

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Salmonella* TYPHIMURIUM *seqA* MUTANTLARINDA BİYOFİLM
REGÜLASYONUNUN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ**

Elif Gamze HAS

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Salmonella Typhimurium *seqA* MUTANTLARINDA BİYOFİLM REGÜLASYONUNUN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ

Elif Gamze HAS

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* geni bakımından delesyonlu mutantının biyofilm oluşturma özelliklerinin farklı antimikrobiyal ajanlara ve metabolitlere karşı verdiği yanıtlar incelendi. Bu denemelerden elde edilen verilerden; artan glukoz (% 1-% 3) ve safra tuzu (% 0,1-0,9) konsantrasyonlarında doğal suş ve mutantta biyofilm oluşumunun yüksek oranda engellendiği saptandı. Ayrıca antimikrobiyal ajanların tanımlanan farklı antibiyofilm etkinliklerinin, 1 mg/mL nisin + 10 mM EDTA + 5 µg/mL CIP (siprofloksasin) kombinasyonu kullanılarak en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi. Çalışmanın ikinci aşamasında, *S. Typhimurium* doğal suşu ve *seqA* mutantında karşılaştırmalı transkriptomik (mRNA ve miRNA) analizler yürütülerek; *seqA* geninin biyofilm oluşumunun yanında, genel metabolizma üzerindeki regülasyon karakteristikleri incelendi. Bu çalışmalar söz konusu genlerin biyofilm oluşumu ile ilişkili genler yanında, merkezi metabolizmada rol oynayan proteinleri kodlayan birçok genin regülasyonunda rol oynadığını kanıtladı. Bu global regülatör özellikleri, bilimsel açıdan yeni verilerdir ve *Salmonella* ile mücadelede söz konusu SeqA proteininin inhibitörleri kullanılabileceğine işaret etmesi açısından da kritik bir önem taşımaktadır.

Haziran 2021, 103 sayfa

Anahtar Kelimeler: *S. Typhimurium*, *seqA*, miRNA, mRNA, regülasyon, antibiyofilm ajanları

ABSTRACT

Master Thesis

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF BIOFILM REGULATION IN *Salmonella* Typhimurium *seqA* MUTANTS

Elif Gamze HAS

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In the first stage of this study, the responses of the biofilm-forming properties of *S. Typhimurium* 14028 wild-type strain and its *seqA* gene mutants against different antimicrobial agents and metabolites were examined. From the data obtained from these trials; biofilm formation was found to be highly inhibited in wild-type strain and mutant with increasing glucose (1-3%) and bile salt (0,1-0,9%) concentrations. In addition, the different antibiofilm activities of antimicrobial agents were determined to reach the highest level using the combination of 1 mg/mL nisin + 10 mM EDTA + 5 µg/mL CIP (ciprofloxacin). In the second stage of the study, by conducting comparative transcriptomic (mRNA and miRNA) analyzes on *S. Typhimurium* wild-type strain and mutants, besides biofilm formation, regulation characteristics of *seqA* gene on general metabolism were examined. These studies proved that this gene plays a role in the regulation of many genes that encode proteins involved in central metabolism, as well as genes associated with biofilm formation. These global regulatory properties are scientifically new data and are critical to indicating that inhibitors of the SeqA protein can be used to combat *Salmonella*.

June 2021, 103 pages

Key Words: *S. Typhimurium*, *seqA*, miRNA, mRNA, regulation, antibiofilm agents

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardım ve rehberliğini esirgemeyen, danışmanlığımı üstlenen, bilimsel tecrübe ve engin bilgisiyle araştırma konusunun belirlenmesinden sonlandırılmasına kadar araştırmalarımın her aşamasında katkı sağlayan, değerli fikir ve önerileriyle bilimsel gelişimimde başından sonuna kadar emeği olan, akademik katkılarının yanı sıra deneyimleriyle her zaman yol gösteren bana her daim ilham veren minnet duyduğum hocam sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresinde yardımlarını esirgemeyen, tezime önemli katkılarda bulunan Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), laboratuvar ortamında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Dr. Caner ÖZDEMİR'e ve tüm Prokaryot Genetiği Laboratuvarı çalışanlarına, çalışmalarına olan katkılarının yanı sıra gösterdikleri dostluktan ötürü Selma KEÇELİ ve Tuba Nur SÜRKAÇ'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Hakkını asla ödeyemeyeceğim, bu günlere gelmemi sağlayan, beni her durumda destekleyen, sahip olabileceğim en değerli varlıklar olan sevgili babam Adnan Yavuz HAS'a sevgili annem Gülay HAS'a ve kardeşlerim Alper ve Mert HAS'a yengem Nejla HAS'a, tüm sevecenliğiyle neşe kaynağımız olan canım yeğenim Çınar HAS'a ve bu süreçte yanımda olan başta Gizem HAMAMCI ve Ceren ARAR olmak üzere tüm arkadaşlarıma sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, *dam* ve *seqA* Geni Bakımından Mutant *Salmonella* Typhimurium Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Moleküler Regülasyonunun RNA-Seq ile Tanımlanması (Proje No: 119Z632) adlı proje tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK çalışanları ve yöneticilerine içten teşekkürlerimi sunarım.

Elif Gamze HAS
Ankara, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Bir Salmonellozis Modeli Olarak Salmonella Typhimurium	5
2.2 Biyofilmlerin Evrensel Karakteristikleri	9
2.3 Biyofilmlerin Klinik ve Endüstriyel Önemi.....	12
2.4 Salmonella Biyofilm Oluşumunun ve Virülanslığın Genetik Regülasyonu	17
2.5 Salmonella'da Replikasyonun Tecridini Sağlayan seqA Geni ve Kodladığı Proteinin Karakteristikleri.....	19
2.6 Transkriptomik Analizlerin Doğası	21
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1 Materyal	25
3.1.1 Bakteri suşları ve gelişme koşulları.....	25
3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler.....	25
3.2 Yöntem	29
3.2.1 Doğal tip ve seqA geni bakımından mutant suşun polisistren yüzeylerde ürettikleri biyofilm miktarlarının belirlenmesi.....	29
3.2.2 Kalkoflor bağlanma uygulaması.....	31
3.2.3 Selülaz aktivitesinin değerlendirilmesi.....	32
3.2.4 Bakteriyel 'Swimming' ve 'Swarming' hareketlerinin belirlenmesi.....	32
3.2.5 RNA izolasyonu için doğal tip ve seqA geni bakımından mutant suşların biyofilm formlarının hazırlanması	33
3.2.6 Biyofilm yapılarından total RNA izolasyonu.....	33
3.2.7 Biyofilm yapılarından miRNA izolasyonu	35
3.2.8 rRNA uzaklaştırılması basamağı.....	36

3.2.9 cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve dizilenmesi	36
3.2.10 Biyoinformatik analiz	37
3.2.11 Farklı şekilde ifade edilen genlerin GO ve KEGG zenginleştirme analizi ...	37
3.2.12 Isı haritası	38
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4.1 Nisin'in, Biyoenzimlerin ve Biyosüpfaktanların Polisistren Yüzeyde Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	39
4.1.1 Nisin.....	39
4.1.2 Siprofloksasin (CIP).....	40
4.1.3 Alfa amilaz	41
4.1.4 Proteinaz-K.....	42
4.1.5 CTAB.....	43
4.1.6 EDTA.....	44
4.1.7 SDS	45
4.1.8 Tween-80	46
4.1.9 Nisin ve diğer antimikrobiyal ajanlarla yürütülen kombinasyon denemeleri	47
4.2 Glukozun Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi	50
4.3 Safra Tuzlarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi	51
4.4 Bakteriyel 'Swimming' ve 'Swarming' Hareketlerinin Belirlenmesi	54
4.5 Selülaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	55
4.6 Kalkoflor Bağlanma Uygulaması	56
4.7 Doğal Tip Suş ile Onun <i>seqA</i> Mutantının Biyofilm Formlarından Yapılan Transkriptom Analizi ile Genlerin ifade Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi	57
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ.....	103

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
C	Celcius
CF	Kalkoflor
CIP	Siproflaksasin
g	Gram
ABS	Absorbsiyon yoğunluğu
H ₂ O	Su
H ₂ S	Hidrojen sülfür
HCl	Hidrojen klorür
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
L	Litre
Log2	İki tabanlı logaritma
Lux	Lusiferaz
M	Molarite
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
N	Normalite
Na ₂ HPO ₄	di Sodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk (density)
pH	Hidrojen gücü - asitlik (Power of hydrogen)
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (rotation per munte)
UV	Ultraviyole
V	Hacim
Δ	Mutasyon
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

AHL	Açillenmiş homoserin laktonlar
BAP	Biyofilm ile ilişkili protein
bç	Baz çifti
c-di-GMP	Siklik-di-Guanozin mono fosfat
cDNA	Komplementer DNA
CR	Kongo kırmızılı agar
CTAB	Hekzadezil Trimetil Amonyum Bromit
Dam	Deoksi adenin metiltransferaz enzimi
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAz	DNA parçalayıcı enzim
dNTP	Deoksiribonükleotit
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
KNS	koagülaz-negatif stafilokok
LB	Luria Bertani
NK	Negatif kontrol
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAMP	Patojen ilişkili moleküler model
PBS	Fosfat tuz tamponu (buffered saline)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif gerçek zamanlı PZR (quantitative real time)
QS	Quorum Sensing (yeter sayı algılama)
RNA	Ribonükleik asit
RNAP	RNA polimeraz
RNaz	RNA parçalayıcı enzim
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SAM	S-adenozin metionin kofaktörünü
SCV	<i>Salmonella</i> içeren vakuol
SDS	Sodyum Dodezil Sülfat
SeqA	sequestration (tecrit) A regülatör protein
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SPI	<i>Salmonella</i> patojenite adası
T3SS	Tip III salgı sisteminin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Nisin'in (1 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	40
Şekil 4.2 Siproflaksasin'in (0,25 µg/µL, 0,5 µg/µL ve 5 µg/µL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	41
Şekil 4.3 Alfa amilaz'ın (0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 5 mg/mL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	42
Şekil 4.4 Proteinaz-K'nın (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL ve 4 mg/mL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve <i>seqA</i> mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi	43
Şekil 4.5 CTAB'ın (0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	44
Şekil 4.6 EDTA'nın (1mM, 10mM ve 50mM) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	45
Şekil 4.7 SDS'in 5 mg/mL (10 mg/mL ve 100 mg/mL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	46
Şekil 4.8 Tween-80'in (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	47
Şekil 4.9 A, A1 ve A2 kombinasyonlarında hazırlanan preparatların (Çizelge 3.3) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	48
Şekil 4.10 A3 ve A4 kombinasyonlarında (Çizelge 3.3) hazırlanan preparatların <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	49
Şekil 4.11 B ve C kombinasyonlarında (Çizelge 3.3) hazırlanan preparatların <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	50
Şekil 4.12 Glukozun (% 1, % 2 ve % 3) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	51
Şekil 4.13 Safra tuzlarının (% 0,1, % 0,2 ve % 0,3) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	52
Şekil 4.14 Safra tuzlarının (% 0,4, % 0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	53
Şekil 4.15 Safra tuzlarının (% 0,7, % 0,8 ve % 0,9) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve onun <i>seqA</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	54
Şekil 4.16 <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip suşu ve onun <i>seqA</i> geni mutant suşunun "swimming" hareketi	55
Şekil 4.17 <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutant suşunun "swarming" hareketi	55

Şekil 4.18 <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu, ve <i>seqA</i> mutantının selüloz aktivite zonları	56
Şekil 4.19 <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve onun <i>seqA</i> mutantında kalkoflor bağlanma testi bulguları.....	56
Şekil 4.20 Hareket ve fibriyal yapılar ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	58
Şekil 4.21 Genetik bilgi işleme ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	60
Şekil 4.22 Taşıyıcı sistem proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	62
Şekil 4.23 Salgı sistem proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	64
Şekil 4.24 Membran proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	65
Şekil 4.25 Sinyal transdüksiyon proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	67
Şekil 4.26 Karbonhidrat metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	69
Şekil 4.27 Enerji metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	70
Şekil 4.28 Amino asit metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	72
Şekil 4.29 Kofaktör ve vitamin metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	73
Şekil 4.30 <i>Salmonella</i> enfeksiyonunda görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	74
Şekil 4.31 Faj bölgeleri ve virülans proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	75
Şekil 4.32 Fonksiyonu bilinmeyen proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	76
Şekil 4.33 miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>seqA</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, antimikrobiyal maddeler ve dezenfektanlar	27
Çizelge 3.2 Denemelerde kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları.....	30
Çizelge 3.3 Nisin ile kombinasyon denemelerinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları	31
Çizelge 3.4 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri	31
Çizelge 4.1 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen hareket ve fibriyal yapılar ile ilişkili genler	57
Çizelge 4.2 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen genetik bilgi işleme proteinlerini kodlayan genler	59
Çizelge 4.3 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen taşıyıcı sistem proteinlerini kodlayan genler.....	61
Çizelge 4.4 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen salgı sistem proteinlerini kodlayan genler.....	63
Çizelge 4.5 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen membran proteinlerini kodlayan genler.....	65
Çizelge 4.6 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen sinyal transdüksiyon proteinlerini kodlayan genler.....	66
Çizelge 4.7 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen karbonhidrat metabolizması proteinlerini kodlayan genler.....	68
Çizelge 4.8 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen enerji metabolizması proteinlerini kodlayan genler	70
Çizelge 4.9 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen amino asit metabolizması proteinlerini kodlayan genler.....	71
Çizelge 4.10 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen kofaktör ve vitamin metabolizması proteinlerini kodlayan genler....	72
Çizelge 4.11 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen <i>Salmonella</i> enfeksiyonunda rol alan proteinleri kodlayan genler	73
Çizelge 4.12 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen faj bölgeleri ve virülans proteinleri kodlayan genler.....	74
Çizelge 4.13 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen fonksiyonu bilinmeyen proteinleri kodlayan genler.....	75
Çizelge 4.14 <i>seqA</i> geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen mikro RNA’ları (miRNA) kodlayan genler	77

1. GİRİŞ

Biyofilmler; bakterilerin canlı ya da cansız bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri hücre dışı polimerik maddelerle (EPS) kaplanması sonucu oluşturduğu çok tabakalı yapılar olarak tanımlanmaktadır (Davey ve O'Toole 2000). Biyofilm yapılarında oluşan katmanlaşma nedeniyle mantar yapılarının üst kısmında bulunan hücreler matriksin sağladığı mekanik koruyuculuğa ilaveten; enzimatik aktivitelerinde gerçekleştirdikleri düzenlemelerle tüm stres koşullarına karşı diğer biyofilm hücrelerini koruma görevi üstlenirler. Tabii yaşam ortamlarında ve farklı koşullarda bakterilerin genel bir kural olarak oluşturduğu biyofilm formları, bu açıdan bakıldığında, biyofilmi meydana getiren bakterilerin planktonik formlarının çevresel baskıya karşı geliştirdiği evrimsel bir yanıt olarak değerlendirilebilir (Marcinkiewicz 2001). Biyofilm içerisinde bulunan hücreler, matriks içerisine gömülü olarak bulunmakta ve bu sayede dış çevreye karşı kendini kimyasal ve mekanik koruma altına alarak daha uzun süre hayatta kalabilmektedirler.

Gıdalarda ve gıda katkı maddelerinde biyofilmlerin varlığı, gıda kaynaklı hastalıklara yol açabilmektedir. Gıda işleme alanlarında biyofilmlerin kalıcılığı, gıda kontaminasyonu olasılığının artmasına neden olur ve bu da sonuçta genel gıda kalitesini ve güvenilirliğini tehlikeye atar (Syne vd. 2013, Corcoran vd. 2014, Di Ciccio vd. 2015). Bu durum dünya çapında artan bir halk sağlığı sorununu teşkil etmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığının artmasıyla birlikte biyofilm direnç mekanizmalarının anlaşılması, biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik araştırmalar önem kazanmıştır.

Salmonella cinsi üyeleri, doğal hayat döngüsünde, biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler (Prouty ve Gunn 2003, Ledebøer ve Jones 2005). Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan en önemli patojenlerden biri olması nedeniyle, gıda endüstrisinde başlıca mikrobiyal sorunlardan biridir (Hohmann 2001). *Salmonella* biyofilm yapılarının biyolojik olmayan yüzeylerde de oluşması, gıda işleme endüstrisi açısından büyük sorunlara yol açmaktadır (Joseph vd. 2001, Prouty ve Gunn 2003). Tifoit olmayan salmonellozun sadece Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 1,4 milyon insanı etkilediği ve bu enfeksiyon vakalarının % 95'inin gıda kaynaklı bakterilerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Salmonelloz salgını; tüketime hazır ya

da yarı mamul gıdalar yanında, gelişmiş ülkelerde çoğunlukla maydanoz, rezene, kavun, kereviz sapı, pastörize edilmemiş portakal suyu gibi geniş taze ürün yelpazesi ile ilişkilendirilmiştir (Hohmann 2001).

Günümüzde, yüksek verimli DNA dizileme teknolojileri (yeni nesil sekanslama), genomik ve metagenomik araştırmalar için kullanılmak suretiyle, biyofilm oluşturma yeteneğindeki mikroorganizmalarının, genetik kodlama potansiyeli ve biyofilm topluluk yapıları hakkında hızlı bir bilgi birikimi sağlanmıştır (Grzymiski vd. 2008, Denef vd. 2010). Diğer yandan RNAseq, mikrodizin analizleri ve gerçek zamanlı kantitatif PZR (RT-qPZR) da dahil olmak üzere transkriptomik yaklaşımlar, biyofilmler içerisinde gerçekleşen global ve lokal gen ekspresyon süreçlerinin anlaşılmasına önemli katkılar sunmaktadır (Williamson vd. 2012, Ishii vd. 2013). Özetle biyofilm yapıları üzerinde yürütülen bu genomik ve transkriptomik çalışmalar, bakterilerin biyofilm oluşturmaları durumundaki fizyolojik değişiklikleri hakkında bilgiler vermektedir. Bu teknikler kullanılarak *Salmonella*'da biyofilm oluşumunun moleküler mekanizmasının tanımlanması, *Salmonella*'nın kontrolü çalışmalarına yeni ve etkin bir yaklaşım kazandırma potansiyeli açısından büyük önem taşımaktadır.

