronectin matrix assembly. *Matrix Biology*, 26, 642-651.
- Marathe, S.A., Ray, S. and Chakravorty, D. 2010. Curcumin increases the pathogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine model. *PLOS One*, 5, e11511.
- Matiasovicova, J., Adams, P., Barrow, P. A., Hradecka, H., Malcova, M., Karpiskova, R., Budinska, E., Pilousova, L. and Rychlik, I. 2007. Identification of putative ancestors of the multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 clone harboring the *Salmonella* genomic island 1. *Archives in Microbiology*, 187, 415–424.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P. and Courtney, L. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413, 852–856.
- Marcado-Lubo, R., Leatham, M.P., Conway, T. and Cohen, P.S. 2009. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Mutants Unable To Convert Malate to Pyruvate and Oxaloacetate Are Avirulent and Immunogenic in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*, 77, 1397-1405.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. Pp: 352-355 (466p).
- Mirolid, S., Rabsch, W. and Rohde, M. 1999. Isolation of a temperate bacteriophage Encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* Typhimurium strain. *PNAS USA*, 96, 9845-9850.
- Monack, D.M., Detweiler, C.S. and Falkow, S. 2001. *Salmonella* pathogenicity Island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine Protease Caspase-1. *Cell Microbiol*, 3, 825-837.
- Morgan, E., Bowen, A.J., Carnell, S.C., Wallis, T.S. and Stevens, M.P. 2007. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infection and Immunity*, 75(3), 1524-1533.
- Morgan, E., Campbell, J.D., Rowe, S.C., Bispham, J., Stevens, M.P. and Bowen, A.J. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 54, 994–1010.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *PNAS*, 95, 6181–6186.

- Ngwai, Y.B., Adachi, Y., Ogawa, Y. and Hara, H. 2006. Characterization of biofilm-forming abilities of antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 on hydrophobic abiotic surfaces. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 39(4), 278-291.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. and Sugino, Y. 1990. A Rapid and Highly Efficient Method for Preparation of Competent *Escherichia coli* Cells. *Nucleic Acids Research*, 18, 6169.
- O'Connor, M., Gregory, S.T. and Dahlberg, A.E. 2004. Multiple defects in translation associated with altered ribosomal protein L4. *Nucleic Acids Research*, 32(19), 5750–5756.
- Ohl, M.E. and Miller, S.I. 2001. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259-274.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. and Gros, P. 2004. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO Journal*, 23, 1257-1266.
- Park, E., Jeon, G.I., Park, J.S. and Paik, H.D. 2007. A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 569-574.
- Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. 2004. Characterisation of *Salmonella enterica* subpecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology*, 186, 5883-5898.
- Pozzi, A., Voziyan, P.A., Hudson, B.G. and Zent, R. 2009. Regulation of matrix synthesis, remodeling and accumulation in glomerulosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1318–33.
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tükel, Ç., Akçelik, M. and Baumler, A.J. 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity*, 74, 19-27.
- Raffatellu, M., Wilson, R.P., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H., Tran, Q.T. and Lawhon, S. 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 73, 146–154.
- Raghunathan, A., Reed, J., Shin, S., Palsson, B. and Daefler, S. 2009. Constriction-based analysis of metabolic capacity of *Salmonella typhimurium* during host-pathogen interaction. *BMC Systems Biology*, 3, 38.
- Raivio, T.L., Laird, M.W., Joly, J.C. and Silhavy, T.J. 2000. Tethering of CpxP to the inner membrane prevents spheroplast induction of the Cpx envelope stress response. *Molecular Microbiology*, 37 (5), 1186-1197.

- Rescigno, M., Urbano, M. and Valzasina, B. 2001. Dendritic cells Express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2, 361-367.
- Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., Villagra, N.A., Morgado, J. and Mora, G.C. 2010. Modified intracellular-associated phenotypes in a recombinant *Salmonella* Typhi expressing *S. Typhimurium*SPI-3 sequences. *PLOS One*, 5 (2), e9394 doi: 10.1371/journal.pone.0009394.
- Salonen, E.M., Vartio, T., Miggiano, V., Stahl, C., Tacacs, B., Virgallita, G., De Petro, G., Barlati, S. and Vaheri, A. 1984. A rapid highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay specific for human fibronectin using a characterized monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*, 3, 154-156.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor, New York, USA*.
- Sanderson, K. and Roth, J. 1983. Linkage Map of *Salmonella typhimurium*, Edition VI. *Microbiological Reviews*, 47, 410-453.
- Santiviago, C.A., Reynolds, M.M., Porwollik, S., Choi, S.H., Long, F., Andrews-Polymenis, H.L. and McClelland, M. 2010. Analyses of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLOS Pathogens*, 5 (7), e1000477.
- Santos, R.L., Raffatellu, M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tukel, C., Tsolis, R.M. and Baumler, A.J. 2009. Life in inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in Microbiology*, 17 (11), 498-506.
- Scaria, J., Palaniappan, U.M., Ckiu, D., Phan, J.A., Ponnala, L., McDonough, P., Grohn, Y.T., Porwollik, S., McClelland, M., Chiou, C.S., Chu, C. and Chang, Y.F. 2008. Microarray for molecular typing of *Salmonella enterica* serovars. *Molecular and Cellular Probes*, 22, 238–243.
- Sechler, J.L., Rao, H., Cumiskey, A.M., Vega-Colon, I. and Smith, M.S. 2001. A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. *Journal of Cell Biology*, 154, 1081-1088.
- Sekiguchi, K. and Hakomori, S. 1980. Functional domain structure of fibronectin. *PNAS USA*, 77, 2661-2665.
- Shultis, D.D., Purdy, M.D., Banchs, C.N. and Wiener, M.C. 2006. Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science*, 312:1396–1399.

- Singh, P., Carraher, C. and Schwarzbauer, J.E. 2010. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 397–419.
- Singleton, P. and Sainsbury, D. 1996. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. John Wiley and Sons. 2nd Edition.
- Sonck, K.A.J., Kint, G., Schoofs, G., VanderWauven, C., Vanderleyden J. and De Keersmaecker, S.C.J. 2009. The proteome of *Salmonella* Typhimurium grown under *in vivo*-mimicking conditions. *Proteomics*, 9, 565–579.
- Srivatsan, A., Han, Y., Peng, J., Tehranchi, A.K., Gibbs, R., Wang, J.D. and Chen, R. 2008. High-Precision, Whole-Genome Sequencing of Laboratory Strains Facilitates Genetic Studies, *PLoS Genet*, 4(8):e1000139. doi:10.1371/journal.pgen.1000139.
- Srivatsan, A. and Wang, J.D. 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 100-105.
- Stelzl, U., Connell, S., Nierhaus, K.H. and Wittmann-Liebold, B. 2001. Ribosomal Proteins: Role in Ribosomal Functions. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-12.
- Strauss, E.J. 1995. When a turn off is a turn on. *Current Biology*, 5, 706–709.
- Suar, M., Jantsch, J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T. and Barrow, P.A. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infection and Immunology*, 74(1), 632–644.
- Tan, M.H., Sun, Z., Opitz, S.L., Schmidt, T.E., Peters, J.H. and George, E.L. 2004. Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis. *Blood*, 104, 11–18.
- Tawa, P. and Stewart, R.C. 1994. Mutational activation of CheA, the protein kinase in the chemotaxis system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 176 (14), 4210-4218.
- Thanassi, D.G., Saulino, E.T. and Hultgren, S.J. 1998. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 223-231.
- Tindall, B.J., Grimant, P.A.D., Garrity, G.M. and Guzeby, J.P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 521-554.