Salmonella'da biyofilm yapılarının kontrolü ve eradikasyonu çalışmalarında en kritik nokta, biyofilm oluşumunun genetik regülasyonunun detaylı bir şekilde tanısına bağlıdır. Bu nedenle, bu çalışmada global regülatör potansiyeli yüksek ve *Salmonella* biyofilm yapıları üzerinde etkili bir gen olan *seqA* seçilmiştir. Dam metil transferaz enzimi, diğer metil transferazlar ile benzer bir şekilde, S-adenozin metionin kofaktörünü (SAM) metil grubu vericisi olarak kullanır. Farklı bilimsel çalışmalar sonucu, bakterilerde gerçekleştirilen DNA metilasyonunun; gen ifadesinin düzenlenmesi, mobil DNA elementlerinin genom içi ya da genomlar arası hareketliliği, DNA eşlenmesinin zamanlanması, eşlenen kromozomal ya da plazmid DNA kopyalarının yeni oluşan hücrelere dağılımı, replikasyonu yapılan DNA orijin bölgelerin, yeni replikasyon döngüsüne girene kadar tecrit edilmesi (sequestration) ve DNA replikasyonundan köken alan hataların tamirinde kritik görevler üstlendiği saptanmıştır (Julio vd. 2001, Balbontin vd. 2006, Chatti vd. 2008). DNA replikasyon kompleksinin (replizom), orijin bölgesinden geçmesinden sonra, tekrar replikasyonun başlamasının regülasyonu Dam metil transferaz

yanında, SeqA proteini aktivitesi ile koordineli bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Bazı prokaryotlarda belirlenmiş olan SeqA, DNA replikasyonunda metilasyon-hemimetilasyon döngüsünde yer alır. Hemimetillenmiş DNA dizileri; yeni replike edilmiş orijinde oluşan, tek zincirinde metil grubu içeren DNA dizileridir ve Dam (deoksi adenin metilaz) enzimi tarafından metilasyona uğratılana kadar bu durumda kalırlar. SeqA (sequestration A) regülatör proteini, hemimetillenmiş 5'GATC3' sekansının adenin bazına Dam metil transferazdan daha yüksek bir ilgi ile bağlanma aktivitesi göstermektedir. Çok sayıda hücrel SeqA proteini, DNA ile kompleks bir yapı oluşturup replikasyon çatalındaki hemimetillenmiş DNA'nın bir bölgesini kaplayarak Dam enziminin bu bölgelere bağlanmasını ve metilasyon aktivitesi göstererek replikasyon orijinlerinin yeniden aktive edilmesini engellemiş olur. Bu mekanizma sayesinde, söz konusu replikasyon orijinlerinden replikasyonun tekrar başlaması, SeqA proteini ayrılana kadar durdurulmuş olur. Bu şekilde replikasyondan kaynaklanan eş zamanlı hata tamiri ve eşlenen kromozomların dağılma stabilitesi garanti altına alınır. Bu özellikleri, söz konusu proteininin yüksek regülasyon kapasitesine sahip olduğunun temel işaretleridir (Slater vd. 1995). Bu regülasyon mekanizması sayesinde, hücrenin yaşam döngüsü de düzenlenir (Campbell ve Kleckner 1990, Espeli vd. 2008). In vitro koşullarda SeqA proteini, 5'GATC3' dizilerine dimer olarak bağlanır ve N-terminal bölgesinin interaksiyonu vasıtasıyla dimerlerin helisel iplikçik formunu oluşturur. Ayrıca SeqA, daha düşük bir afiniteyle metillenmiş replikasyon orijinine de bağlanabilir ve ilk replikasyon başlama zamanını etkiyebilir. Bunlara ilave olarak SeqA, kromozom organizasyonuna ve gen regülasyonuna da katılmaktadır. Nitekim değişik araştırma grupları tarafından yürütülen çalışmalarda, *seqA* geninin ifadesinin *Salmonella* virülanslığında önemli roller üstlendiği saptanmıştır (Lobner-Olesen vd. 2005, Aloui vd. 2010, Chatti vd. 2014). SeqA aktivitesinin *Salmonella*'daki farklı genlerin düzenlenmesine katıldığı ve *seqA* geni mutantlarında, konak hücrelere tutunmanın ve özellikle konak hücre işgalinin önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir (Garcia-del-Portillo vd. 1999, Chatti vd. 2008, Jakomin vd. 2008, Uğur vd. 2018). Bu tür yeni genlerin, yeni hedeflerin belirlenmesi, biyofilm yapıları ile mücadele için izlenecek yeni stratejilerin belirlenmesine öncülük etmektedir. Bu çalışmada tasarlanan transkriptomik analizler ile, *seqA* geninin biyofilm oluşturma özelliği üzerindeki etkinliğinin moleküler düzeyde tanımlanması amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Bir Salmonellozis Modeli Olarak Salmonella Typhimurium

Salmonella cinsine ait bakteriler, sistematik olarak enterik bakteriler grubu içerisinde değerlendirilmektedir. Gram boyanma özellikleri bakımından Gr⁽⁻⁾, spor oluşumu gözlenmeyen, aerobik ve anaerobik koşullarda farklı metabolik yanıtlar üreterek çoğalan üyelerle temsil edilirler. Morfolojik yapıları üniform (çubuk) olup, boyutları 0,4-5 µm arasında değişim gösterebilmektedir. Bu bakterilerde hareket genellikle flagellare yapılar tarafından sağlanmaktadır. Ancak doğal ekosistemlerde nadir hareketsiz atipik formlarının bulunduğu da tespit edilmiştir. Karbon kaynağı olarak laktozu kullanabilen herhangi bir üyesi tanımlanmamıştır. Memeli hayvanların mide bağırsak sisteminde patojen olan bu bakterilerin üremeleri için ideal sıcaklık (37 °C) konak sistemlere adaptasyonun başlıca göstergesidir. İn vitro koşullarda ideal üreme için yapay besiyerlerinde tercih ettikleri pH değerleri nötral değerlere yakınlık arz etmektedir. Ancak pH 4.5-9.0 arasında üreme gösterirler. *Salmonella* üyeleri düşük pH, düşük su aktivitesi ya da yüksek yağ içeriğine sahip gıdalarda belirli sıcaklıklara dirençlidir. Dondurularak korunan gıda ürünlerinde kalıcılık önemli ölçüde düşmektedir. *Salmonella enterica* üyelerinin hayvan model sistemlerinde neden olduğu lokal ve sistemik enfeksiyon modelleri tanımlanmıştır. Lokal enfeksiyonlar gastroenterit, sistemik enfeksiyonlar nadiren sepsisemi, çoğunlukla ise tifo ateşi ile sonuçlanmaktadır. *S. enterica*'nın hayvanlarda hastalığı indüklemeye yeteneği, bazıları patojenite adalarında kümelenmiş, diğerleri ise kromozomda dağılmış olan virülans genlerine sahip olmasına bağlıdır (Groisman 1997). Enfeksiyon sürecinin belirli aşamalarında virülans gen ekspresyonunu düzenleyen, aynı zamanda ilgili fizyolojik rolleri oynayan PhoPQ ve RcsBCD gibi iki bileşenli sistemlerdir. *Salmonella*'nın makrofajlar ve safra kesesi içinde kalma yeteneği, onu hem akut hem de kronik enfeksiyonlara neden olan zorlu bir patojen yapar (Gonzalez-Escobedo 2011). *Salmonella*'nın neden olduğu lokal ve sistemik enfeksiyonlar birbirinden belirgin hatlarla ayrılan etiyolojik karakteristikler göstermektedir (Chessa vd. 2008, Vasquez-Torres vd. 2018). Ancak bu enfeksiyonların patojenite ile ilişkili moleküler örüntüler bakımından gösterdiği önemli ölçüdeki benzerlikler nedeniyle en yaygın enfektif serovaryete olan *S. Typhimurium*'un, salmonellozisin açıklanmasında

model bir organizma haline gelmesine yol açmıştır. Özellikle *Salmonella*'da patojenite ile bağlantılı moleküler örüntülerin (PAMP) üzerinde yürütülen çalışmalar, patojen mikroorganizmaların neden olduğu konakçı hasarının analizini kolaylaştırmakta ve onlardan korunma için geliştirilecek ajan havuzunu zenginleştirmektedir (McClelland vd. 2001, Morgan vd. 2007, Srivatsan ve Wang 2008).

Salmonella tarafından enfeksiyon oluşturmak ve yaymak için kullanılan patojenik elementler büyük ölçüde *Salmonella* patojenite adalarında (SPI) bulunur (Hayward vd. 2013). *S. Typhimurium* virülansı, *Salmonella* patojenite adaları 1 ve 2 (SPI-1 ve SPI-2) üzerinde taşınan iki tip III salgı sisteminin (T3SS) aktivitesine bağlıdır. *Salmonella*'nın konakçı hücre fonksiyonunu manipüle etme yeteneği, bakteriyel proteinleri doğrudan konakçı hücre sitoplazmasına enjekte edebilen T3SS'nin ekspresyonu ile gerçekleştirilir. SPI-1, epitel hücrelerinin istilasını sağlayan bir T3SS'yi kodlar. Bakteriler mukozadan taşındıktan ve makrofajlar içinde lokalize olduktan sonra, lizozomal füzyondan kaçınmak için SPI-2'de kodlanan T3SS'yi kullanırlar ve *Salmonella* içeren vakuol (SCV) adı verilen özel bir nişte ikamet ederler. Bu nedenle, bu iki patojenite adası, bu bakterilerin başlıca virülans özelliklerinden ikisini kodlayarak, istila ve kalıcılık kapasitesi sağlar. Daha az çalışılmış SPI-3 ve SPI-4'ün, her ikisi de bilinmeyen fonksiyona sahip birkaç ek geni kodlasa da, bunların intramakrofaj sağkalımında rol oynadığı düşünülmektedir (Bäumler 1994, Blanc-Potard vd. 1999). SPI-5'in ise, bağırsak sıvısı sekresyonunda bir artışa aracılık ettiği için, gastroenterit ile ilişkili fenotiplerde rol oynadığı varsayılmaktadır (Wood vd. 1998).

S. Typhimurium, sistemik olarak doku yüzeylerine tutunabilmesi, istila ve yayılma kabiliyeti veya alternatif olarak enterosit içinde çoğalabilmesi yeteneklerinden dolayı enteroinvaziv olarak tanımlanmaktadır (Takeuchi 1967). Bir organizmanın hayatta kalması, çevresindeki değişiklikleri algılama ve bunlara tepki verme yeteneğine bağlıdır. Çevresel değişikliklere tepki verme mekanizmaları, canlılarda evrensel olarak mevcuttur. Gıda kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili *S. Typhimurium*, hem konak sistemlerinde hem de konak sistemleri dışında hayatta kalabilir. Nihayetinde insan enfeksiyonuna neden olmak için, gıda kaynaklı bir patojenin önce yiyecek veya su geçişinde hayatta kalması gerekir. İnsan bedeni savunmaları arasında antimikrobiyal etkiye katkıda bulunan mide asidi

(büyük ölçüde beslenme durumuna bağlı olarak, pH 2.5-4.5 arasında değişiklik gösterir), safra tuzları ve gastrointestinal sistemdeki laktik, asetik, propiyonik ve butirik asitler dahil olmak üzere birçok organik asitler önemli bir yer tutar (Mikkelsen vd. 2004). Enterik organizmalar ise, bu engelleri aşmak, konakçı-prokaryotik dengeyi bozmak ve muhtemelen seçici bir avantaj elde etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Hızla değişen çevresel koşullarda hayatta kalmak için, bakteriler değişiklikleri algılayarak gen ifadesi ve protein aktivitesi düzenlemelerine gitmek zorundadır. Bu nedenle patojenlerin konakçı sistemlere adaptasyonu ve onu istila etmesine izin veren anahtarları kontrol eden mekanizmaları belirlemek, kritik bir önem taşımaktadır.

Salmonelloz dünya çapında insanlarda ve hayvanlarda yaygındır. Salmonelloz, en sık bildirilen ikinci gastrointestinal enfeksiyondur. Çoğu insan vakası gıda kaynaklıdır; bununla birlikte, gıda kaynaklı olmayan *Salmonella* enfeksiyonu hayvanlarla, kontamine sularla veya çevreyle temas sırasında bulaşabilir (Wall vd. 1995, Rice vd. 2003). Gıda veya su kaynaklı *S. Typhimurium*'un neden olduğu akut enterit, klinik olarak şiddetli kramplar ve diyare ile kendini gösterir. Sanayileşmiş ülkelerde, tifoid olmayan *Salmonella*, bakteriyel gastroenteritin önemli bir nedenidir. Tifoit olmayan insan salmonellozu, akut başlangıçlı ateş, karın ağrısı, bulantı, ishal ve bazen kusma ile karakterize edilir (Hohmann 2001). Hastalık genellikle birkaç gün sürer ve kendi kendini sınırlar. Bununla birlikte, ortaya çıkan dehidrasyon, özellikle tıbbi tedavi olmadığında. bağışıklığı zayıflamış kişilerde, hamile kadınlarda, yaşlılarda ve çocuklarda daha ciddi komplikasyonlara neden olur. Tifoit olmayan salmonelloz vakaları dünya çapında artmakta ve her yıl insan popülasyonunda milyonlarca enfeksiyona ve birçok ölüme neden olmaktadır (Mead vd. 1999). Amerika Birleşik Devletleri'nde ise, enfeksiyöz gastroenteritin en yaygın nedenlerinden biridir (Yamada vd. 1995). Hollanda'da tahmini salmonelloz insidansı, yılda 1.000 kişi başına 3 vakadır (Van den Brandhof vd. 2003). *Salmonella*'nın yılda 1,4 milyon hastalığa ve 600 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (ECDC 2020).

Salmonella'nın neden olduğu hastalıkların moleküler ve hücresel mekanizmalarının tanımlanmasında seçilen bakteriyel model sistem genellikle *S. Typhimurium*'dur. Konakçı model sistemleri ise fareler başta olmak üzere gine domuzları ve Yeni Zelanda

tavşanları gibi deney hayvanları olmaktadır. Gümümüze kadar bu sistemler kullanılarak yürütülen bilimsel çalışmalar ışığında, *Salmonella* enfeksiyonlarının patojen ve konakçı sistemlerdeki genetik, fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri kısmen tanımlanmıştır. *Salmonella* serovaryetelerin konakçı etkinliği için 10^5 ve üzerinde yoğunlukta sisteme alınması gereklidir. Bu şekilde başlayan enfeksiyon süreci ince bağırsakta tutunma ile devam eder. İnce bağırsaktaki M hücreleride gerçekleşen bu tutunmayı kolonizasyon ve konakçı hücre işgali takip eder (Ohl ve Miller 2001, Vasquez-Torres vd. 2018). *Salmonella*, safra kesesinin safranin ince bağırsağa salgılamadan önce depolandığı ve konsantre edildiği yerde yüksek safra konsantrasyonlarıyla karşılaşır (Begley 2005). Deterjan aktivitesi nedeniyle safra güçlü bir antimikrobiyal ajandır (Gunn 2000, Begley 2005). Bununla birlikte, enterik patojenler *Salmonella* da dahil olmak üzere safraya dirençlidir (van Velkinburgh ve Gunn 1999) ve genellikle bu aşamada konak sistemde etkili olabilmek için gen ekspresyonunu ve virülans özelliklerini düzenlerler (Begley 2005, Sistrunk vd. 2016). *S. Typhimurium*'da, SPI-1 ve motilite genlerinin ekspresyonu safra maruziyeti ile bastırılarak epitelyal hücre istilasının belirgin bir şekilde baskılanmasıyla sonuçlanır (Prouty ve Gunn 2000, Prouty vd. 2004). *S. Typhimurium*'un çeşitli koşullar altında safraya karşı transkriptomik yanıtları iyi karakterize edildiğinden (Prouty vd. 2004, Kröger vd. 2013), bu serovaryete, *Salmonella*'nın genel olarak safrada nasıl davrandığı konusunda kabul edilmiş bir model haline gelmiştir (Gunn 2000, Sengupta vd. 2014). Bununla birlikte, % 3 safraya maruz kalmanın ardından *S. Typhimurium* ve *S. Typhi*'de iki boyutlu (2D) jel elektroforezi ile protein ekspresyonundaki değişiklikleri karşılaştıran bir çalışmadan elde edilen veriler (van Velkinburgh ve Gunn 1999), *S. Typhi* ve *S. Typhimurium*'da safradan etkilenen proteinler arasında çok az örtüşme olduğunu, safra tepkisinin bu serovarlar arasında farklılık gösterdiğini kanıtlamıştır. Ayrıca, *S. Typhimurium* LT2 ve *S. Typhi* CT18'in genomlarını karşılaştıran bir çalışmada, iki suş arasında genlerin % 90'ından daha azının paylaşıldığı, CT18'de bulunan 600'den fazla genin LT2'de bulunmadığı saptanmıştır (Sabbagh vd. 2010). Bu durum genel bir salmonelloz modelin oluşturulmasını güçleştiren ana unsurdur.

2.2 Biyofilmlerin Evrensel Karakteristikleri

Bakterilerin arayüzlere, diğer hücrelere ya da besin maddesi artıklarına tutunmaları sonucu mikrokoloniler oluşturmaları ve bu mikrokolonilerin kendi ürettikleri hücre dışı polimerik sulu bir faz ile (EPS) çevrelenmesi neticesinde oluşturulan planktonik formlara nazaran genetik ifade ve fizyolojik özellikler bakımından çok hücreli organizasyonlara benzeyen yapılar, biyofilm olarak tanımlanmaktadır (Donlan ve Costerton 2002). Uzun yıllar boyunca bakterilerin, yalnız planktonik ve sosyal olmayan canlılar olduğu düşünülmüştür. Ancak bunun aksine doğada yaşayan bakteriler, pH, besin azlığı, sıcaklık, oksijen seviyesindeki gradyanlar gibi stres koşullarına maruz kaldıklarında, uygun bir yüzeye tutunarak ve bir ekstraselüler matriks üreterek biyofilm yapısı oluştururlar. Bu yapı sayesinde hem kendi türünden hem de başka türlerden bakteriler ile birlikte simbiyotik bir ilişki içerisinde; çevresel streslere, antibiyotiklere, konak immün yanıtına karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan dirençli bir yaşam formu teşkil edebilmektedirler. Biyofilmlerin farklı genetik ve fizyolojik ifade fonksiyonlarından kaynaklanan çevresel stres faktörlerine gösterdiği yüksek düzeyde direnç, bu yapıların neden olduğu sorunların çözümünü nerede ise olanaksız hale getiren ana unsurdur. Biyofilm tabakası, çok farklı çevrelerde tetiklenebilen karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Biyofilm içerisinde heterojen ve bölümlendirilmiş mikro ortamlar (10-100 µm); mikrobiyal aktivite, hücreler arası sinyalleşme ve metabolik alışverişi ve bu yollarla da stress koşullarına toleransı ve konakçı sistemde kalıcılığı arttırmak için önemli bir faktör olan hücresel ve toplumsal davranışı düzenleyen bir sistem gelişiminin temel yapılarıdır (Nadell vd. 2008).

Biyofilm oluşum süreci, her aşamada farklı gen setlerinin ekspresyonu ile düzenlenir. Bu süreç, planktonik bakteri hücrelerinin yüzeylere tutunmasıyla başlar. Oluşum evreleri; geri dönüşümlü ilk tutunma evresi, geri dönüşümsüz tutunma evresi, mikrokolonilerin oluştuğu ve EPS üretiminin yapıldığı ilk olgunlaşma evresi, tüm yapılarıyla tamamen olgunlaşmış biyofilm evresi ve olgunlaşmış biyofilmden kopma ve dağılmaların meydana geldiği son evre olarak 5 farklı kısma ayrılmaktadır. Yüzeye tutunma aşamasında, biyofilm dönüşümü için genetik düzenlemeler başlamakta ve bu işlemler genellikle epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (Casadesus ve Low 2006,

Dubnau ve Losick 2006, Heusipp vd. 2007, Casadesus ve Low 2013). Biyofilm oluşumu sırasında bakteri gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin; hücrelerin aktiviteleri ve hücre dışı matriks malzemesinin yapısına bakıldığında çok farklı fenotiplerin oluşumuna yol açtığı görülmektedir. Bazı bakteri türlerinde, biyofilmin erken aşamalarında biyofilm ile ilişkili protein (BAP) adı verilen hücre duvarına bağlı yüzey proteinleri eksprese edilmeye başlanmakta ve bu proteinler hücre-hücre etkileşimlerini ve hücre dışı matriksin gelişimini teşvik etmektedir (Lasa ve Penades 2006).

Biyofilm yapısının başlangıç aşamasında hücre-tutunma zemini ilişkisi, bu yüzeylerin fiziksel, kimyasal ve enerjetik karakteristikleri ve temas halindeki hücrelerin popülasyonlarının büyüklüğüne bağlı olarak değişebilir. Bakterilerin yüzeysel tutunmada kullandığı temel yapılar, hareketlilik ve substrat ilişkisini belirleye hücresel yapılar (flagella, pili, adhezinler gibi) ve hücre duvarı bileşenleri olarak özetlenebilir. Flagella, pili ve diğer adhezinler, birçok Gram negatif bakterinin yüzeyinde bulunur ve bakteriyel patogeneizde önemli rollere sahiptir. Pililer, patojenik bakterilerin konak hücre yüzeylerine bağlanmasını destekleyen virülans faktörleridir. Şaperon kullanıcı fimbriya, konakçı hücre sinyal yollarını modüle edebilir, konakçı hücrelerin bakteriyel istilasını teşvik edebilir veya inhibe edebilir ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırabilir (Thanassi vd. 2012). Özellikle patojenler üzerinde yürütülen çalışmalar sonucu, başlangıçta var olan ve özellikle flagella ve pililer tarafından sağlanan hareketlerin biyofilm oluşumu için indükleyici bir rol üstlendiği tespit edilmiştir (O'toole ve Kolter 1998, Pratt ve Kolter 1998, Davey ve O'Toole 2000). Biyofilm yapısında tek katmanlı aşamaya ulaşıldığında flagellar genlerin transkripsiyonu baskılanır ve metil-kabul eden kemotaksis genlerinin transkripsiyonu aktive edilir. Flagellar rotasyon duraklaması kemoatraktanlara yanıtta rol oynayarak geri dönüşümsüz bağlanmaya geçişi arttırmaktadır. Çalışmalar, kemotaksis proteinlerinin tek tabaka oluşumunu etkilediğini göstermektedir (Karatan ve Watnick 2009). Bakteri hücreleri hedef yüzeylere teması gerçekleştirdikleri aşamayı takiben, söz konusu yüzeyler ile gerçekleştirdikleri fiziksel ve kimyasal interaksiyonlar sonucu geri dönüşsüz tutunma aşaması tamamlanmış olur (Costerton vd. 1999, Baumgartner vd. 2007).

Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler, yerel olarak mikrobiyal aktivite, hücreler arası sinyalleşme ve metabolik alışverişi düzenleyen, böylece toleransı ve kalıcılığı arttırmak için önemli bir faktör olan, hücresel ve toplumsal davranışı regüle eden mekanizmalar geliştirir. Biyofilmlerin çevresel stres faktörlerine gösterdiği yüksek düzeydeki direnç, biyofilm hücrelerinin geçirdiği yapısal ve genetik düzenlemeler yanında, başka bir çok çevresel faktöre bağlı özellikler gösterir (Simoes 2011). Biyofilm oluşumu üzerinde tüm bakterilerde ortak etkenler; biyofilmin oluşturulacağı yüzey yapısı ve biyofilm matriksinin ana yapısal elemanları olarak ifade edilebilir (Nadell vd. 2009). Biyofilmlerin ana bileşenlerinden biri olan selüloz ve kıvrımlı fimbriyal sistemlerin varlığı, hücresel veya hücresel olmayan yüzeylere bağlanmanın *S. Typhimurium*'un hayatta kalmasında kritik olabileceğini düşündürmektedir (White vd. 2006, Vestby vd. 2009).