- Tsolis, R., Bäumlér, A.J., Stoljilkovic, I. and Heffron, F. 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron regulated genes. *Journal of Bacteriology*, 177, 4628–4637.
- Turner, A.K., Lovell, M.A., Hulme, S.D., Zhang, B.L. and Barrow, P.A. 1998. Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infection and Immunity*, 66, 2099-2106.
- Tükel, Ç., Akçelik, M., de Jong, M.F., Şimşek, Ö., Tsolis, R.M. and Baumler, A.J. 2007. MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3922-3926.
- Tükel, Ç., Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Akçelik, M. and Baumler, A.J. 2006. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat?. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(3), 320–329.
- Tükel, Ç., Raffatellu, M., Humphries, A.D., Wilson, R.P., Andrews-Polymenis, H.L. and Gull, T. 2005. CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Molecular Microbiology*, 58, 289–304.
- Unsworth, K.E., Way, M., McNiven, M., Machesky, L. and Holden, D.W. 2004. Analysis of the mechanisms of *Salmonella*-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. *Cellular Microbiology*, 6, 1041–1055.
- Uthe, J.J., Royaeae, A., Lunney, J.K., Stabel, T.J., Zhao, S.H., Tuggle, C.K. and Bearson, S.M.D. 2007. Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Molecular Immunology*, 44, 2900–2914.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Brown, W., Le, M., Breggen, R., Parks, T. and Fang, F.C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* via CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401, 804-808.
- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M. and Dinauer, M.C. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*, 287, 1655–1658.
- Voetsch, A., Thomas, C., Van Gilder, J., Angulo, F., Monica, J. and Farley, M. 2004. The Emerging Infections Program FoodNet Working Group, FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3), 127–34.
- Wain, J., House, D., Zafar, A., Baker, S., Nair, S. and Kidgell, C. 2005. Vi Antigen Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clinical Isolates from Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1158–1165.

- White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Banser, P.A. and Kay, W.W. 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185, 5398-5407.
- White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W. and Surette, M.G. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 188, 3219–3227.
- White, A.P., Weljie, A.M., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R., Vogel, H.J. and Surette, M.G. 2010. A Global Metabolic Shift Is Linked to *Salmonella* Multicellular Development. *PLOS One*, 5(7), e11814.
- Wilson, R.P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S.E., Tükel, Ç., Baumler, A.J. 2008. The Vi capsule prevents toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular Microbiology*, 10, 876-890.
- Wolfram, D., Tzankov, A., Pulzl, P. and Piza-Katzer, H. 2009. Hypertrophic scars and keloids-a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatologic Surgery*, 35, 171–81.
- Xu, J., Bae, E., Zhang, Q., Annis, D.S., Erickson, H.P. and Mosher, D.F. 2009. Display of cell surface sites for fibronectin assembly is modulated by cell adherence to 1 F3 and C-terminal modules of fibronectin. *PLOS One*, 4, e4113.
- Zheng, M., Fang, H. and Hakomori, S. 1994. Functional role of N-glycosylation in Ipha 5 beta 1 integrin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 12325-12331.
- Zhou, D., Chen, L.M., Hernandez, L., Shears, S.B. and Galan, J.E. 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Molecular Microbiology*, 39, 248–259.
- Zhou, D., Mooseker, M.S. and Galan, J.E. 1999. Role of the *Salmonella* actin binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, 283, 2092-2095.
- Zierler, M.K. and Galan, J.E. 1995. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella* Typhimurium invasion protein Inv J. *Infection and Immunity*, 63, 4024–4028.
- Zuniga, M., Comas, I., Linaje, R., Monedero, V., Yebra, M.J., Esteban, C.D., Deutscher, J., Perez-Martinez, A. and Gonzalez-Candelas, G.F. 2009. Horizontal Gene Transfer in the Molecular Evolution of Mannose PTS Transporters. *Molecular Biology and Evolution*, 22(8), 1673–1685.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nefise AKKOÇ
Doğum Yeri: Adana
Doğum Tarihi: 18.11.1983
Medeni Hali: Bekar
Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Adana Fen Lisesi (1998-2001)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2001-2005)
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2005-2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2007-2010).
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2010-)

YAYIN LİSTESİ

SCI Tarafından Taranan Dergilerde Yayımlanan ve Yayın İçin Kabul Edilen Orijinal Araştırma Makaleleri

1. ŞANLIBABA, P., BUZRUL, S., AKKOÇ, N., ALPAS, H., AKÇELİK, M. 2009. Thermal Inactivation Kinetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Bacteriophage pll98-22. Acta Biologica Hungarica. 60: 127-136.
2. ÇÖLERİ, A., ÇÖKMÜŞ, C., ÖZCAN, B., AKKOÇ, N., AKÇELİK, M. 2009. Isolation of a α -Glucosidase-Producing Thermophilic Bacilli From Hot Springs of Turkey. Microbiology. 78: 56-66.
3. AKKOÇ, N., ŞİMŞEK, Ö., AKÇELİK, M. 2009. Determination of Metabolic Plasmids And Their Effects on the Growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MN24. International Journal of Dairy Technology. 62: 118-125.

4. **ŞİMŞEK, Ö., ÇON, A.H., AKKOÇ, M., SARIS, P.E.J., AKÇELİK, M.** 2009. Influence of Growth Conditions on the Nisin Production of Bioengineered *Lactococcus lactis* Strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:481-490.
5. **ŞANLIBABA, P., AKKOÇ, N., AKÇELİK, M.** 2009. Identification and Characterisation of Antimicrobial Activity of Nisin A Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27. *Czech Journal of Food Science*. 27: 55-64.
6. **ŞİMŞEK, Ö., AKKOÇ, M., ÇON, A.H., ÖZÇELİK, F., SARIS, P.E.J., AKÇELİK, M.** 2009. Continuous Nisin Production With Bioengineered *Lactococcus lactis* Strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 863-871.
7. **AKKOÇ, N., AKÇELİK, M., HAZNEDAROĞLU, İ.C., GÖKER, H., TURGUT, M., AKSU, S., KİRAZLI, Ş., FIRAT, H.C.** 2009. In-Vitro Anti-Bacterial Activities of Ankaferd Medicinal Plant Extract. *Türkiye Klinikleri J. Med Sci*. 29: 410-415.
8. **ŞİMŞEK, Ö., BUZRUL, S., AKKOÇ, N., ALPAS, H., AKÇELİK, M.** 2009. Stress Response Kinetics of Two Nisin Producer Strains of *Lactococcus lactis* spp. *Lactis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158: 387-397.
9. **UYMAZ, B., ŞİMŞEK, Ö., AKKOÇ, M., ATAĞLU, H., AKÇELİK, M.** 2009. *In vitro* characterization of probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* BH105 isolated from human faeces. *Annals of Microbiology*. 59: 485-491.
10. **AKKOÇ, N., ÖZDEN, B., TAN, B. G., AKÇELİK, M.** 2009. The Role of stj Fimbrial Operon in the Intestinal Persistence of *Salmonella* Typhimurium in Mice. *Biologia*, 64: 859-863.
11. **KOCA, E. AKKOÇ, N., ŞANLIBABA, P., AKÇELİK, M.** 2010. Nisin Dirençlilik ve Regülasyon Genlerinin Laktisin 481 Üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBLL9 Suşunda Anlatımı. *Kafkas Univ Vet. Fak. Derg.*, 16 (5): 765-769
12. **UYMAZ, B., AKKOÇ, N., AKÇELİK, M.** 2010. Partial Characterization of Bacteriocins Produced by Two *Lactobacillus* Strains with Probiotic Properties. *Acta Biologica Hungarica*. Basımda.

13. GHAMAT, A., AKKOÇ, N., AKÇELİK, M. 2010. Optimization of bacteriocin production of *L. lactis* subsp. *lactis* MA23, a strain isolated from Boza. International Journal of Dairy Technology. Basıma Kabul Edildi.