Planktonik formlar ile biyofilm formları kıyaslandığında tanımlanan en belirgin ayrıcalık biyofilmlerin ortak karakteristiği olan matriks yapılarıdır. Matriks, biyofilm hücrelerinin ürettikleri farklı tipteki biyopolimerlerin birikimiyle oluşmaktadır. EPS matriksinin bileşimi, mikroorganizma tipine, lokal mekanik kayma kuvvetlerine, substrat mevcudiyetine ve konakçı ortamına bağlı olarak geçici ve yapısal olarak değişkendir. EPS yüksek hidratlı bir yapıya sahip olup birçok türün biyofilmde organik bir karakter sergileyerek temel besinlerin ve minerallerin (C, N, PO₄ gibi) yakalanarak konsantre hale getirilmesine olanak sağlayan bir sistem oluşturur. Ekzopolimerik matriksin (EPS) çeşitli fonksiyonları biyofilm yaşam biçimine geniş ölçekte katkı sağlamaktadır. Bu birikim yüzey adezyonundan ve kohezyonundan sorumlu olan üç boyutlu yapının iskeletini oluşturur. EPS, hücreler arasındaki kohezyon kuvvetini arttırdığı için biyofilmin stabilizasyonunda oldukça önemli role sahiptir. EPS biyofilm hücrelerini immobilize eder ve bu hücreler birbirlerine olabildiğince yakın durur. Fiziksel yakınlık hücre-hücre iletişimini ve iş birliği gibi etkileşimleri beraberinde getirir (Kostakioti vd. 2013).

Biyofilm yapılarını oluşturan hücreler sinyal moleküllerini kullanmak suretiyle birbirleri arasında haberleşmeyi gerçekleştirebilmekte ve bu yolla görev paylaşımı yapabilmektedir (Arnold ve Silvers 2000, Fraud vd. 2007). Bakteriler, hücreler arası iletişim sistemleri sayesinde yalnız veya topluluk içinde olduklarını ayırt edebilmekte ve böylelikle toplu halde davranabilmektedirler. Bakterilerin konak sistemlerde kalıcılığı ve işlevselliği;

çevresel uyarıcıları algılayacak ve bu uyarılara yanıt verecek sistemler içermeye yeteneği ile doğru orantılıdır. Bakteriler, bulundukları ortamdaki kullanılabilir besin maddeleri, hücresel üreme hızı, ozmotik akış ve hidrojen iyonu konsantrasyonu gibi unsurlarda meydana gelen niteliksel ve niceliksel değişimlere bağlı olarak değişik uyum yanıtları geliştirme yeteneğindedir (Donabedian vd. 2003). Biyofilm yapılarının gerçekleşmesinde kritik bir role sahip olduğu bilinen “yeter sayı algılama” [Quorum Sensing (QS)] sistemleri sayesinde yukarıda tanımlanan çevresel sinyaller popülasyon düzeyinde algılanmakta ve koruyucu yanıtlar oluşturulabilmektedir (Camara vd. 2007). Örneğin; konakçı hücre yüzeyine tutunan patojen hücre miktarı ile doğru orantılı bir şekilde sinyal iletimi de artmakta ve hücresel yanıtlar hızlı bir şekilde oluşturulmaktadır. Bakteriler yeter yoğunluğa ulaştıkları anda da virülans faktörlerinin sentezi veya ekzotoksin üretimi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenerek belirli hedef genlerin aktivasyonu ya da baskılanması gerçekleşir (Raffa vd. 2005). Bu yolla patojen başarılı bir enfeksiyon için yeterli popülasyon büyüklüğüne ulaşmaya kadar konak organizmanın immün sisteminden saklanma olanağına sahip olur (Fuqua vd. 1994, Jayaraman ve Wood 2008). QS, yerel popülasyon yoğunluğu tarafından uyarılan bakterilerde koordineli bir gen ekspresyon yanıtını temsil eder. Patojen hücreleri arasında haberleşmeyi gerçekleştiren sistem, bir sinyal molekülü “Oto-Endükleyici [Auto-inducer (AI)]” veya “feromon” olabilir. Yeter sayı sinyal molekülleri için oto-endükleyici tanımı yapılmasının nedeni, doğrudan üretildikleri hücrelerde regülasyon yeteneği içermeleridir. Autoinducer-2 (AI-2), bakterilerde yaygın olan ‘yeter sayı algılama’da evrensel bir sinyal molekülü olarak kabul edilir ve LuxS enzimi AI-2 sentezi için gereklidir (Novick ve Muir 1999, Donabedian vd. 2003).

2.3 Biyofilmlerin Klinik ve Endüstriyel Önemi

Biyofilmler üzerinde yürütülen yoğun bilimsel çalışmalar doğrultusunda, farklı mikroorganizmaların neden oldukları çok çeşitli enfeksiyonların, bugüne kadar bilinenin aksine, bağımsız (planktonik) formlardan değil, biyofilm formlarından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Costerton vd. 1999). Biyofilm karakterizasyonu çalışmalarından elde edilen bulgular, yüzeyle ilişkili bu mikroorganizma topluluklarının karmaşıklıklarının ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur. Bu çalışmalarda biyofilm bakterilerinin planktonik

hücrelerden farklı çeşitli fizyolojik davranışlar kazandığını kanıtlamıştır. Örneğin, bakterilerin oluşturduğu ortak yaşam formlarının ayrıca hücre dışı polimerik bir aė içerisine alınması sonucu, patojenlerin konakçı sistem tarafından fagosite edilmeleri güçleşir ve immün yanıtların patojenlere etki etmesi gerçek anlamda güçleşir ( ift i 2005).

Biyofilm hücreleri çevresel streslere, antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli fenotip sergiledikleri için, gıda endüstrisinde ortadan kaldırılmaları son derece zordur. Bu nedenle, biyofilm oluşumuna müdahale etmede yardımcı olacak yeni stratejiler geliştirmek için çok çaba harcanmaktadır. Jahid ve Ha (2012) ve Srey ve arkadaşları (2013), sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, ozon ve perasetik asit dahil olmak üzere, gıda endüstrilerinde hijyeni verimli bir şekilde sürdürmek ve daha fazla etkinlik sağlamak için kullanılan geleneksel biyofilm kontrol stratejilerini biyofilm yapılarına karşı denemişler ve belirli düzeylerde etkinlik saptamışlardır. Giaouris ve arkadaşları (2014) ayrıca uçucu yağlar ve bakteriyofajlar gibi bazı yeni patojen biyofilm kontrol yöntemlerini detaylı bir şekilde irdelemiş ve etkin preparatlar hazırlamışlardır. Tüm bunların yanında, N-asilhomoserin lakton (AHL), otoindükleyici-2 (AI-2) ve c-di-GMP gibi mikrobiyal metabolit molekülleri, biyofilm oluşumunu önlemek için alternatif bir yol olarak devreye sokulmuştur (Wang vd. 2013, Park vd. 2015). Bununla birlikte, bu yaklaşımların etkinliği, güvenliği ve uygulanabilirliği konusunda son çalışmalar ışığında ciddi kuşkular ortaya çıkmıştır. Neticede laboratuvar koşullarında incelenen birçok yaklaşım, gerçek gıda işleme süreçlerinde etkisiz ya da insan sağlığı ve çevresel açıdan riskli bulunmuştur. Zira bu kontrol stratejilerinin, biyofilm yapısındaki EPS tarafından sağlanan geçirgenliğin sınırlandırılması nedeniyle biyofilm yapılarına kontrol ajanlarının nüfuz edememesi, kullanılan ajanların kalıntılarının olası toksisitesi, farklı bakteriler arasında genetik değişimin indüklenmesi ve dezenfektanlara karşı direnç teşviki gibi iyi bilinen başka dezavantajları vardır. Bu nedenle, gıda endüstrisinde biyofilm yapılarını kontrol etmeye yönelik yeni yaklaşımlar, geri dönüşümsüz tutunma, mikrokoloni oluşumu, olgunlaşma ve dağılıma gibi biyofilm oluşumunun dinamik süreçleri esas alınarak geliştirilmektedir (Mizan vd. 2015).

Salmonella, gerek gıda endüstrisi ve gerekse sağlık alanında giderek daha ciddi sorunlara yol açan patojen bir bakteridir. *Salmonella* virölanslığında rol oynayan en önemli özelliklerden biri, bu cinse ait serovaryetelerin biyofilm oluşturma özellikleridir (Xu vd. 2010). *Salmonella* ile kontamine olmuş çiğ ve az pişmiş yiyeceklerin tüketimi, kusma, ishal gibi semptomlarla karakterize edilen akut gastroenterit gelişimine yol açabilir. *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenlerin doğal ve endüstriyel ortamlarda, planktonik formdan ziyade biyofilm oluşturarak üredikleri ve kalıcılıklarını sağladıkları kabul edilmektedir (Shi ve Zhu, 2009, Thallinger vd 2013). *Salmonella*, bitkileri kolonize etmek için ince agregatif fimbrialar (curli fimbria) ve polimerler (selüloz ve O-antijen kapsülleri) gibi hücre dışı matriks bileşenlerini kullanır ve sonuçta insanlarda tüketilen ve hastalığa neden olan bir biyofilm yapılarını oluşturur (Barak vd. 2007). *Salmonella* cinsi üyelerinin biyofilm oluşturmaları; kanatlılar, domuz ve sığır gibi domestik hayvanların bağırsak sistemlerinde kolaylıkla taşınmalarına neden olmaktadır (Althouse vd. 2003, Ricke 2003, Morgan vd. 2004). *Salmonella* enfeksiyonu hem sanayileşmiş hem de az gelişmiş ülkelerin gözetim, önleme ve tedavi ile ilişkili maliyetler yoluyla ekonomik yüküne katkıda bulunan, dünya çapında önemli bir halk sağlığı kaygısı olmaya devam etmektedir (Crump vd. 2004). Biyofilm nedeniyle gıdaların bakteriyel kontaminasyonu, gıda endüstrisine her yıl milyonlarca dolarlık ekonomik yüke neden olmaktadır (Hohmann 2001, Brooks ve Flint 2008, Marchand vd. 2012). Gıda kaynaklı patojenlerin biyofilmleri, özellikle süt ürünleri, balık işleme ürünleri, kümes hayvanları ürünleri ve tüketime hazır gıdalar dahil olmak üzere çeşitli gıda işleme alanlarında yaygın olarak tespit edilmektedir (Simoes vd. 2010, Srey vd. 2013). Bunun bir örneği, İspanya’da 2008 yılında ortaya çıkan *Salmonella* salgınıdır. Bu salgının, işleme sahasında et suyunu taşıyan bir borunun kıvrımında oluşan *Salmonella hadar* biyofilminden kaynaklandığı belirlenmiştir (Perez-Rodriguez vd. 2008).

Biyofilm yapılarının özellikle deri geçişli tıbbi cihazlar, medikal yüzeyler ve konak doku ve organlar üzerinde meydana gelebileceğinin belirlenmesi, sağlık alanında biyofilm yapılarının ciddi bir risk oluşturabileceğine işaret etmiş, ve bu belirlemeyi takip eden çalışmalarda biyofilmlerin planktonik formlardan daha büyük bir risk kaynağı olduğu tespit edilmiş ve pek çok farklı hastalıkta rol oynamasından ötürü klinik sistemlerde de göz önünde bulundurulması gereken bir olgu olduğu anlaşılmıştır (Moretro vd. 2009).

İntravenöz kateterler, implantlar, kalp kapakçıkları, kalp pilleri, kontakt lensler başta olmak üzere farklı materyaller ve organik (biyolojik) yüzeylerde gelişen biyofilm yapıları sağlık açısından çözümü çok zor sorunlara yol açmaktadır (Lindsay ve von Holy 2006). Patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilmlerin akciğer doku hücreleri, böbrek taşları ve diş minesi üzerinde bulunabildiğine dair sayısız örnek mevcuttur. Hastahane kaynaklı enfeksiyonların amilleri olan patojen mikroorganizmaların bir çok türünün derigeçişli tıbbi implantlar üzerinde biyofilm oluşturma kabiliyetleri bulunmakta ve bu durum da insan vücudunda sürekli enfeksiyonların gelişiminin kaynağını teşkil etmektedir (Vogel vd. 2000). Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa* suşları, implantlar aracılığı ile ya da doğrudan doku üzerinde oluşarak, üst solunum yolu enfeksiyonlarına (Govan ve Deretic 1996), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* türleri esas olarak üriner sistem enfeksiyonlarına (Kahlmeter 2003), *Porphyromonas gingivalis* ise diş eti iltihabına (Kuramitsu vd. 2001, Sandoe vd. 2002, Ferrieres vd. 2007, Jacobsen vd. 2008, Fey ve Olson 2010, Reyes ve Zervos 2013) yol açmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi henüz gelişmemiş ya da değişik etkilerle düşmüş bireylerde fırsatçı bakterilerin oluşturduğu biyofilm formları, ciddi sağlık sorunlarına ve engellenemeyen durumlarda da ölüme neden olmaktadır. Bugüne kadar yürütülen tarama çalışmaları sonucunda rapor edilen bakteriyel hastalıkların yaklaşık % 85'inin biyofilm formlarından kaynaklandığı, Kronik bakteriyel enfeksiyonların % 80'inden fazlası biyofilmler ile ilişkilendirilirken, hastahane kaynaklı enfeksiyonların ise yaklaşık % 70'inin yine biyofilm kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Kostakioti vd. 2013).

Tüm bunların yanında endüstriyel ve tıbbi çalışma alanı yüzeylerindeki mikroorganizma kaynaklı aşınmanın, söz konusu mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu oluşturdukları yan ürünlerle, amfibolik bileşiklerle ya da anabolizma giriş substratları ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Mikroorganizmaların metal yüzeyi ile kurduğu ilişki ve etkileşimi sonucu ortaya çıkan elektrokimyasal reaksiyonlar metalin çözünerek korozyona uğramasına sebep olur (Ovri vd. 2013, Wesley vd. 2013). Özellikle farklı yüzeylerde (metal, ahşap ve beton gibi) yaratılan stres etkisiyle biyofilm formu oluşturan mikroorganizmalarda koroziyon etkinliği, aynı mikroorganizmaların planktonik formlarına oranla çok daha fazla olmaktadır (Görs vd. 2007, Javaherdashti 2011). Biyofilmler bu kritik özellikleri ile; başta gıda, kimya ve medikal endüstri olmak üzere, uzay, doğal gaz,

ve petrol endüstilerinde de tüm üretim yüzeylerinde geliştiklerinde, hem ekonomik kayıpların ve hem de sağlık sorunlarının ana nedeni haline gelmektedir. Geleneksel mikroorganizma giderme yöntemlerine karşı çok yüksek oranda dirençlilik gösterdiklerinden yukarıda sayılan tüm endüstri alanlarında temel mikrobiyolojik sorun haline gelmişlerdir. Bu nedenlerle biyofilmler ile mücadele giderek artan bir önem kazanmıştır (Lee vd. 2007, Burgos vd. 2013, Islam vd. 2014).

Biyofilm formları ile mücadelede en etkin strateji hedef yüzeylerde biyofilmin oluşumunun engellenmesidir. Biyofilm oluşturabilmeleri için ilk aşamada planktonik formların yüzeylere tutunması gerçekleşmelidir. Eğer bu yüzeylerde mikroorganizma tutunmasını bloke edecek koşullar sağlanır ise (yüzey alanının daraltılması, yüzeylerde gerçekleştirilen çalışmalardan kalan atıkların iyi bir şekilde temizlenmesi ve antibiyofilm ajanları ile muamele işlemleri gibi uygulamalar bu amaçla periyodik bir şekilde yapılmalıdır) yüzeylerde biyofilm oluşma etkinliği önemli ölçüde engellenebilir (Davey ve O'Toole, 2000). Biyofilm yapılarının en büyük ekonomik kayıplara ve kitlesel sağlık sorunlarına yol açtığı gıda sanayiinde, bu yapılarla mücadelede günümüzde tercih edilen ana strateji mekanik uygulamalarla gerçekleştirilen sanitasyon işlemleridir. Mekanik uygulamalar genellikle yüksek basınç uygulama özellikleri geliştirilerek dizayn edilmiş, fırça benzeri temizleme ekipmanlarıdır. Bu yolla biyofilm yapılarına karşı sağlanan etkinlik, diğer klasik sanitasyon yöntemlerinden daha yüksek olmaktadır. İşletme ya da içme suyu taşıyıcı sistemlerinde ise biyofilm yapılarının oluşumuna hiç izin verilmemelidir. Aksi takdirde sonradan uygulanacak sanitasyon işlemleri biyofilmin daha geniş alanlara yayılma sorununu yaratabilir. Bundan dolayı su taşıma sistemlerinde periyodik mikroorganizma giderme çalışmaları yapılmak zorundadır. Söz konusu sistemler planlama aşamasında bu periyodik uygulamaları mümkün kılacak şekilde dizayn edilmeli ve özellikle boru yüzey materyallerinin antimikrobiyal özellikte olmasına dikkat edilmelidir. Bu doğrultuda planlama yapılmadan tesis edilen su taşıma ve depolama sistemleri biyofilm kaynaklı inatçı enfeksiyonların ve ekonomik kayıpların ana kaynağını teşkil edebilmektedir (Islam vd. 2014).

Sürekli artan endüstriyel üretim ve nüfus yoğun alanlar biyofilm kökenli enfeksiyonlarının insidansını artırmakta ve bu durum da biyofilm formları ile etkin bir

şekilde mücadele etme zorunluluğunu dayatmaktadır Farklı alanlarda biyofilm yapılarını tanımlamaya yönelik olarak geliştirilecek yöntemler, bu mücadelede kritik bir rol üstlenmektedir. Biyofilm yapılarının regülasyonunda rol oynayan global regülatörlerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesi, biyofilmlerle mücadele açısından dikkat çeken yeni bir yaklaşımdır. Bu amaçla günümüzde in vivo ve in vitro süreçleri esas alan çok sayıda yöntem ve hatta tanı kitleri geliştirilmiştir. Biyofilm ile mücadele; bireysel biyofilm hücrelerinin ve tüm biyofilm sistemlerinin faaliyetlerinin anlaşılması ve bu bilgilerden hareketle yeni kontrol stratejilerinin formüle edilmesi doğrultusunda hızlı bir gelişme göstermektedir (Burgos vd. 2013).

Biyofilm matriksi, esas olarak hücre dışı DNA (eDNA), proteinler ve hücre dışı polisakkaritlerden oluştuğu için, son çalışmalarda, biyofilm yapısının çeşitli enzimler kullanılarak yıkımı üzerinde de durulmaktadır. Ancak enzimsel etkiyi ölçen kantitatif yöntemlerin geliştirilememesi ve bu uygulamaların yüksek maliyet içermesi, endüstriyel kullanımlarındaki temel sınırlayıcı unsurlardır. Monokomponent enzimlerin homojen biyofilmler için kullanım potansiyeli vardır, ancak biyofilm matrisindeki yaygın heterojenite bu enzimlerin etkinliğini kritik bir düzeyde düşürmektedir. (Johansen vd. 1997). Saha uygulamalarında; biyofilmlerin enzimatik olarak parçalanması; biyofilm matriksini zayıflatıcı kimyasalların, yüzey aktif bileşiklerin, stabilizatörlerin ve yüksek frekanslı ses dalgalarının kullanımı, güçlü bir antibiyofilm etkisi yaratmak için önerilen başlıca yöntemlerdir (Oulahal vd. 2004, Turakhia vd. 2007).

2.4 *Salmonella* Biyofilm Oluşumunun ve Virülanslığın Genetik Regülasyonu

Bakterilerde, gen ekspresyonundaki değişiklikler genellikle RNA polimerazın katalitik çekirdeği ile bir bakteri hücresinde bulunan farklı sigma faktörleri arasında gerçekleşen etkileşim değişiklikleri yoluyla transkripsiyonel seviyede kontrol edilir (Borukhov ve Nudler 2003). RNA polimeraz, belirli çevresel koşullar altında uygun genleri tanımaktan ve yeni proteinlere çevrilebilen mRNA transkriptlerini oluşturmaktan sorumlu enzimdir. Sigma faktörleri, prokaryotik RNA polimerazın ayrışabilir alt birimleridir. Sigma faktörleri, RNA polimerazın spesifik başlatma bölgelerine bağlanmasını destekleyen ve daha sonra serbest bırakılan başlatma faktörleridir. Bir sigma faktörü, RNA polimeraz

holoenzimi oluşturmak için bir çekirdek RNA polimeraz ile birleştiğinde, holoenzimi, yapısal gen dizilerinden önce gelen ve promotor bölgeleri olarak adlandırılan korunmuş DNA motiflerini tanımaya yönlendirir. Sigma faktörleri, durağan fazın ve genel stres tepkisinin ana transkripsiyonel düzenleyicisidir. Sigma faktörleri ayrıca, transkripsiyon başlangıcında kritik bir adım olan DNA sarmal ayrılmasına da katkıda bulunur. Sigma alt birimi, transkripsiyon başladıktan kısa bir süre sonra RNA polimeraz çekirdek enziminden ayrışır ve böylece yeniden birleşme için uygun hale gelir. Farklı alternatif sigma faktörleri ve çekirdek RNA polimeraz arasındaki ilişkiler, esas olarak, RNA polimeraz holoenziminin farklı promotor dizilerini tanıma ve tamamen yeni hedef gen kümelerini ifade etme yeteneğini yeniden programlamaktadır. Tek bir sigma faktörü tarafından kontrol edilen genler dizisi (aynı zamanda regulon olarak da bilinir) yüzlerce olabileceğinden, sigma faktörleri çok sayıda prokaryotik geni aynı anda düzenlemek için etkili mekanizmalar sağlar. σ^S (RpoS), Gram-negatif bakterilerde genel strese duyarlı alternatif sigma faktörü olarak tanımlanmıştır. σ^S , hem *E. coli* hem de *S. Typhimurium*'da, hücre üssel büyüme koşullarından çıkıp durağan faza geçerken hücre canlılığını sürdürmek için gerekli olan çok sayıda genin ekspresyonunu aktive eden bir Grup II sigma faktörü olarak tanımlanmıştır (Lange ve Hengge-Aronis 1991, Fang vd. 1992). *E. coli* ve *S. Typhimurium*'un durağan faza geçişle ve farklı çevresel stres koşullarına yanıt verme ile ilişkisinin yanı sıra, σ^S ayrıca virülansla ilişkili genlerin ekspresyonuna da katkıda bulunur (Fang vd. 1992). İlk keşfinden bu yana, σ^S 'nin varlığı ve stres tepkisindeki rolü, *Pseudomonas aeruginosa*, *L. pneumophila*, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia enterocolitica* ve *Shigella flexneri* dahil olmak üzere birçok farklı Gram-negatif bakteriyel patojende doğrulanmıştır. Diğer yandan, hücre içi ikincil haberci nükleotit c-di-GMP, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerin biyofilm yaşam döngüsünde kilit bir role sahiptir. Artan c-di-GMP seviyelerinde *Salmonella*'da biyofilm oluşumu teşvik edilirken, düşük c-di-GMP seviyelerinde biyofilm dağılımının indüklendiği belirlenmiştir (McDougald vd. 2011).