Sempozyum Tebliğleri

1. ŞİMŞEK, Ö., UYMAZ, B., AKKOÇ, N., YILDIRIM, K., AKÇELİK, M. 2007. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunda Nisin Üretiminin Artırılmasına Yönelik Bir Genetik Yaklaşım. 15. Biyoteknoloji Kongresi (Ekim 2007, Antalya) Bildiri Kitabı, 363-366.
2. AVŞAROĞLU, M.D., AKKOÇ, N., AKÇELİK, M. 2008. *Stj* Fimbrial Operon Has Role on *S. typhimurium* Pathogenicity. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 19-22 April 2008, Barcelona, Spain. P.1303.
3. AVŞAROĞLU, M.D., AKKOÇ, N., GUERRA, B., AKÇELİK, M., BOZOĞLU, F., HELMUTH, R. 2008. Antibiyotik Dirençli *Salmonella enterica* Serotiplerinde Sınıf I İntegronların Varlığının Araştırılması. Türkiye 10. Gıda Kongresi. 21-23 Mayıs, Erzurum. S: 19-22.
4. ŞİMŞEK, Ö., AKKOÇ, N., ÇON, A. H., SARIS, P., AKÇELİK, M. 2008. Nisin Production of Bioengineered *L. lactis* Strains. 9 th. Symposium of Lactic Acid Bacteria. 31 Ağustos-4 Eylül 2008. Egmond aan Zee, The Netherlands. P: E016.
5. AKKOÇ, N., AKÇELİK, M., HAZNEDAROĞLU, İ, C., GÖKER, H., TURGUT, M., AKSU, S., KİRAZLI, Ş., FIRAT, H. C. 2008. Ankaferd Tıbbi Bitki Ekstresinin İn-Vitro Anti-Fungal Etkinliğinin Tanımlanması. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, 8-11 Ekim 2008, Çeşme-İzmir. S: 50.
6. AKKOÇ, N., AKÇELİK, M., HAZNEDAROĞLU, İ, C., S., KİRAZLI, Ş., FIRAT, H. C. 2008. Ankaferd Proteomix Besin Takviyesi ve Ankaferd Sır Kozmetik Preparatının İn-Vitro Anti-Mikrobiyal Etkinliklerinin Karşılaştırılması. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 15-19 Ekim 2008, Antalya. S: 244-245.
7. AKKOÇ, N., ŞANLIBABA, P., AKÇELİK, M. 2008. *Salmonella* Typhimurium'da MisL Ototransporter Proteininin İfadesi. 33. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 21-25 Ekim 2008, Bodrum. S: 644.
8. ÖZKALP, B., AKKOÇ, N., ŞANLIBABA, P., ŞİMŞEK, Ö., AKÇELİK, M. 2009. Çiğ Süt Örneklerindem İzole Edilen *Lactococcus lactis* Suşlarının Antimikrobiyel

Aktiviteleri ve Bakteriyosin Üretme Yetenekleri. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. 21-23 Mayıs, Denizli. S: 30.

9. **ŞİMŞEK, Ö., ÇON, A. H., AKKOÇ, N., SARIS, P.E.J., AKÇELİK, M.** 2009. Over-Expressing Regulation Genes in *Lactococcus lactis* Results High Nisin Production in Continuous Culture. FEMS 2009 (3rd Congress of European Microbiologists), June 28-July 2, Gothenburg, Sweden.
10. **TABAN, M. B., AYTAÇ, S.A., AKKOÇ, N., AKÇELİK, M.** 2010. Antibiotic Resistance Pattern of Salmonella spp. Determined From Ready-to-Eat (RTE) Salads. 15th World Congress of Food Science And Technology. 22-26 August 2010, Capetown/South Africa, P0863.
11. **AKKOÇ, N., GHAMAT, A., ŞANLIBABA, P., AKÇELİK, M.** 2010. Characterization of the Bacteriocin Produced By *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23, Isolated From Boza. 1st International Congress of Food Technology. 03-06 November 2010, Antalya/Turkey. P360. S: 260.

Derleme Makaleler

1. **AKKOÇ, N., AKÇELİK, M.** 2009. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 25: 59-70.
2. **AKKOÇ, N., AKÇELİK, M.** 2009. Genetik Mühendisliği ve Gıda Uygulamaları. Gıda Mühendisleri Odası, Küresel Kriz ve Gıda Güvenliği Paneli Kitabı. S: 7-21.
3. **AKÇELİK, M., AKKOÇ, N.** 2010. Salmonella Patojenitesinin Moleküler Mekanizmaları. Türkiye Klinikleri, Tıp Bilimleri Dergisi. 30: 312-322 (SCI).

Kitap Bölüm Çevirileri

1. **AKÇELİK, M., AKKOÇ, N., ŞİMŞEK, Ö.** 2010. Mikrobiyal Genomikler (Bölüm 15). Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Editör: C. ÇÖKMÜŞ. Palme Yayıncılık, Sayfa: 479-501.
2. **AKÇELİK, M., AKKOÇ, N., AVŞAROĞLU, M. D., GÜNEŞER, P.** 2010. Mikroorganizmaların İnsanlarla Etkileşimleri. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Editör: C. ÇÖKMÜŞ. Palme Yayıncılık, Sayfa: 700-726.