2.5 *Salmonella*'da Replikasyonun Tecridini Sağlayan *seqA* Geni ve Kodladığı Proteinin Karakteristikleri

S. Typhimurium'da kromozomal DNA'nın replikasyonunun başlaması, hücre bölünmesi ile koordine edilir. Bakteriyel kromozomal DNA'nın replikasyonu, sadece bir kez, kromozomal replikasyon orijini (*oriC*) olarak bilinen spesifik bir bölgede başlatıcı protein DnaA tarafından başlatılır. Bu protein, özellikle *oriC*'de mevcut olan 9-bç palindromik olmayan dizilerle (DnaA kutuları) etkileşir. Bakterilerde, replikasyonu tek bir kökenden başlatmak, hücre döngüsü başına sadece bir kez gerçekleşmesini sağlamak ve kromozomal replikasyonu kontrol etmek için spesifik mekanizmalar mevcuttur. SeqA proteini, DNA replikasyonunun başlama zamanını regüle eden ve yeni replike edilen orijin bölgelerin tecridini (sequestration) sağlayan protein karakteristiğine sahiptir (Hiraga vd. 1998, Balbontin vd. 2006).

seqA geni ürünü SeqA proteini, *Escherichia coli* DNA'sının metilasyon/hemimetilasyon döngüsünde yer alan bir protein olarak keşfedilmiştir (Lu vd. 1994). *Salmonella* cinsi üyelerinin de içinde bulunduğu gammaproteobacteria üyelerinde ana metil transferaz enzimi deoksiadenin metil transferaz (Dam) enzimidir. Dam enzimi metil donörü olarak S-adenosilmetiyonin kullanarak 5'-GATC-3' bölgelerinde bulunan adenosin kalıntılarını metile eder (Lacks ve Greenberg 1977, Hattman vd. 1978). *Salmonella enterica*'da, DNA adenin metiltransferaz (veya Dam metilaz) enziminin sorumlu olduğu Dam metilasyonu post-replikatifdir ve bu durum DNA yapısında protein bağlanmasını etkileyebilecek değişikliklere neden olur (Sternberg 1985, Bolker ve Kahmann 1989, Campbell ve Kleckner 1990). DNA metilasyonu bakterilerde; DNA replikasyonu (Campbell ve Kleckner 1990, Boye ve Lobner-Olesen 1990), gen regülasyonu (Heithoff vd. 1999, Balbontin vd. 2006), yanlış eşleşme onarımı (Radman ve Wagner 1986), kromozom ayrımı (Ogden vd. 1988), insersiyon elemanlarının transpozisyonu (Roberts vd. 1985), fimbria sentezi (Braaten vd. 1994, van der Woude ve Low 1994, van der Woude vd. 1996, Nicholson ve Low 2000) ve bakteriyel konjugasyon (Torreblanca ve Casadesus 1996, Torreblanca vd. 1999) gibi hücresel süreçleri modüle etmek için bir sinyal görevi görebilir.

Replikasyon orijininde replikasyonun başlamasından hemen sonra replikasyon çatalı ilerlemesini ve yeni iplikçik sentezini takiben, yeni DNA hemimetile olur ve Dam enzimi tarafından metilasyona uğratılana kadar bu durumda kalır. Bu durumda SeqA proteini, DNA replikasyon çatalını takip ederek hemimetillenmiş DNA'nın GATC dizilerine (hemimetile bölgeler) yüksek afiniteyle bağlanır ve Dam metil transferaz enziminin bağlanmasını ve metilasyon aktivitesi göstermesini engellemek suretiyle, eşlenen replikasyon orijinlerinden yeniden replikasyonun başlamasını hücre yaşam döngüsünün 1/3'ü oranında durdurur (Campbell ve Kleckner 1990, Espeli vd. 2008). *oriC* bölgesindeki bu tecrit remetilasyonu geciktirir ve DNA replikasyonunun başlatılmasını kontrol eden DnaA proteininin bağlanmasını önler. SeqA hedef serilerden ayrıldığında ise Dam metil transferazın bağlanması ve metilasyonunun tamamlanması mümkün hale gelir. Bu durum yeni kopyalanmış DNA'da nükleoid organizasyonuna katkıda bulunabilir (Brendler vd. 2000, Lobner-Olesen 2003, Klungsoyr ve Skarstad 2004, Yamazoe vd. 2005). Bu sayede replikasyonel hata tamiri ve eşlenen kromozomların segregasyonel stabilitesi garanti altına alınır (Low vd. 2001, Bach 2003).

SeqA'nın, DNA ile etkileşimlerinin spesifikliğine ilişkin yapılan ilk çalışmalarda, kısa oligonükleotidler kullanıldığında, SeqA'nın hemimetillenmiş DNA üzerinde bulunan GATC dizilerine özel olarak bağlandığı, ancak tamamen metillenmiş veya metile edilmemiş DNA'ya bağlanmadığı tanımlanmıştır (Brendler ve Austin 1999, Kang vd. 1999). Slater ve diğerleri (1995), daha uzun parçalar kullanarak, SeqA'nın, *oriC*'yi güçlü ve spesifik bir şekilde tamamen metillenmiş bir DNA parçasına bağlandığını gösterdi. Benzer deneylerde, hemimetillenmiş bir *oriC* parçası kullanarak, DNA ile daha güçlü bir şekilde etkileşime girdiği de ortaya konuldu. Ayrıca, hemimetillenmiş *oriC* ve *oriC* olmayan sekansların, SeqA tarafından benzer bir afiteyle tanındığı da belirlendi (Slater vd. 1995). Hemimetillenmiş *oriC* üzerinde SeqA bağlanması için bölgelerin araştırılması, tamamen metillenmiş *oriC* için bulunan DnaA kutusu R1'in her bir tarafında aynı tercihlili bağlanmanın gerçekleştiğini göstermiştir (Skarstad vd. 2000). Bu bağlanmanın, tamamen metillenmiş veya hemimetillenmiş olup olmadıklarına bakılmaksızın belirli GATC sekanslarında aynı spesifikasyona sahip olduğu da tespit edilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucu, SeqA proteininin hemimetillenmiş DNA dizilerine ilgisinin, çift zincirde metillenmiş dizilerden daha yüksek olduğunu kanıtlamıştır (Bae vd. 2003).

SeqA proteininin, kromozom replikasyonu ve nükleoid segregasyonundaki rollerinin yanı sıra, belirli genlerin transkripsiyonel regülasyonuna katıldığı da saptanmıştır (Slominska vd. 1999). SeqA proteini, Dam metil transferazdan farklı olan bu aktivitelerini, Dam metil transferazın da hedef serisi olan, 5'GATC3' tanıma dizilerine bağlanarak gösterir. SeqA regülatör proteini, hemimetillenmiş 5'GATC3' dizilerine Dam metil transferazdan daha yüksek bir ilgi ile bağlandığından, replikasyonun erken aşamalarında Dam metilaz bağlanmasını inhibe ederek, replikasyonun başlamasının regülasyonunu gerçekleştirir (Slominska vd. 2003). SeqA'nın sadece hemimetillenmiş DNA dizilerine değil, aynı zamanda her iki zinciri de metillenmiş tanıma dizilerine bağlanma aktivitesi göstermesi, söz konusu proteinin genetik regülasyon kapasitesinin Dam metil transferazlardan daha yüksek olabileceğine işaret etmektedir (Slater vd. 1995, Jakomin vd. 2008). SeqA proteininin transkripsiyonel regülasyon aktivitesini; bağlanma bölgelerinde süperkangal dönüşleri artırarak ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma etkinliğini değiştirerek sağladığı saptanmıştır (Chatti vd. 2014). Son yıllarda yürütülen çalışmalarda SeqA proteininin aktivitesi, *Salmonella*'daki farklı genlerin düzenlenmesine katıldığının ve SeqA proteini üretimi engellenmiş *Salmonella* mutantlarında konak hücrelere tutunmanın ve özellikle konak hücre işgalinin ve virülanslığın önemli ölçüde düştüğünün, membran fosfolipitlerinin yapısal değişime uğradığının ve fimbriyal genlerin faz varyasyonunun (*papI* ve *papB*) regülasyonunun gerçekleştiğinin belirlenmesi, *seqA* geninin potansiyel bir global transkripsiyonel regülatör olarak önemini artırmıştır (Garcia-del-Portillo vd. 1999, Correnti 2002, Lobner-Olsen vd. 2005, Jakomin vd. 2008, Aloui vd. 2010, Chatti vd. 2008 ve 2014, Uğur vd. 2018).

2.6 Transkriptomik Analizlerin Doğası

Son zamanlarda genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi “omik” teknolojiler üzerinde sağlanan yüksek uygulama gücü, bu yaklaşımların biyofilm araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmasını mümkün hale getirmiştir. Özellikle DNA dizi analizlerinde yeni nesil sekans yöntemlerinin ve cihazlarının geliştirilmesi, toplam genom analizlerinin mikrobiyal topluluk seviyelerinde kullanılmasını ve bu sayede biyofilm komünitelerinin genetik potansiyeli ve buna bağlı olarak da biyofilm yapılarındaki farklı organizmaların aralarındaki ilişkiler üzerine hızlı bir bilgi birikimi

sağlanmasına yol açmıştır (Grzymski vd. 2008, Denef vd. 2010). Diğer yandan, transkriptomik yaklaşımlar (RNA dizi analizleri, mikrodizin yöntemleri ve ters transkripsiyon kantitatif PZR) ile; biyofilmler içerisinde gerçekleşen bütünsel ya da bölgesel (kısmi) gen regülasyonu ve ifadesi hızlı bir çözüm sürecine evrilmiştir. Bu gelişmeler doğrultusunda biyofilm kontaminasyonlarından korunma ve biyofilm yapılarının eradikasyonu programlarının etkin bir şekilde hayata geçirilmesi hedeflenmektedir (Williamson vd. 2012, Ishii vd. 2013).

Transkriptom dizileme; mRNA transkripsiyon-ekspresyon analizi, mikro RNA örüntülemesi, transkripsiyon faktörlerinin trans etkili alanlarının tüm genom üzerinde tespiti, kromozomun modellenmesi ve metilasyon paternlerinin belirlenmesi, yeni genlerin keşfi, henüz genom analizleri bitirilmemiş organizmalarda genlerin fonksiyonel tanısı, tüm gen dizisinin oluşturulması, tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) belirlenmesi, insersiyon-delesyonlar ve “splays” varyantlarının tespiti ve allel spesifik ifade örüntülerinin analizini kapsayan geniş bir uygulama alanına sahiptir. Transkriptom analizleri, DNA ile regülatör proteinlerin interaksiyonlarının detaylı bir şekilde tanısını, ekonomik ve kolay bir uygulamaya dönüştürme kapasitesi vardır. Bu nedenlerle, söz konusu analizler, moleküler biyolojik araştırmaların en önemli araçlarından biri haline gelmiştir (Yang vd. 2015).

miRNA'lar (mikroRNA) tüm biyolojik sistemlerde, genetik regülasyonun temel araçlarından biridir. Küçük RNA'lar, genomda genellikle intronik bölgelerde bulunduklarından, translasyonları yapılan RNA molekülleri değildir. Bunun dışında nadiren bağımsız gen bölgelerinden üretilen ve küçük peptidlere dönüştürülen miRNA molekülleri de tanımlanmıştır (Kidner ve Martienssen 2005). Büyüklükleri yaklaşık 21-24 nükleotit arasında değişen miRNA molekülleri ökaryotik organizmalarda çekirdek bölgesinde transkribe edilir ve işlenir, fonksiyonel oldukları hücresel lokasyon ise sitoplazmadır (Yang vd. 2015). Bakterilerde miRNA moleküllerinin, merkezi metabolizma fonksiyonları ve stres yanıtı oluşumu ile ilişkili genlerin transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonu yanında, mobil DNA elementleri ve integronların (virüsler de dahil) represyonunu gerçekleştirerek genomik düzeyde koruma sağlamada önemli rollere sahip olduğu belirlenmiştir. miRNA fonksiyonlarını ortaya çıkarmak için transkriptom

profillemesi; genom ebadında miRNA taramalarının gerçekleştirilmesi, yeni miRNA'ların ve bunların ekspresyon kabiliyetlerinin belirlenmesi açısından, araştırmacılara yüksek düzeyde esneklik sağlayan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Tüm bunların yanında, söz konusu yöntem ile kombine edilen yeni nesil dizileme teknolojileri, sadece tek bir nükleotid farkı ile miRNA'ları birbirinden ayırt edebilecek duyarlılıkla geliştirilmiş olduğundan, deneysel süreci yüksek bir hassasiyete ulaştırma kabiliyeti de içermektedir (Pritchard vd. 2012).

Transkripsiyon, bakteri fizyolojisinde temel bir süreçtir. Gen düzenlemesinin ilk adımıdır ve bu sürecin önemi nedeniyle yoğun bir şekilde düzenlenir (regüle edilir). Bakterilerde transkripsiyonun uygun şekilde düzenlenmesi, bulundukları çevresel koşulların dramatik ve hızlı bir şekilde değişebileceği için kritiktir. Promotor, bir genin transkripsiyonunun ne zaman ve nasıl başlatıldığını belirleyen bir kromozom bölgesidir (Blanc vd. 2015). Bakterilerde promotor bölgeler, bölgeyi RNA polimeraz (RNAP) ve gerekli herhangi bir transkripsiyon faktörleri (düzenleyici proteinler) tarafından tanınabilir kılan spesifik özellikler gerektirir. RNAP, kendi başına promotorlara bağlanamaz ve transkripsiyonu başlatamaz. Ancak fonksiyonel enzimi tamamlayan ve promotor bölgelerine yönlendiren spesifik sigma faktörlerine gereksinim duyar (Miller 2012). Çoğu bakteri türünde, farklı promotor setlerine özgü ve farklı çevresel koşullar altında genleri ifade etmek için kullanılan sigma faktörü mevcuttur (Lee vd. 2017). Prokaryotik organizmalarda büyük ölçüde korunmuş olan promotor bölgelerin genel özellikleri vardır. Herhangi bir transkripsiyon faktörü bağlama sahasına ek olarak, promotorun en önemli sekansları, RNAP tarafından tanınan -35 ve -10 bölgesi olarak bilinen spesifik sigma faktörü bağlanma bölgeleridir. Bu elemanlar, transkripsiyonel başlangıç bölgesinin yukarısında bulunur ve promotorun gücünü belirler (Blanc vd. 2015). Bununla birlikte, birincil DNA dizisi, genlerin transkripsiyonunu yönlendirmek için kullanılan tek bilgi değildir. Promotor bölgeleri ayrıca; RNA polimeraz bağlanmasını etkileyen eğrilik, esneklik ve diğer fiziksel özellikler gibi spesifik karakteristikler bakımından da uygun olmalıdır (Gabrielian ve Bolshoy 1999, Kanhere ve Bansal 2005, Olivares-Zavaleta vd. 2006).

Son yıllarda, özellikle nispeten küçük genom boyutları nedeniyle bakterilerde tam genom dizilemesinde bir patlama yaşanırken, promotor ve transkripsiyon başlangıç bölgesi

tanımlaması çalışmaları daha az gelişmiştir. Bakteriyel genomlardaki genlerin çoğu operonlar halinde düzenlenmiştir. Operonlar, tek bir mRNA molekülüne kopyalanan bir dizi gen olarak tanımlanabilir. Birlikte kopyalanan genler genellikle organizmanın işlevinde ilgili rolleri yerine getirir ve bazen birbirine bağlanır veya aynı metabolik yolun bir parçası olarak hareket ederler. Ek olarak, birlikte transkripsiyonu yapılan genler, transkripsiyonel seviyede birlikte düzenlenirler. Operonlar halinde gruplandırılmış genlerin belirlenmesi, gen düzenlenmesi ve işlevi hakkındaki bilgimizi artırabilir ve bu tür bilgiler, genom açıklamasına önemli bir katkı sağlar. Özetle, promotor bölgelerinin doğru tahmini, genlerin ekspresyon modellerinin belirlenmesi ve genetik düzenleyici ağların anlaşılması için anahtar bir konudur ve detaylı bir şekilde aydınlatılmaları, genomik ve transkriptomik analizlerin karşılaştırmalı bir şekilde yürütülmesi ile mümkündür (Hodgman 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri suşları ve gelişme koşulları

Yüksek Lisans tez çalışması kapsamında kullanılan doğal tip *Salmonella* Typhimurium 14028 ile onun *seqA* geni bakımından mutant suşları, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarında bulunan kültür koleksiyonundan sağlandı.

Suşlar Luria Bertani Broth (LB) besi ortamında 37 °C’de 200 rpm çalkalama hızında 18 saat süre ile geliştirildi. Mutant suşlar kloramfenikol gen kaseti içermeleri nedeniyle, gelişme ortamlarına kloramfenikol (CHL) antibiyotiği (20 µg/mL) ilave edildi.

Biyofilm denemesinde kullanılan bakteri örnekleri ise tuz içermeyen LB Broth (LB^{-NaCl}) besi ortamı kullanıldı ve bu ortamda bakteriler 37 °C ve 20 °C’de statik koşullarda geliştirildi. Çalışma süresince tüm kültürler steril mikrofüj tüplerine % 15 oranında gliserol ilave edilen Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerinde -20 °C ve 80 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Sodyum klorür	10
Agar	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2’ye ayarlandı. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C/15 dakika uygulaması ile gerçekleştirildi.

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

İçerik	g/L
Trypton	10
Maya ekstraktı	5
Agar	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandı. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C/15 dakika uygulaması ile gerçekleştirildi.

Kongo Kırmızısı (40 µg/mL) İçeren Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Trypton	10
Maya ekstraktı	5
Sodyum klorür	10
Kongo Kırmızısı	0,04
Agar	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandı. Çözülen içeriğe 0,04 gram Kongo kırmızısı ilave edildi. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C /15 dakika uygulaması ile gerçekleştirildi. Katı besiyerleri su banyosu içerisinde 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plakalarına 15 mL hacimlerde aktarıldı.

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

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

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandı. Çözülen içeriğe 0,05 kalkoflor (fluorescent brightner) ilave edildi. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C/15 dakika uygulaması ile gerçekleştirildi. Katı besiyerleri su banyosu içerisinde 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plakalarına 15

mL hacimlerde aktarıldı. Hazırlanan petri plakları, kullanılabileceği kadar karanlık bir ortamda ve 4 °C’de muhafaza edildi.

Fosfatla Tamponlanmış Su (PBS)

İçerik	g/L
NaCl	80
KCl	2
Na ₂ HPO ₄	14.4
KH ₂ PO ₄	2.4

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

Glasiyel Asidik Asit Solüsyonu

% 33’lük Glasiyel Asetik Asit 100 mL

Antimikrobiyal Ajanlar

Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanlar çizelge 3.1’de verilmiştir

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, antimikrobiyal maddeler ve dezenfektanlar

Antimikrobiyal Ajan	Sembol	Çözücü Madde
Nisin	N	0,1 N HCl
Siproflaksasin	CİP	0,1 M HCl
Proteinaz-K	-	dH ₂ O
Alfa-amilaz	α-amilaz	dH ₂ O
Etilen Diamin Tetraasetik Asit	EDTA	dH ₂ O
Sodyum Dodezil Sülfat	SDS	dH ₂ O
Hekzadezil Trimetil Amonyum Bromit	CTAB	dH ₂ O
Polietilen glikol sorbitan monolaurat	Tween-80	dH ₂ O

Nisin Stok Çözeltisi mg/mL

Nisin 20 mg
0,1 N HCl 1 mL

Siprofloksasin Stok Çözeltisi mg/mL

Siproflaksasin	25 mg
0,1 M HCl	1 mL

Alfa-Amilaz Stok Çözeltisi mg/mL

Alfa-amilaz	50 mg
0,1 M HCl	1 mL

Proteinaz-K Stok Çözeltisi (mg/mL)

Proteina-K	20 mg
dH ₂ O	1 mL

CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromit) Stok Çözeltisi (mg/mL)

CTAB	15 g
dH ₂ O	1 mL

CTAB'in çözülmesi için çözelti aralıklarla 65 °C'ye kadar ısıtıldı. Son aşamada toplam çözelti hacmi destile su ile 1 mL'ye tamamlandı.

0,05 M EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) Stok Çözeltisi (mol/L)

EDTA	14,612 mg
dH ₂ O	1 mL

Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirildi.

SDS (Sodyum Dodezil Sülfat) Stok Çözeltisi (mg/mL)

SDS	100 mg
dH ₂ O	1 mL

Tween-80 Stok Solüsyonu

Tween-80	1,09 g
dH ₂ O	1 mL

3.2 Yöntem

3.2.1 Doğal tip ve *seqA* geni bakımından mutant suşun polisistren yüzeylerde ürettikleri biyofilm miktarlarının belirlenmesi

S. Typhimurium suşlarının (doğal tip, $\Delta seqA$) polisistren yüzeyde ürettiği biyofilm miktarını belirlemek için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde, denemeye alınan bakteriler 5mL'lik LB^{-NaCl} ortamına % 1 oranında inoküle edilip, 37 °C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde 18 saat aktive edildi. İnkübasyon sonrası aktif kültürler, son konsantrasyonu OD₅₉₅=0,2 ABS olacak şekilde dilüe edildi. Deney düzeneği için 96 kuyuluk mikrotitrasyon plak düzeni oluşturulurken, her zaman dilimi ve her örnek için 3 paralel olacak şekilde ayarlandı. 96 kuyuluk mikrotitrasyon plak kuyucuklarına, 100 µL LB^{-NaCl} besiyeri (varsa ilaveten 30 µL kullanılacak konsantrasyonlarda ajan) ve 30 µL hazırlanan bakteri dilüsyonları eklendi. Pozitif kontrol kuyularına ajan eklenmemiş LB^{-NaCl} besiyerinde *S. Typhimurium* suşları (OD₅₉₅=0,2), negatif kontrol kuyularına ise sadece LB^{-NaCl} ilave edildi. Plaklar 24, 48 ve 72 saat süresince, 20 °C'de statik koşullarda inkübasyona bırakıldı (Vestby vd. 2009). İnkübasyon süreci sonunda planktonik hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla kuyular 3 defa bulunan toplam süspansiyon miktarı kadar PBS ile yıkandı ve 5 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Oda sıcaklığında kurutulan kuyulara, 130-160 µL % 95' lik (v/v) metanol ilave edilerek 10 dakika inkübasyon ile oluşan biyofilm yapısının fiksasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon bitiminde metanol uzaklaştırıldı ve bu ortamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra tutunan biyofilm hücrelerini boyamak amacıyla kuyulara 130-160 µL % 1 kristal viyole ilave edildi ve 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda kuyular distile su ile 3 kez yıkandı ve ardından biyofilm yapısına bağlanan boyayı çözmek amacı ile 130-160 µL % 33'lük (v/v) glasiyal asetik asit eklenip oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi (Stepanovic vd. 2000). Boya yoğunluğu, ELISA (enzim bağlı immunosorbent) okuyucusu ile OD₅₉₅ 'te ölçüldü ve elde edilen değerlerin ortalamasından kontrol olarak kullanılan sadece LB^{-NaCl} içeren kuyulardan elde edilen değerler çıkarılarak biyofilm üretim miktarları belirlendi.

Glukoz varlığında polisistren yüzeyde biyofilm oluşum kapasitesinin ölçülmesi deneyi için ayrıca ortama % 1, % 2 ve % 3 oranlarında glukoz; safra tuzu varlığında polisistren yüzeyde

biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi deneyi için ise ortama % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5, % 0,6, % 0,7, % 0,8, % 0,9 oranlarında safra tuzu ilave edilerek yukarıdaki basamaklar izlendi.

Biyosurfaktan ve biyoenzimlerin varlığında polisistren yüzeyde biyofilm oluşum kapasitesinin belirlenmesi deneyi için, besieri içeren kuyucuklara, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan biyoenzimler veya biyosurfaktanlar (izelge 3.2), deneme desenine uyularak 30 µL eklendikten sonra yukarıda ifade edilen basamaklar izlendi (Wang vd. 2016).

Çizelge 3.2 Denemelerde kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları

Biyosurfaktanlar	CTAB (0,5 mg/mL - 1 mg/mL – 10 mg/mL)
	SDS (5 mg/mL - 10 mg/mL – 100 mg/mL)
	Tween-80 (5 mg/mL - 10 mg/mL – 100 mg/mL)
	EDTA (1mM – 10 mM – 50 mM)
Biyoenzimler	CİP (0,25 µg/mL - 0,5 µg/mL - 5 µg/mL)
	Proteinaz-K (0,2 mg/mL - 0,4 mg/mL - 4 mg/mL)
	Alpha-amilaz (0,5 mg/mL - 1 mg/mL - 5 mg/mL)
	Nisin (1 mg/mL - 5 mg/mL - 10 mg/mL)

Gram-pozitif bakterilerde etkinlik gösteren nisin bakteriyosininin Gram-negatif olan *Salmonella* suşlarının ürettiği biyofilm yapıları üzerindeki etkinliğini artırmak amacıyla bu bakteriyosin, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antimikrobiyal ajanlar ile kombine edilerek kullanıldı (izelge 3.3). Daha önce biyofilm oluşumunun inhibisyonuna yönelik yapılan denemede belirlenen konsantrasyonlardaki solüsyonlar 1:1 ve 1:1:1 oranında karıştırılarak 30 µL biyofilm koşullarında geliştirilecek suş ortamına ilave edildi ve daha sonra yukarıda açıklanan adımlar takip edildi.

Çizelge 3.3 Nisin ile kombinasyon denemelerinde kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları

Nisin 10 mg/mL+ EDTA 1 mM	A
Nisin 10 mg/mL + EDTA 10 mM	A1
Nisin 10 mg/mL + EDTA 50 mM	A2
Nisin 1 mg/mL + EDTA 50 mM	A3
Nisin 5 mg/mL + EDTA 50 mM	A4
Nisin 10 mg/mL+ CİP 5 µg/mL	B
Nisin 1 mg/mL + EDTA 10 mM + CİP 5 µg/mL	C

Çalışmada, negatif kontrol üzerinden cut-off OD (OD_c , sınır, eşik) hesaplandıktan sonra biyofilm üretimi bakımından değerlendirmeye tabi tutuldu. Sonuçlar "cut off" değerlerine göre üretilen biyofilm düzeyi açısından "üretici olmayan", "zayıf", "orta" ve "güçlü" olmak üzere değerlendirildi (Stepanovic vd. 2000, Vestby vd. 2009). Biyofilm üreticisi suşların biyofilm üretim kapasiteleri aşağıda ifade edilen sınır değerlerin dönüşümleriyle ifade edilmektedir (Çizelge 3.4)

Çizelge 3.4 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri

$OD \leq OD_c$	üretici değil
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	zayıf üretici
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	orta düzey üretici
$4 \times OD_c < OD$	güçlü üretici

3.2.2 Kalkoflor bağlanma uygulaması

Denemelerde kullanılan bakteriler, selüloz varlığının ayırıcı olan kalkofloru içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl'siz LB agar ortamlarında üretildi. Bakteriyel ekimlerin gerçekleştirildiği besiyerlerini içeren Petri plakları 20 °C'de 8 gün boyunca inkübasyona tabi tutuldu ve bu süre sonunda Petri plaklarında bakteriyel üreme sonucunda biyofilm yapılarının ana hücre dışı matriks bileşeni olan selülozun üretilip üretilmediği, üreme alanları 366 nm UV ışık altında incelenerek tespit edildi ve bu ortamların fotoğrafları alındı (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 366 nm UV ışık altında floresan özellik gösteren örnekler

selüloz üretimi bakımından pozitif; göstermeyenler ise selüloz üretimi bakımından negatif olarak değerlendirildi (Vestby vd. 2009).

3.2.3 Selüloz aktivitesinin değerlendirilmesi

Selüloz aktivitesinin değerlendirilmesi çalışmasında agar kuyu difüzyon testi uygulandı. Mutant ve doğal tip kültürler % 5 oranında karboksimetil selüloz içeren ve NaCl içermeyen LB sıvı besiyerinde 18 saat 200 rpm çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PBS içerisinde OD₆₀₀=5 ABS olacak şekilde kültür süspansiyonları hazırlandı. % 5 karboksimetil selüloz içeren NaCl' siz LB katı besiyerlerinde 5 mm çapında kuyular açılarak hazırlanan kültür süspansiyonundan 100 µL kuyulara aktarıldı. 20 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda, % 0,1 oranında Kongo Kırmızısı içeren PBS solüsyonu, agar yüzeyine yayılarak 30 dakika inkübasyona devam edildi. İnkübasyon bitiminde agar plakları 3 kez PBS ile 15 dakika boyunca yıkandı. Agar Kongo Kırmızısı ile boyandıktan sonra kuyu etrafında oluşan degradasyon zon çapları selüloz etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirildi (Ahmad vd. 2016).

3.2.4 Bakteriye 'Swimming' ve 'Swarming' hareketlerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, *S. Typhimurium seqA* mutant suşu ile doğal tip suşun flagellaya bağlı bireysel yüzme (swimming) ve toplu göç (swarming) hareketleri değerlendirilmiştir. 'Swarming' hareket, katı veya yarı katı yüzeyler boyunca koordineli bir şekilde flagella aracılı çok hücreli yer değiştirme hareketidir. 'Swimming' hareket ise sıvı veya düşük viskoziteli koşullarda bakterilerin bireysel hareketidir (Henrichsen 1972, Mattick 2002).

'Swimming' hareketinin değerlendirilmesi çalışmasında, öncelikle *Salmonella* suşları 37°C'de bir gece boyunca LB agar besiyerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde agar yüzeyinden tek koloni alınarak % 0,3'lük LB agar yüzeyine inoküle edildi ve sırasıyla 28 °C'de 5 saat, 37 °C'de 4 saat olacak şekilde iki aşamalı inkübasyona tabi tutuldu. 'Swarming' hareketinin belirlenmesi için; suşlar benzer şekilde 37 °C'de bir gece boyunca LB agar besiyerinde inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde agar yüzeyinden tek koloni alınarak % 0,5 oranında glukoz ihtiva eden % 0,5'lik LB katı besiyerine inoküle edildi. Agar

plakaları 28 °C’de 5 saat ve 37 °C’de 4 saat boyunca inkübe edilerek değerlendirildi. Agar plakalarındaki inokülasyon bölgesinden ‘swimming’ ve ‘swarming’ bölgesinin kenarına kadar oluşan yarıçap ölçülerek değerlendirildi (Ahmad vd. 2016).

3.2.5 RNA izolasyonu için doğal tip ve *seqA* geni bakımından mutant suşların biyofilm formlarının hazırlanması

S. Typhimurium doğal suş ve onun *seqA* mutantının biyofilm formlarının oluşması amacı ile bir gecelik aktif kültürlerden 100’er µL alınarak 1150 µL steril LB^{-NaCl} içeren 35 mm’lik Petri plaklarına inoküle edildi. Maksimum biyofilm üretim seviyesine ulaşmak amacı ile hücreler 20 °C’ de 72 saat boyunca inkübe edildi (Uğur vd. 2018). *seqA* geni bakımından mutant olan suşların biyofilm üretim yeteneklerinin önemli ölçüde azaldığı için RNA izolasyonunda yeterli biyofilm kütlesi elde edebilmek amacı ile biyofilm denemesi çok tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için yeterli biyokütleyle ulaşmak amacı ile denemeler en az 2 paralel 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

Biyofilm denemelerinde 20 °C’ de 72 saat boyunca inkübasyon tamamlandıktan sonra, Petri plaklarında bulunan içerik, tutunan hücrelerin kopmamasına dikkat edilerek uzaklaştırıldı. Ardından, her bir plak zayıf tutunan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile soğutulmuş fosfatla tamponlanmış su (PBS) ile 3 defa yıkandı. RNA izolasyonu basamağı öncesinde biyofilm hücrelerinin toplanması amacı ile her bir Petri plağına 500 µL steril LB broth aktarıldı ve hücre kazıyıcı (cell scraper) yardımı ile Petri plaklarının tabanında ve çevresinde oluşan hücreler toplandı. Toplanan hücreler steril tüplere aktararak 4000xg’ (+4 °C’de) 10 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen hücre çökeltisi RNA izolasyonunda kullanıldı.

3.2.6 Biyofilm yapılarından total RNA izolasyonu

RNA ile çalışmak, RNaz içermeyen bir ortam sağlamak için özel önlemlerin alınmasını gerektirir. Eser miktarda RNaz bile in vitro transkripsiyon reaksiyonları, RNA saflaştırma protokolleri sırasında bozulma ve daha düşük verim sağlayabilir. Bu nedenle deneye başlamadan önce çalışma alanı ve kullanılan materyaller temas halinde RNazları yok eden

bir yüzey dekontaminasyon çözeltisi olan RNaseZap ile temizlendikten sonra deney aşamasına geçildi. Total RNA izolasyonu işlemi için Favorgen firmasının FavorPrep Total RNA Kiti kullanıldı. İzolasyon işlemi kitin içeriğindeki üretici firmanın önerdiği basamaklar izlenerek gerçekleştirildi. RNA çok çabuk degrade olan yapıya sahip olduğu için çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi ve santrifüj işlemleri +4 °C’de yapıldı. *S. Typhimurium* doğal tip suşunun ve *seqA* geni bakımından mutantlarının biyofilm formlarından RNA izolasyonu yapmak için bir önceki basamakta anlatıldığı şekilde elde edilen hücre çökeltisi 200 µL PBS ile süspanse edildi. Elde edilen süspansiyon 18000xg’de 2 dk santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası elde edilen pelletlere, 37 °C’ de 10 dk lizozim muamelesi uygulanarak hücre duvarı zayıflatıldı. Sonrasında RNA’nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması ve protein denatürasyonu sağlanması için kit içeriğinde bulunan FARB tamponundan 350 µL ve β-merkapttoetanol solüsyonundan 3,5 µL eklendi. Elde edilen süspansiyona 250 mg asitle yıkanmış 500~700 µm çapında cam boncuklar ilave edilerek 5 dk boyunca kuvvetli şekilde mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hücre kalıntılarının çökmesi için bu ortamlar 18000xg’de, 2 dakika, santrifüj işlemine tabi tutuldu. RNA içeren süpernatant farklı steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. RNA’nın çökmesi için santrifüj işlemi sonrasında elde edilen supernatant miktarı kadar % 70’lik RNaz içermeyen etanol eklendi ve karışım steril mikro santrifüj tüpünün içine yerleştirilen mikro kolon tüpünün membran filtre merkezine yavaşça eklendikten sonra 18000xg’de 1 dk santrifüj edildi. Süzüntü uzaklaştırıldıktan sonraki aşamada ise membranda olası DNA bulaşlarının uzaklaştırılması amacıyla oda sıcaklığında 15 dk süresince 6 µL RNaz içermeyen DNase I solüsyonu ile muamele edildi. Süre bitiminde mikro kolon tüpüne kit içeriğinde bulunan yıkama tamponundan (WB1) 500 µL eklenerek 18000xg’de 1 dk santrifüj edildi. Süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra mikro kolon tüpünün içerisine, kitin içerisinde bulunan yıkama tamponundan (WB2) 750 µL eklendi ve tekrar 1 dakika 18000xg’de santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Yıkama aşamalarından sonra mikro kolon tüpü yeni steril mikro santrifüj tüpünün içerisine yerleştirildi. Saf RNA izolatları eldesi için membrane filtrelere ~40-100 µL dH₂O eklenerek oda koşullarında 1 dk bekletildi. Süre bitiminde 18000xg’de 1 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. İzolasyon sonrasında saflaştırılan RNA örneklerinin saflık (260/280 oranı ve 260/230 oranı) ve konsantrasyon kontrolleri NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak kontrol edildikten sonra, yüksek kalitede toplam RNA izolatları -80 °C’de tutuldu (Charlebois vd. 2016).

3.2.7 Biyofilm yapılarından miRNA izolasyonu

miRNA izolasyonu işlemi için Favorgen firmasının FavorPrep miRNA İzolasyon Kiti kullanıldı. İzolasyon işlemi kitin içeriğindeki üretici firmanın önerdiği basamaklar izlenerek gerçekleştirildi. Deneye başlamadan önce çalışılan alan ve kullanılan materyaller RNaseZap ile temizlendi. Deney aşamasına geçmeden “Release Buffer” kullanılacağı adıma kadar 65 °C’ de inkübasyona bırakıldı. *S. Typhimurium* doğal tip ve *seqA* geni bakımından mutant suşların biyofilm formlarından miRNA izolasyonu yapmak için öncesinde biyofilm koşullarında geliştirilerek elde edilen hücre çökeltisi üzerine kit içeriğinde bulunan “Lysis Buffer” solüsyonundan 200 µL eklenerek kuvvetlice mekanik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde 20 µL 2M NaOAc (pH=5.2) eklendi. Sonrasında 180 µL doymuş fenol ve 40 µL kloroform solüsyonu eklenerek tekrar kuvvetlice karıştırıldı. 3 dk 12000 rpm’de santrifüj edildikten sonra üst faz temiz mikro santrifüj tüpüne alındı. Toplam solüsyonun % 35’i oranında ethanol eklendikten sonra iyice karıştırıldı. Elde edilen süspansiyon steril toplama tüpüne yerleştirilen RNA kolonuna aktarılıp 1 dk inkübe edildi. Süre bitiminde 30 saniye 12000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süzöntü üzerine % 70 oranında etanol eklendi. Toplama tüpündeki karışım yeni steril RNA kolonuna aktarılıp 1 dk inkübe edildi. Süre bitiminde 30 saniye 12000 rpm’de santrifüj edildi. Bu aşamada kolon zarına bağlanan miRNA saflaştırılmak için yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Kit içeriğinde bulunan “Wash Buffer” 200 µL RNA kolonu üzerinden eklendi ve 1 dk süresince inkübasyona bırakıldı. 1 dk 12000 rpm’de santrifüj edildikten sonra RNA kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Kolonun tam merkezinden 50 µL “Release Buffer” eklenerek 3 dk inkübasyona bırakıldı. miRNA’yı geri kazanmak için 12000 rpm’de 3 dk santrifüjlendi. Saflaştırılmış miRNA ihtiyaca göre standart etanol çökeltme prosedürü ile daha da konsantre edilip sonrasında daha küçük hacimli dH₂O veya TE tamponu (pH=8) içerisinde yeniden çözündürüldü. Kalitesini kontrol etmek için NanoDrop spektrofotometresi kullanıldı. Saflaştırılan miRNA izolatları -80 °C’de stoklandı.

3.2.8 rRNA uzaklaştırılması basamağı

Çalışma sonucunda saflaştırılan total RNA örnekleri RiboMinus Transcriptome Isolation Kit, Bacteria (Thermo Fisher Scientific, Cat No: K155004, USA) kullanılarak büyük rRNA (18S ve 23S) moleküllerinden arındırıldı. Kitin 5' biotin işaretli LNA (Locked Nucleic Acid) problemleri kullanması dolayısıyla bakteri total RNA örneklerinden büyük rRNA moleküllerini % 95-98 oranında uzaklaştırma sağlanır. Elde edilen RNA havuzu içerisinde, poly(A) seleksiyon yöntemi ile korunamayan, poly(A) kuyruğu içermeyen RNA'lar, küçük tRNA'lar, siRNA'lar, snRNA'lar, miRNA'lar, fragmente mRNA'lar diğer düzenleyici (regülatör) RNA'ların da elde edilebilmesi mümkündür. rRNA uzaklaştırma işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin kalite ölçümleri QSep 100 Fragment Analiz Sistemi (BioOptic Inc., Taiwan) ve RNA kartuşu ile kullanılarak kontrol edildi. Analiz sonucunda istenilen derecede rRNA'dan arındırılmayan örnekler için bu basamak tekrar edildi.

3.2.9 cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve dizilenmesi

cDNA kütüphaneleri hazırlamak için NEXTflex Rapid Directional qRNA-Seq Kiti kullanıldı. Üretici firmanın protokolü takip edilerek elde edilen çift zincir cDNA'lar Agencourt AMPure XP Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific, USA) ile saflaştırıldı. Saflaştırma işleminin ardından kit içerisinde yer alan NEXTflex Adenylation Mix sayesinde cDNA dizilerinin son uçlarının tamiri ve adenilasyon basamakları tamamlanarak NEXTflex Ligation Mix ve NEXTflex Molecular Index Adaptors ile adaptör ligasyonu ve sonrasında da NEXTflex Resuspension Buffer ile manyetik bead temizleme işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan örnekler yine kit içinde yer alan NEXTflex Uracil DNA Glycosylase, NEXTflex qRNA-Seq Universal Forward Primer, NEXTflex PZR Mastermix ve NEXTflex qRNA-Seq Barcoded Primer reaktifleri kullanılarak, önerilen PZR protokolü doğrultusunda amplifiye edildi. PZR amplifikasyonu sonrasında elde edilen kütüphane biyoanalizör cihazı kullanılarak fragman dağılımı açısından değerlendirildi, uygun olmayan örnekler çalışmaya dahil edilmeyerek cDNA kütüphanesi oluşturma basamağı tekrarlandı. rRNA'ları uzaklaştırılmış RNA örnekleri kit içerisinde yer alan NEXTflex RNA Fragmentation Buffer ile fragmente edildi. Elde edilen RNA fragmanları cDNA kütüphanesi hazırlığı için kalıp olarak kullanıldı ve kit içerisinde yer alan NEXTflex First Strand Synthesis Primer,

NEXTflex Directional First Strand Synthesis Buffer Mix, NEXTflex Rapid Reverse Transcriptase C reaktifleri kullanılarak birinci cDNA zinciri oluşturuldu. Sonrasında kit içerisinde yer alan NEXTflex Directional Second Strand Synthesis Mix kullanılarak ikinci cDNA dizisi de oluşturuldu.

PZR amplifikasyonundan sonra gerekli kalite kontrolleri yapılan örnekler alt yapımızda uygun dizileme sistemi olmadığından yurt dışına gönderilerek HighSeq (Illumina, USA) sistemlerinde dizileme işlemi hizmet alımı ile yaptırıldı.

3.2.10 Biyoinformatik analiz

HighSeq sisteminden elde edilen verilerin öncelikle kalite kontrolleri yapıldı. Bu basamakta düşük kalite skoruna sahip dizi okumaları, adaptör dizileri, adaptör-adaptör ligasyonu sonucu oluşan dizi okumaları ve bilinmeyen N baz okumalarına (okumaların % 5'inden fazla ise) ait diziler ham veriden çıkartıldı. Daha sonra biyoinformatik analizler hizmet alımı ile gerçekleştirildi ve elde edilen filtrelenmiş kaliteli dizi okumaları evrensel FASTQ formatında saklandı.

İleri transkriptom analizleri sonucunda farklılıkların belirlenmesi amacıyla doğal tip ve seqA geni bakımından mutant suşların olgun biyofilm hücrelerinin (sekans başına iki biyolojik kopya) diferansiyel ekspresyon genleri (DEG'ler) tanımlamak için bu genlerin karşılaştırılması yapılarak gen ifade düzeyleri hesaplandı ve biyofilm oluşumunda yer alan genlerde dahil olmak üzere çeşitli virülans özelliklerde ve metabolik süreçte görev alan genlerde anlamlı faklanmalar belirlendi.

3.2.11 Farklı şekilde ifade edilen genlerin GO ve KEGG zenginleştirme analizi

DEG'ler, tanımlanan genlerin biyolojik işlevlerinin ve önemli ölçüde zenginleştirilmiş metabolik yolların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmak için Gene Ontology (GO) ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) zenginleştirme analizleri için kullanıldı. Bu çalışmada, hem GO terimleri hem de ayarlanmış P değeri <0.05 olan KEGG yolları DEG'ler açısından önemli ölçüde zenginleştirilmiş kabul edildi.

3.2.12 Isı haritası

Farklı genlerin ekspresyon modellerini belirlemek için bir ısı haritası ve hiyerarşik kümeleme kullanıldı. Benzer ekspresyon modellerine sahip genler, benzer işlevlere sahip olabilir veya aynı metabolik süreç veya hücresel yolda yer alabilir. Bu nedenle, aynı veya benzer ifade modellerine sahip genler, bilinmeyen genlerin işlevini veya bilinen genlerin yeni işlevlerini tahmin etmek için sınıflar halinde kümelendi.

İki grupta farklı şekilde ifade edilen mRNA'ların ısı haritasında, kırmızı, daha düşük bir mRNA ifade seviyesini ve yeşil, daha yüksek bir mRNA ifade seviyesini ifade etmektedir.

3.2.13 İstatistikî analizler

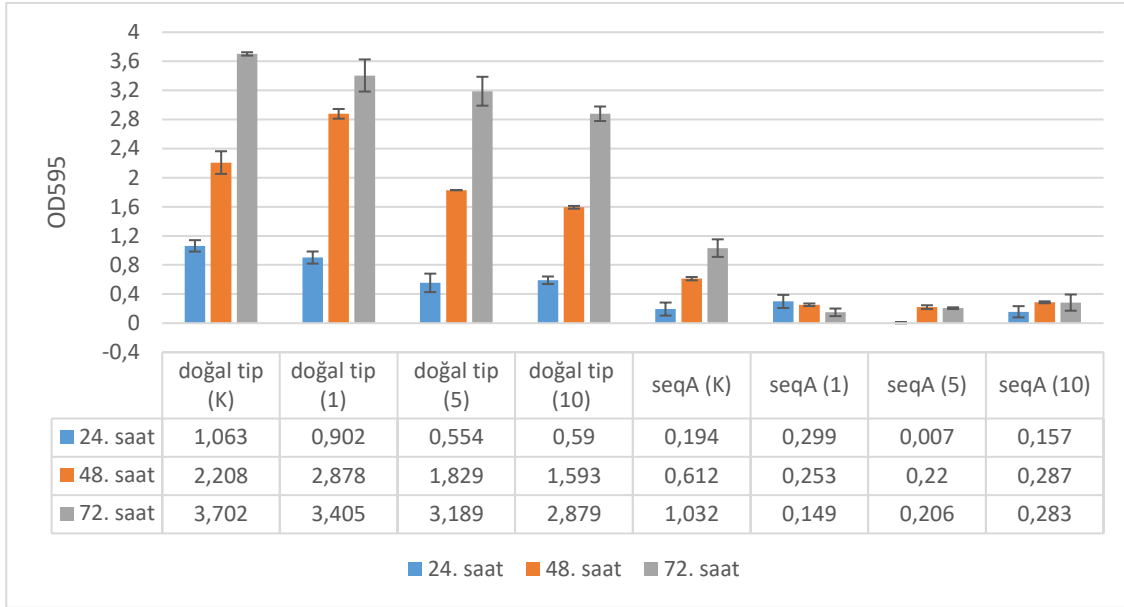
Çalışmada yapılan testlerinin ortalamaları arasındaki karşılaştırmalar, Minitab® istatistiksel yazılımında (sürüm 18.1); ikiden fazla ortalama için *post hoc* Tukey testi ile, iki ortalama için Student's t-testi ve iki yollu varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Nisin'in, Biyoenzimlerin ve Biyosüpfaktanların Polisistren Yüzeyde Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

4.1.1 Nisin

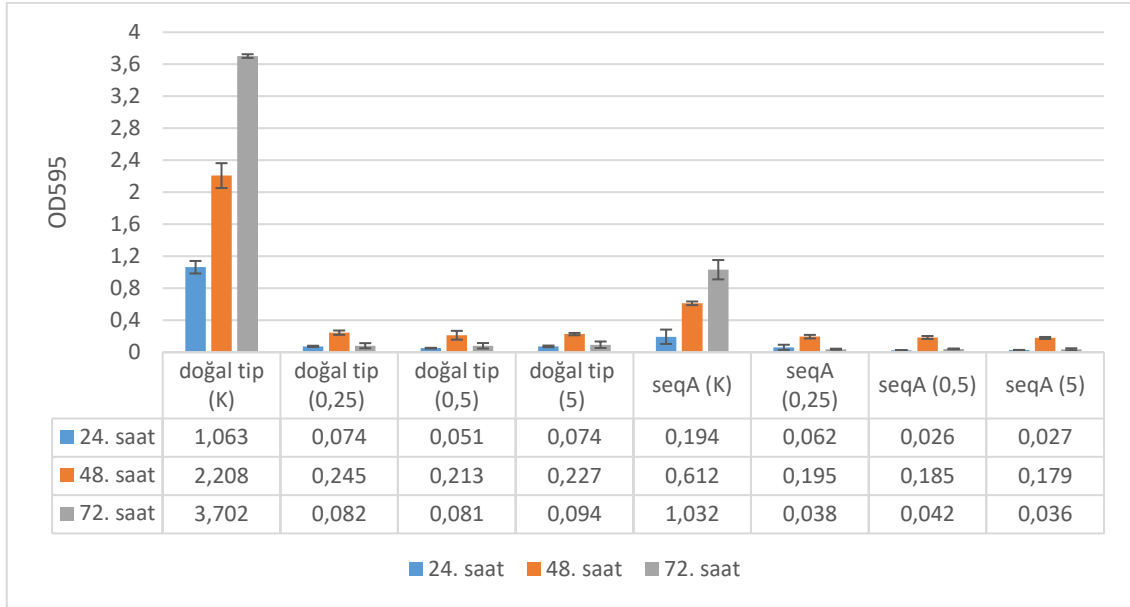
Nisin'in biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla suşların, 1 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında nisin varlığında biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi; 1 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında nisin içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 15,15, % 47,89 ve % 44,5 oranında, 48. saatte 1 mg/mL konsantrasyonunda nisin içeren ortamda % 30,34 oranında artış gösterdi. 48. saatte 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında nisin varlığında biyofilm üretimi sırasıyla % 17,17, % 27,86 oranında düştü. Doğal suшта biyofilm üretimi kapasitesi 72. saatte sırasıyla % 8,03, % 13,86, % 22,24 oranlarında düşüş gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde; 24. saatte 1 mg/mL konsantrasyonunda nisin varlığında; % 54,12 oranında artış, 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında nisin varlığında ise sırasıyla % 96,4, % 19,08 oranlarında azalma tespit edildi. 48. saatte bu oranlarda sırasıyla % 58,67, % 64,06 ve % 53,11 oranlarında, 72. saatte ise sırasıyla % 88,72, % 80,04 ve % 72,58 oranlarında azalma saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Nisin'in (1 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.2 Siprofloksasin (CIP)

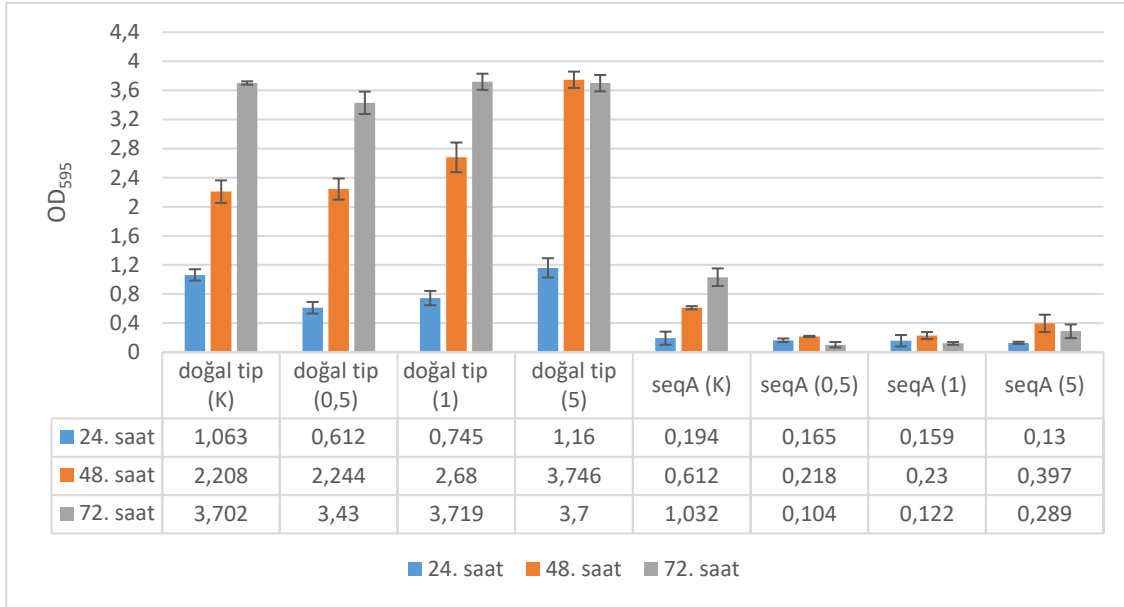
S. Typhimurium 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL ve 5 µg/mL konsantrasyonlarında siprofloksasin içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 93,04, % 95,21 ve % 93,04 oranında, 48. saatte sırasıyla % 88,91, % 90,36 ve % 89,8 oranında, 72. saatte sırasıyla % 97,79, % 97,82 ve % 97,47 oranında azalma gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL ve 5 µg/mL konsantrasyonlarında siprofloksasin içeren ortamlarda 24. saatte sırasıyla % 68,05, % 86,6 ve % 86,09 oranında, 48. saatte sırasıyla % 68,14, % 69,78 ve % 70,76 oranlarında, 72. saatte ise sırasıyla % 96,32, % 95,94 ve % 96,52 oranında azalma tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Siproflaksasin'in (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.3 Alfa amilaz

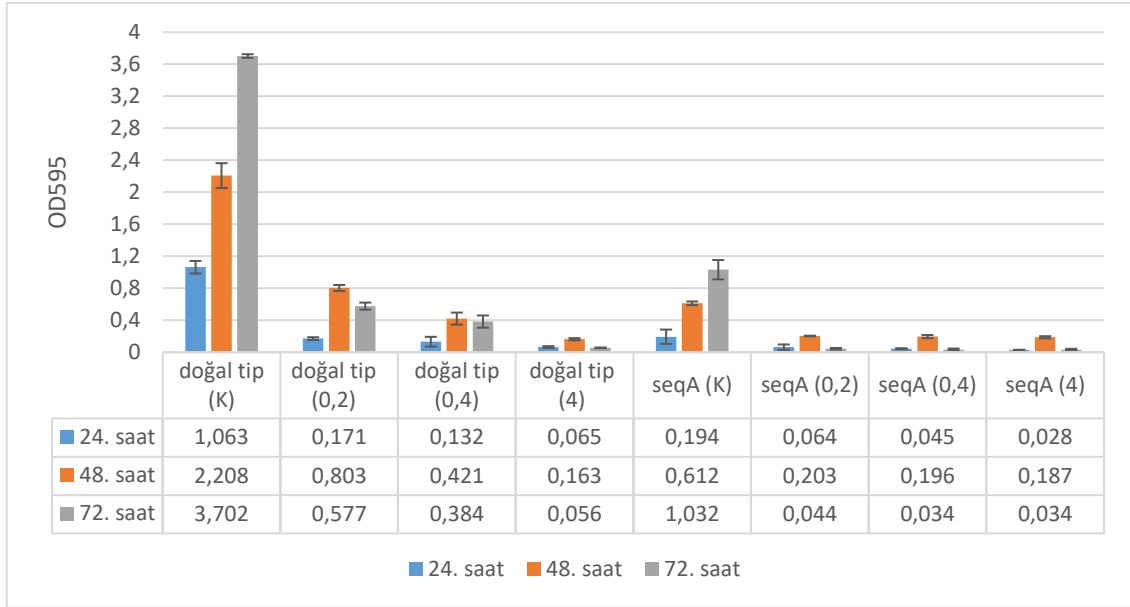
Alfa amilaz enziminin biyofilm oluşumu üzerine etkisini incelemek amacıyla 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarında α -amilaz çözeltisi, biyofilm üretme ortamlarına ilave edildi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesinde; 24. saatte, 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında α -amilaz içeren ortamda sırasıyla % 42,43, % 29,92 oranında azalma gözlemlenirken, 5 mg/mL konsantrasyonunda α -amilaz içeren ortamda % 9,12 oranında artış belirlendi. 48. saatte 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonunda α -amilaz varlığında sırasıyla % 1,63, % 21,37 ve % 69,67 oranında artış tespit edildi. 72. saatte 0,5 mg/mL konsantrasyonunda α -amilaz içeren ortamda biyofilm üretimi % 7,35 oranında azalma gösterirken, 1 mg/mL, 5 mg/mL konsantrasyonlarında anlamlı bir farklanma saptanmadı. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesi; 24. saatte 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL konsantrasyonlarında α -amilaz varlığında sırasıyla % 14,95, % 18,05 ve % 32,99 oranlarında azalma gösterdi. 48. saatte sırasıyla % 64,38, % 62,42 ve % 35,14 oranlarında, 72. saatte sırasıyla % 89,93, % 88,18 ve % 72 oranlarında azalma tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Alfa amilaz'ın (0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 5 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.4 Proteinaz-K

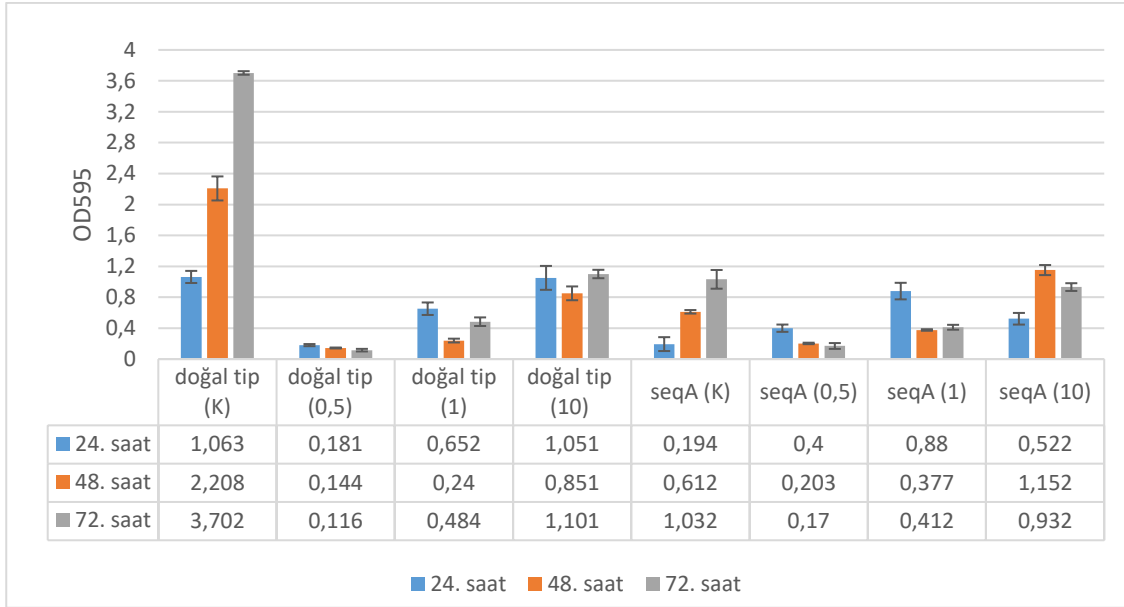
Proteinaz-K'nın biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarında proteinaz-K varlığında biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarında proteinaz-K içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 83,92, % 87,59 ve % 93,89 oranında, 48. saatte sırasıyla % 63,64, % 80,94 ve % 92,62 oranında ve 72. saatte sırasıyla % 84,42, % 89,63 ve % 98,49 oranında azalma gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL ve 4 mg/mL konsantrasyonlarında proteinaz-K içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 67,02, % 76,81 ve % 85,57 oranında, 48. saatte sırasıyla % 68,84, % 67,98 ve % 69,45 oranında, 72. saatte sırasıyla % 95,74, % 96,71 ve % 96,71 oranında azalma tanımlandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Proteinaz-K'nın (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL ve 4 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve *seqA* mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.5 CTAB

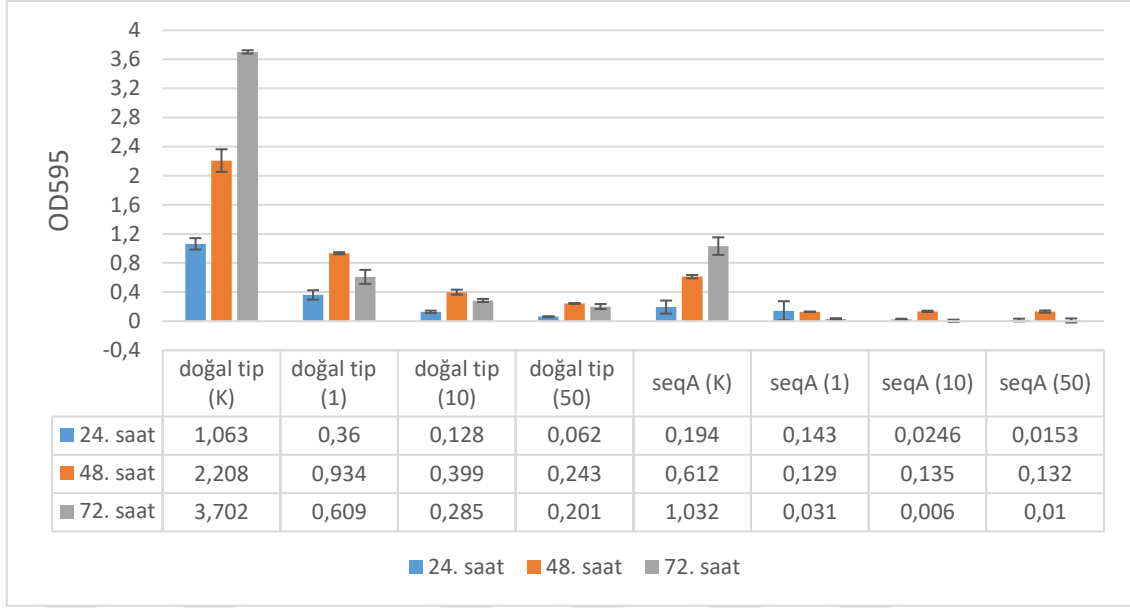
CTAB'ın biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında CTAB varlığında, suşların biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında CTAB içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 82,98, % 38,67 ve % 1,2 oranında, 48. saatte sırasıyla % 93,48, % 89,14 ve % 61,46 oranında, 72. saatte sırasıyla % 96,87, % 86,93 ve % 70,3 oranında azalma gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında CTAB içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 106,18, % 353 ve % 169,07 oranında artış belirlendi. 48. saatte 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında CTAB içeren ortamda sırasıyla % 68,84 ve % 38,4 oranında inhibisyon sağlanırken, 10 mg/mL konsantrasyonlarında CTAB içeren ortamda % 88,23 oranında artış saptandı. 72. saatte 0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda sırasıyla % 83,53, % 60,08 ve % 9,69 oranında azalma tespit edildi (Şekil 4.5)



Şekil 4.5 CTAB'ın (0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.6 EDTA

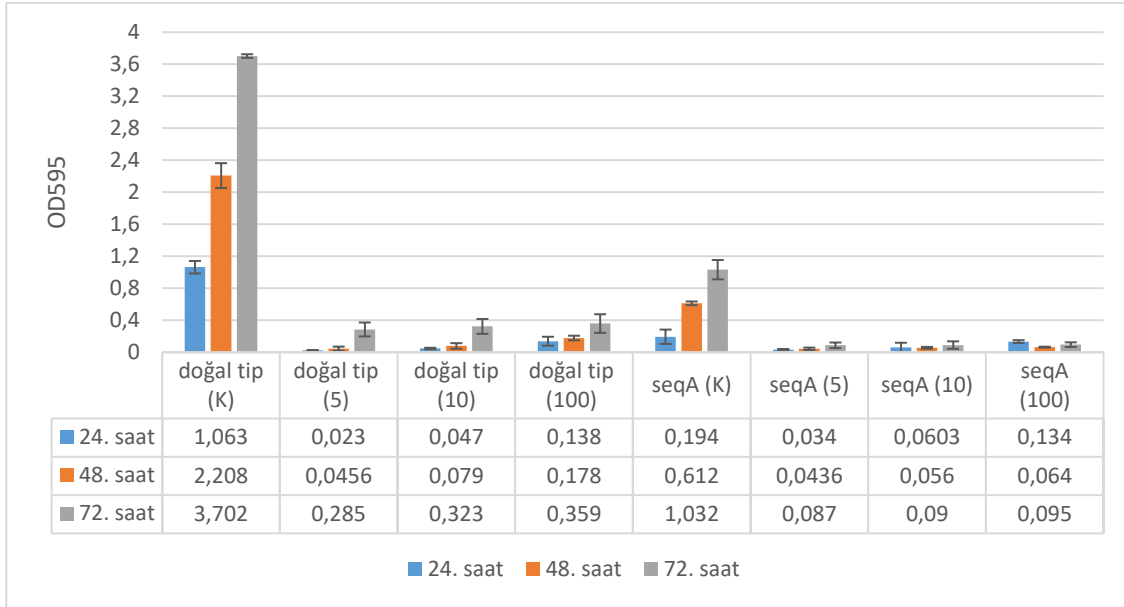
EDTA'nın biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla 1mM, 10mM ve 50mM konsantrasyonlarında EDTA varlığında, biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typhimurium* 1402 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 1mM, 10mM ve 50mM konsantrasyonlarında EDTA içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 66,14, % 87,96 ve % 94,17 oranında, 48. saatte sırasıyla % 57,7, % 81,93 ve % 89 oranında, 72. saatte sırasıyla % 83,55, % 92,31 ve % 94,58 oranında azalma gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde; 1mM, 10mM ve 50mM konsantrasyonlarında EDTA içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 26,29, % 87,32 ve % 92,12 oranında, 48. saatte sırasıyla % 78,93, % 77,95 ve % 78,44 oranında, 72. saatte sırasıyla % 97, % 99,42 ve % 99,04 oranında azalma tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 EDTA'nın (1mM, 10mM ve 50mM) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.7 SDS

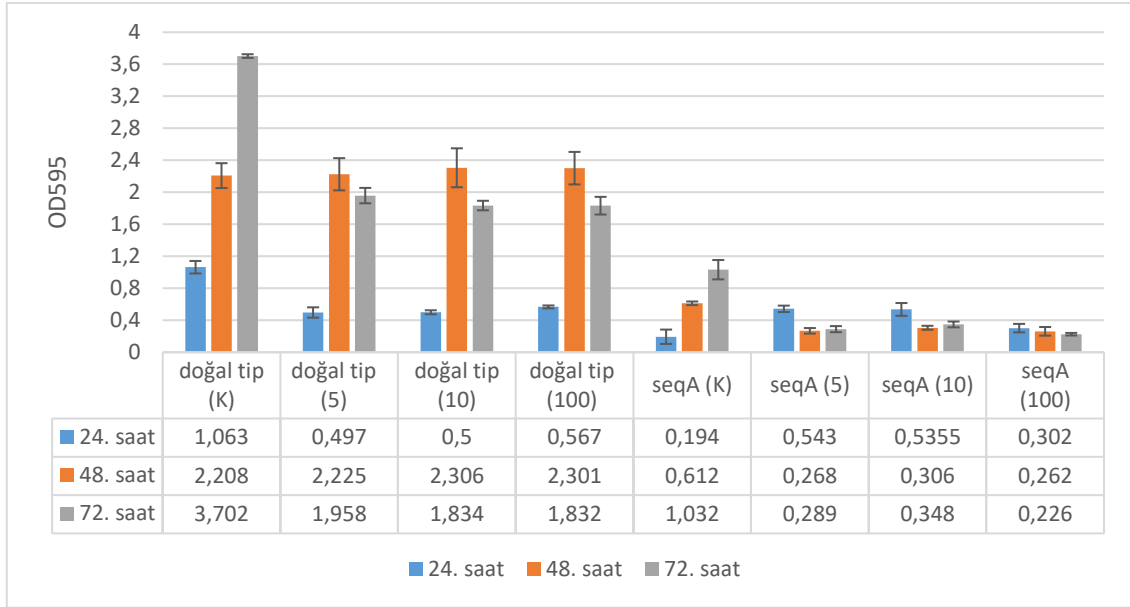
SDS'in biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında SDS varlığında, denemelerde kullanılan suşların biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında SDS içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 97,84, % 95,58 ve % 87,02 oranında, 48. saatte sırasıyla % 97,94, % 96,5 ve % 91,94 oranında, 72. saatte sırasıyla % 92,31, % 91,78 ve % 90,31 oranında azalma gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında SDS içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 82,48, % 68,92 ve % 30,93 oranında, 48. saatte sırasıyla % 92,88, % 90,88 ve % 89,55 oranında, 72. saatte sırasıyla % 91,57, % 91,28 ve % 90,8 oranında azalma belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 SDS'in 5 mg/mL (10 mg/mL ve 100 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.8 Tween-80

Tween-80'in biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında Tween-80 varlığında, suşların biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında Tween-80 içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 53,25, % 52,97 ve % 46,67 oranında azalma, 48. saatte sırasıyla % 0,76, % 4,43 ve % 4,21 oranında artma, 72. saatte sırasıyla % 47,21, % 50,46 ve % 50,52 oranında azalma gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında Tween-80 içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 179,89, % 176,03 ve % 55,67 oranında artış tespit edildi. Aynı konsantrasyonlarda 48. saatte biyofilm düzeylerinde sırasıyla % 56,21, % 50 ve % 57,19 ve 72. saatte sırasıyla % 72, % 66,28 ve % 78,21 oranında azalma belirlendi (Şekil 4.8).



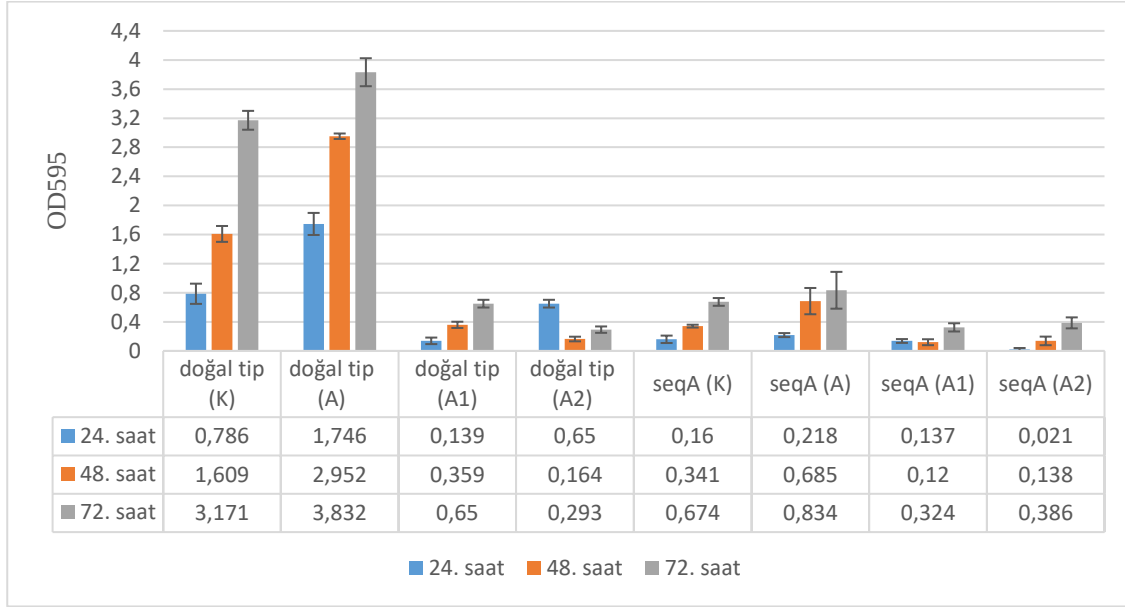
Şekil 4.8 Tween-80'ın (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.9 Nisin ve diğer antimikrobiyal ajanlarla yürütülen kombinasyon denemeleri

Bu amaçla, tek başına antibiyofilm aktivitesi yüksek bulunan antimikrobiyal ajanların nisin ile farklı konsantrasyonlarda kombinasyonları oluşturularak kullanıldı (Çizelge 3.3).

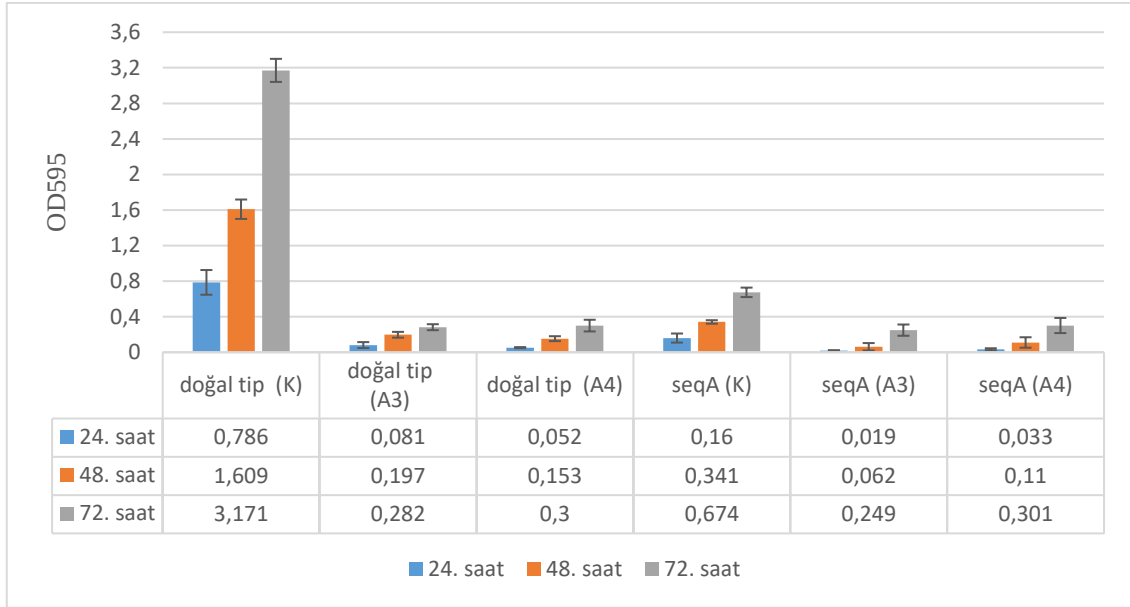
10 mg/mL nisinin 1 mM EDTA ile kombinasyonu (A kombinasyonu) *S. Typhimurium* doğal tip ve *seqA* mutantlarında biyofilm üretimini tetiklemiştir. A kombinasyonunda, *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 122,13, % 83,46 ve % 20,84 oranında artış gösterdi. Aynı şekilde, *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun A kombinasyonunda, biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 36,25, % 100,87 ve % 23,73 oranında yükseldi. 10 mg/mL nisinin 10 mM EDTA (A1 kombinasyonu) ve 50 mM EDTA (A2 kombinasyonu) ile kombinasyonu ile muamele edilen biyofilm formları üzerinde ise etkili bir şekilde inhibisyon sağlandı. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi A1 kombinasyonunda, biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 82,32, % 77,69 ve % 79,51 oranında, A2 kombinasyonunda, biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 17,31, % 89,81 ve % 90,77 oranında düşme gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde A1 kombinasyonunda, biyofilm

üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 14,38, % 64,81 ve % 51,93 oranında, A2 kombinasyonunda, biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 86,88, % 59,54 ve % 94,73 oranında azalma tespit edildi (Şekil 4.9).



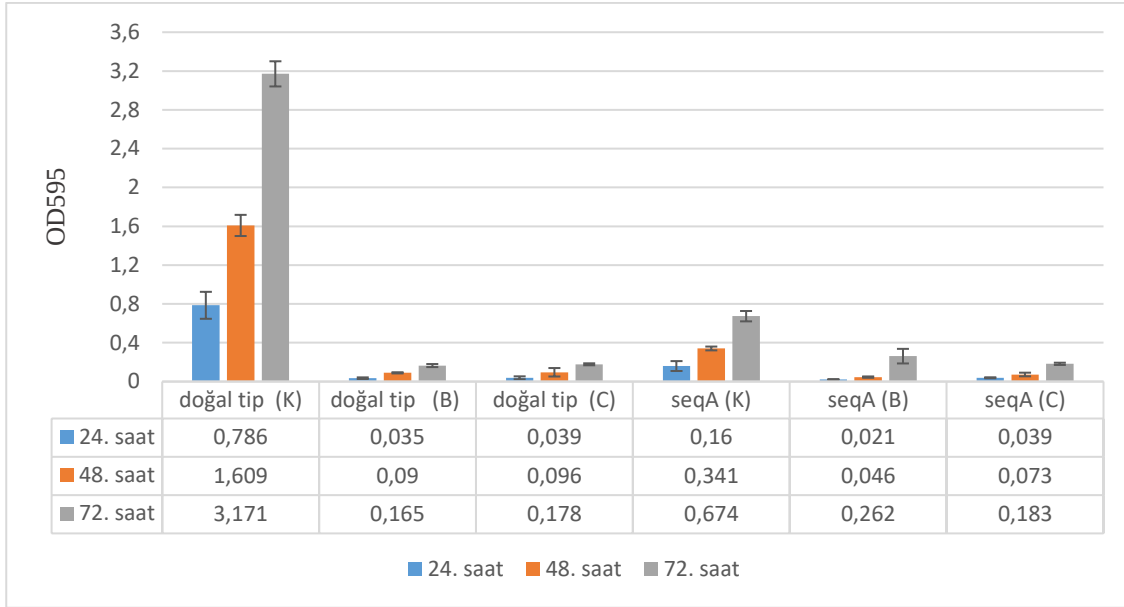
Şekil 4.9 A, A1 ve A2 kombinasyonlarında hazırlanan preparatların (Çizelge 3.3) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

A3 kombinasyonunda (1 mg/mL nisin + 50 mM EDTA), *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 89,7, % 87,76 ve % 91,11 oranında azaldı. Aynı şekilde, *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun A3 kombinasyonunda, biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 88,13, % 81,82 ve % 63,06 oranında düşme gösterdi. A4 kombinasyonunda (5 mg/mL Nisin + 50 mM EDTA), *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 93,99, % 90,5 ve % 90,54 oranında inhibe oldu. Aynı şekilde, *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun A4 kombinasyonunda, biyofilm üretim kapasitesinde 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 79,38, % 67,75 ve % 55,35 oranında düşüş tespit edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 A3 ve A4 kombinasyonlarında (Çizelge 3.3) hazırlanan preparatların *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

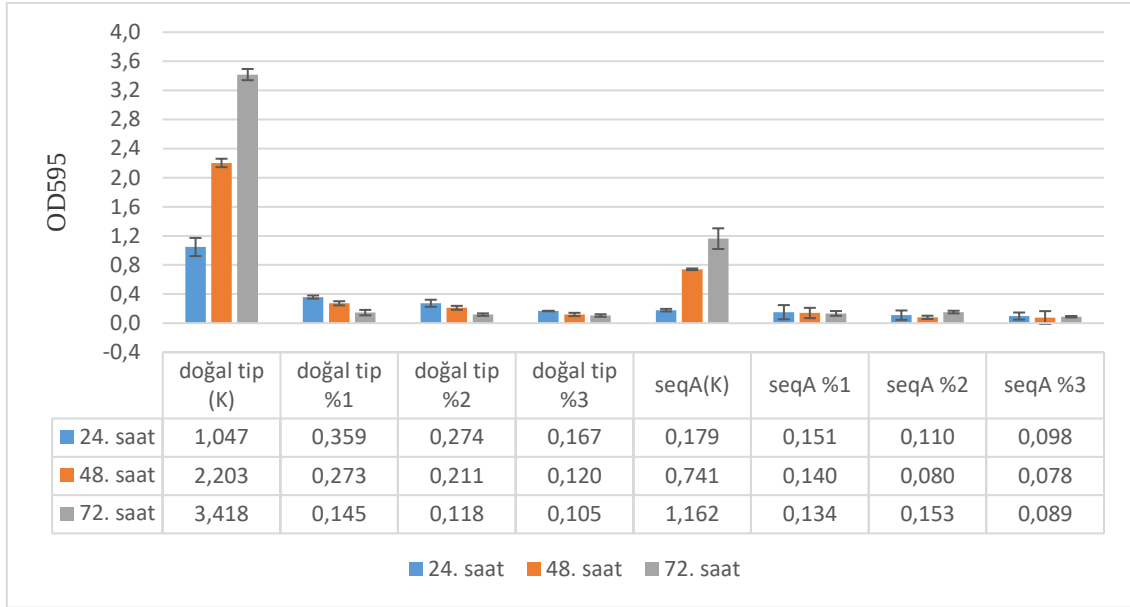
10 mg/mL Nisin + 5 µg/mL CİP (B kombinasyonu) ve 1 mg/mL Nisin + 10 mM EDTA + 5 µg/mL CİP (C kombinasyonu) konsantrasyonlarında hazırlanan ikili ve üçlü kombinasyonların *Salmonella* suşları üzerindeki inhibisyon etkinliği araştırıldığında; B kombinasyonunda, *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesinin 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 95,55, % 94,41 ve % 94,8 oranında azaldığı belirlendi. Bu kombinasyonda *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla, % 86,88, % 86,52 ve % 61,2 oranında azaldı. C kombinasyonunda, *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesinde, 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 95,04, % 94,04 ve % 94,39 oranında azalma tespit edildi. C kombinasyonu denenilen *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutantı biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla % 75,63, % 78,6 ve % 72,85 oranında inhibe oldu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 B ve C kombinasyonlarında (Çizelge 3.3) hazırlanan preparatların *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

4.2 Glukozun Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Bu denemelerde, *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşu ile onun *seqA* geni bakımından mutant suşunun % 1, % 2 ve % 3 oranlarında glukoz varlığında biyofilm üretim kapasiteleri belirlendi. Besi ortamında glukoz bulunmayan pozitif kontrollere (doğal tip ve onun *seqA* mutantı) kıyasla, glukozlu ortamda biyofilm oluşumu istatistiki açıdan anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) düşme gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesinde, % 1, % 2 ve % 3 oranında glukoz varlığında 24. saatte sırasıyla % 65,65, % 73,78, % 84,02 oranında, 48. saatte sırasıyla % 87,61, % 90,43 ve % 94,56 oranında, 72. saatte sırasıyla % 95,76, % 96,55 ve % 96,93 oranında düşüş tespit edildi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesinde ise, % 1, % 2 ve % 3 oranında glukoz varlığında 24. saatte sırasıyla % 15,65, % 38,55 ve % 45,26 oranında, 48. saatte sırasıyla % 81,11, % 89,21, % 89,48 oranında ve 72. saatte sırasıyla % 88,47, % 86,84 ve % 92,35 oranında düşüş saptandı (Şekil 4.12).

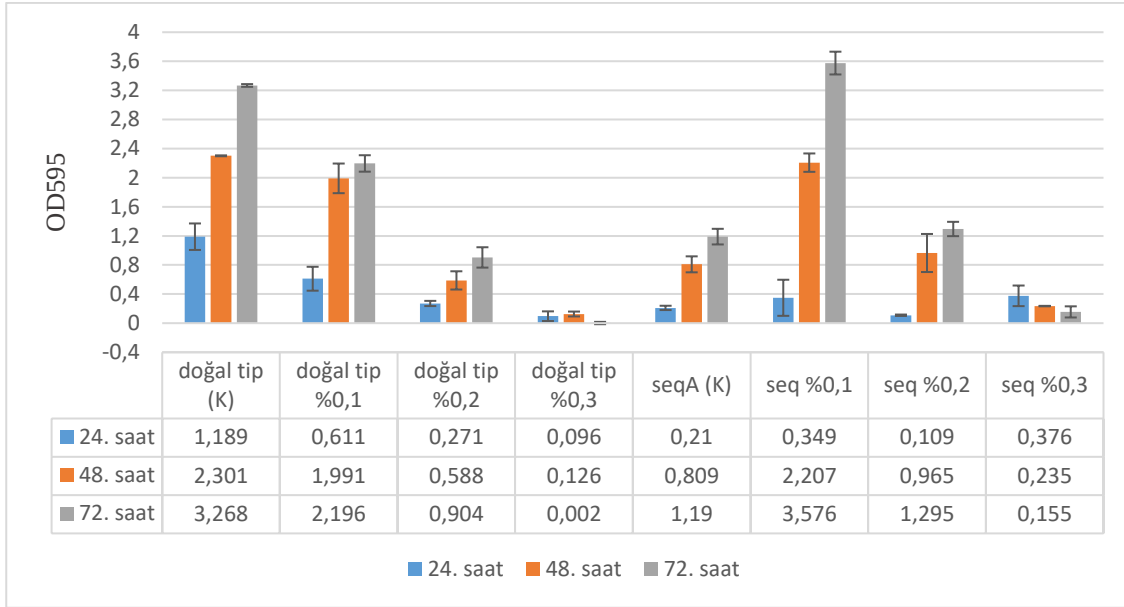


Şekil 4.12 Glukozun (% 1, % 2 ve % 3) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

4.3 Safra Tuzlarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

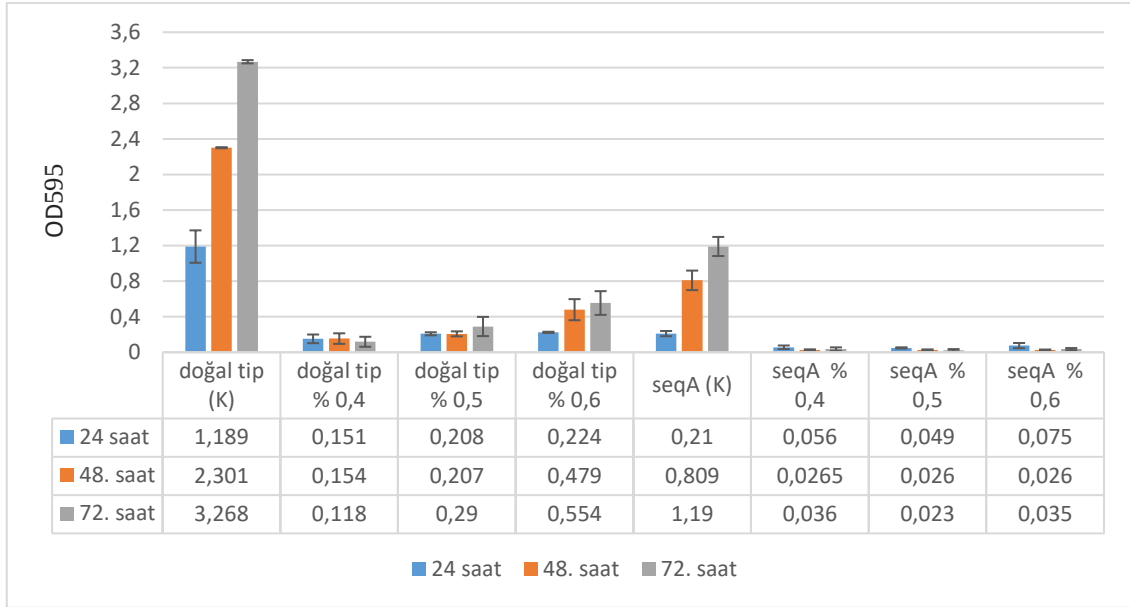
Bu çalışmada, *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* geni bakımından mutant suşlarında. % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5, % 0,6, % 0,7, % 0,8, % 0,9 oranlarında safra tuzu varlığında biyofilm üretim kapasiteleri tanımlandı.

S. Typhimurium 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi % 0,1, % 0,2 ve % 0,3 oranlarında safra tuzu içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 48,62, % 77,21 ve % 91,93 oranında, 48. saatte sırasıyla % 13,48, % 74,45 ve % 94,53 oranında, 72. saatte sırasıyla % 32,81, % 72,34 ve % 99,94 oranında düşüş gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun biyofilm üretim kapasitesi 24. saatte % 0,1 oranında safra tuzu varlığında % 66,19 oranında artış gösterdi. % 0,2 oranında safra tuzu varlığında biyofilm üretiminde % 48,1 oranında azalma gözlenirken, % 0,3 oranında safra tuzu varlığında % 79,04 oranında artış belirlendi. 48. saatte biyofilm üretiminde % 0,1 ve % 0,2 oranında safra tuzu varlığında sırasıyla % 172,8 ve % 19,28 oranında artış, % 0,3 oranında safra tuzu varlığında, % 70,96 oranında azalma tespit edildi. 72. saatte % 0,1 ve % 0,2 oranında safra tuzu varlığında, sırasıyla % 200,5 ve % 88,2 artış, % 0,3 oranında safra tuzu varlığında % 86,98 oranında azalma saptandı (Şekil 4.13).



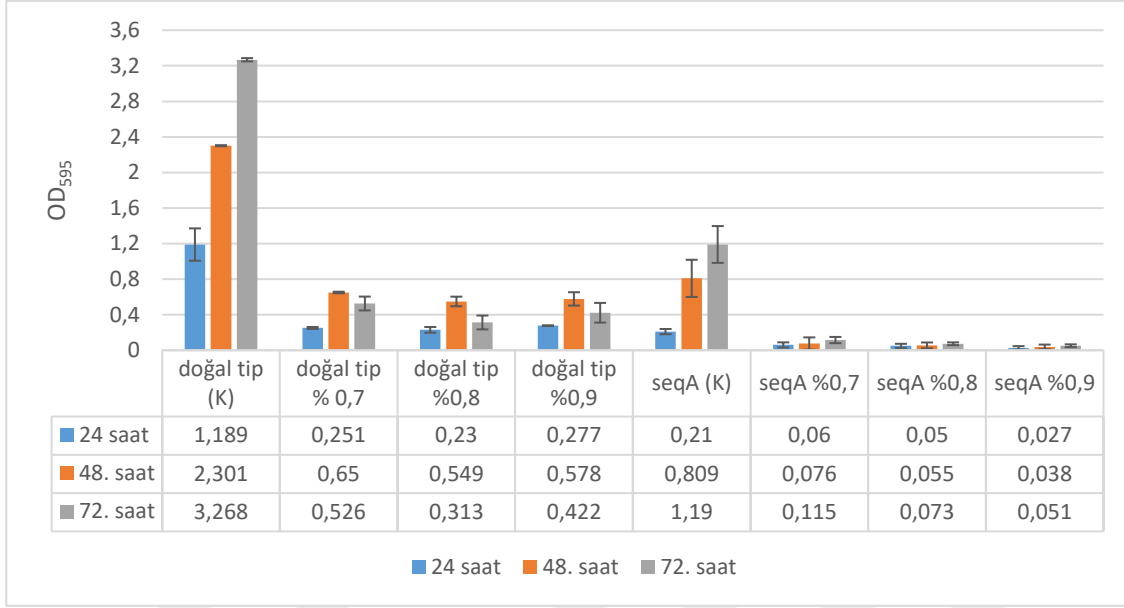
Şekil 4.13 Safra tuzlarının (% 0,1, % 0,2 ve % 0,3) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

S. Typhimurium 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi % 0,4, % 0,5 ve % 0,6 oranlarında safra tuzu içeren ortamlarda, 24. saatte sırasıyla % 87,31, % 82,51 ve % 81,17 oranında, 48. saatte sırasıyla % 93,31, % 91,01 ve % 79,19 oranında, 72. saatte sırasıyla % 96,39, % 91,13 ve % 83,05 oranında düşüş gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun % 0,4, % 0,5 ve % 0,6 oranlarında safra tuzu içeren ortamda biyofilm üretim kapasitesinde 24. saatte sırasıyla % 73,34, % 76,67 ve % 64,29 oranında, 48. saatte sırasıyla % 96,73, % 96,79 ve % 96,79 oranında, 72. saatte sırasıyla % 96,98, % 98,07 ve % 97,06 oranında düşüş saptandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Safra tuzlarının (% 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

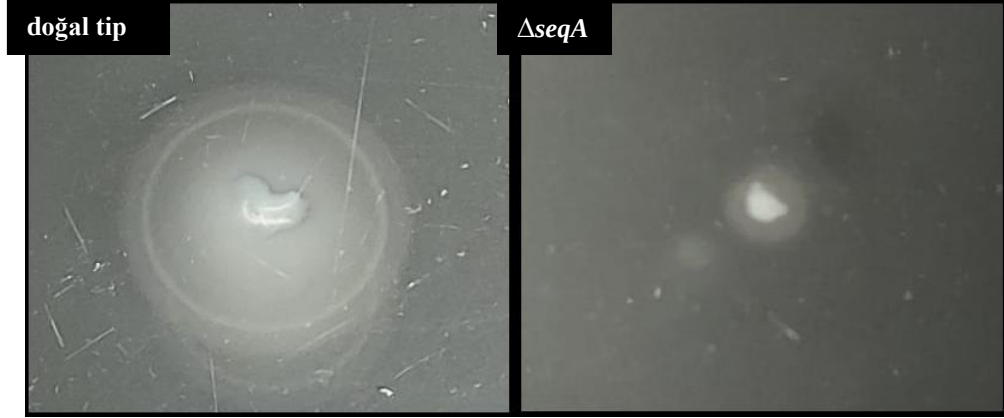
S. Typhimurium 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi % 0,7, % 0,8 ve % 0,9 oranlarında safra tuzu içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 78,89, % 80,66 ve % 76,71 oranında, 48. saatte sırasıyla % 71,76, % 76,15 ve % 74,89 oranında, 72. saatte sırasıyla % 83,91, % 90,43 ve % 87,09 oranında düşüş gösterdi. *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşunun % 0,7, % 0,8 ve % 0,9 oranlarında safra tuzu içeren ortamda biyofilm üretim kapasitesinde ise, 24. saatte sırasıyla % 71,43, % 76,2 ve % 87,15 oranında, 48. saatte sırasıyla % 90,61, % 93,21 ve % 95,31 oranında, 72. saatte sırasıyla % 90,34, % 93,87 ve % 95,72 oranında düşme tespit edildi (Şekil 4.15).



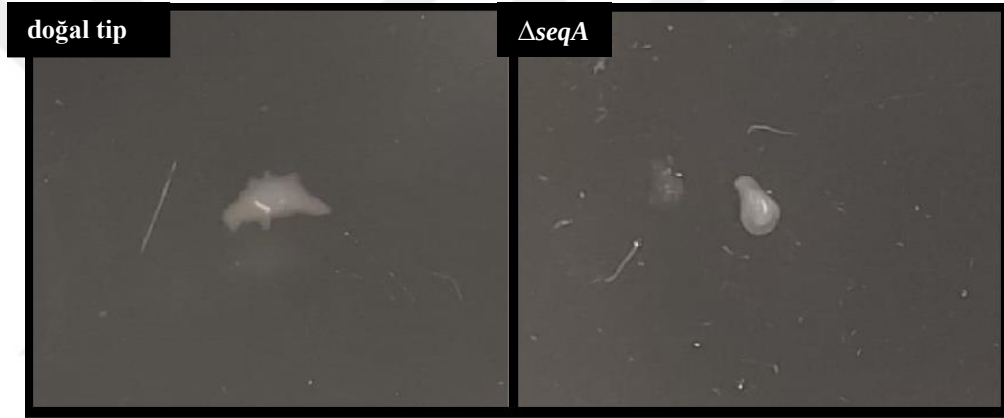
Şekil 4.15 Safra tuzlarının (% 0,7, % 0,8 ve % 0,9) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve onun *seqA* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

4.4 Bakteriyel ‘Swimming’ ve ‘Swarming’ Hareketlerinin Belirlenmesi

Flagellaya bağlı ‘Swarming’ ve ‘Swimming’ hareketliliğin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneme, agar plakalarındaki inokülasyon bölgesinden yüzme (swimming) ve toplu göç (swarming) bölgesinin kenarına kadar oluşan yarıçapı ölçülerek değerlendirildi. *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunda gözlemlenen yüzme (swimming) hareketi, onun *seqA* geni bakımından mutant suşunda % 85 oranında azaldı. Aynı şekilde, toplu göç (swarming) hareketi doğal suşa oranla, mutant suşta yaklaşık % 50 oranında azaldı. Elde edilen sonuçlara göre, *seqA* mutant suşunun, doğal tip suşuna kıyasla ‘swimming’ ve ‘swarming’ hareketlerinin kısıtlandığı belirlendi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



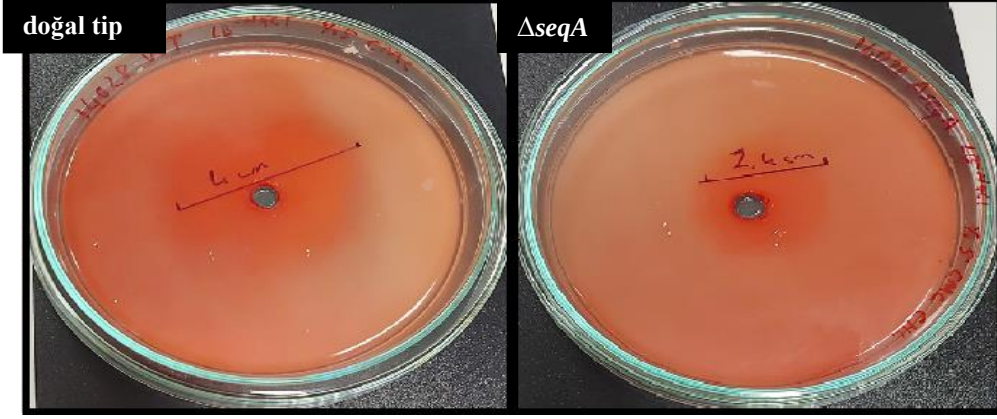
Şekil 4.16 *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşu ve onun *seqA* geni mutant suşunun "swimming" hareketi



Şekil 4.17 *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutant suşunun "swarming" hareketi

4.5 Selüloz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

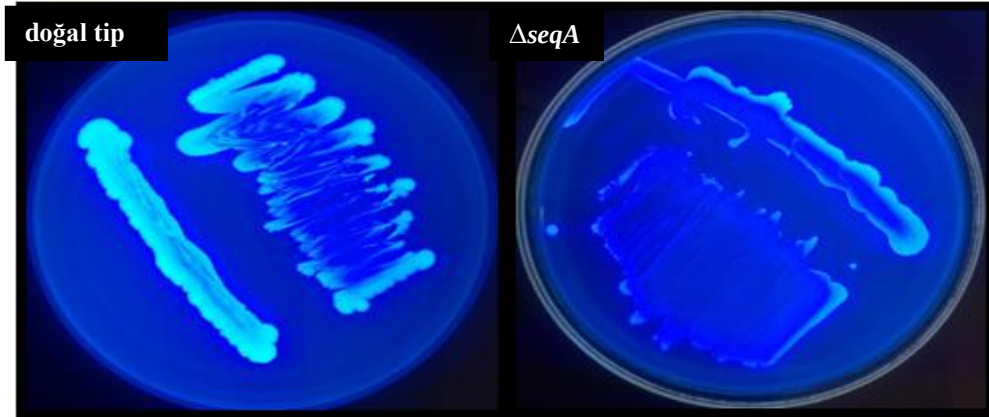
S. Typhimurium 14028 doğal suşunda 4 cm çapında gözlemlenen selüloz aktivitesinden kaynaklanan zon, *seqA* geni mutantında 2,4 cm çapında tespit edildi (Şekil 4.18)



Şekil 4.18 *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu, ve *seqA* mutantının selüloz aktivite zonları

4.6 Kalkoflor Bağlanma Uygulaması

Salmonella suşlarının selüloz üretiminin belirlenmesi amacı ile kalkoflor denemesi gerçekleştirildi. 366 nm UV ışık altında incelenen Petri plaklarında üreyen doğal tip *S. Typhimurium* doğal suşu selüloz üretiminden dolayı kuvvetli florasan ışıma verirken, *seqA* mutant suşlarında bu ışımda, doğal tip suşa kıyasla çok yüksek oranda düşüş belirendi (Şekil 4.19).



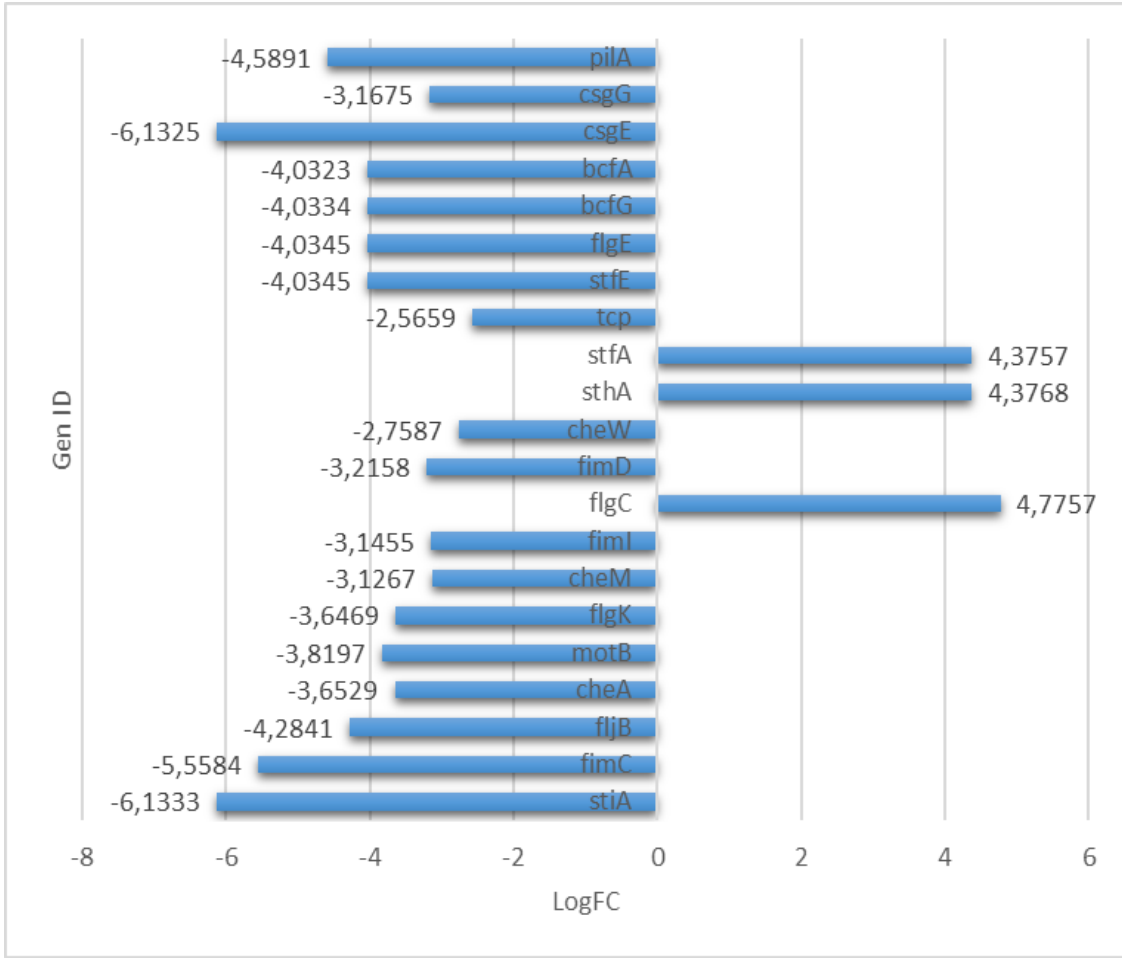
Şekil 4.19 *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *seqA* mutantında kalkoflor bağlanma testi bulguları

4.7 Doğal Tip Suş ile Onun *seqA* Mutantının Biyofilm Formlarından Yapılan Transkriptom Analizi ile Genlerin ifade Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Farklı ifade edilen genler, $\log_2$ (kat değişimi) > 1 kriterleri ve ayarlanmış P değeri <0.05 olan DESeq R paketi kullanılarak belirlendi. Buna göre *seqA* mutantında, doğal suşa oranla 64 genin ekspresyon seviyesi artarken, 196 genin ekspresyon seviyesi istatistiki açıdan anlamlı ölçüde ($P < 0.05$) azaldı. Fimbriyal proteinlerin ve bakteriyel hareket ile ilişkili proteinlerin genlerinde transkripsiyon oranı genel anlamda düştü. Bu mutantta regülasyonu tanımlanan 21 adet genin 18'inde transkripsiyon oranı belirgin bir şekilde düşerken, sadece *flgC*, *stfA* ve *sthA* genlerinde transkript oranı arttı. Bunların içerisinde sadece StfA fimbriya major ünitesi fonksiyonel tanısı in vivo koşullarda belirlenen bir protein olup, diğer genlerin kodladığı proteinlerin olası fonksiyonları veri tabanı analizleri ile belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.20).

Çizelge 4.1 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen hareket ve fimbriyal yapılar ile ilişkili genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW16280	-6,1333	<i>stiA</i>	Fimbriyal alt birim
CBW16637	-5,5584	<i>fimC</i>	Fimbriyal şaperon proteini
CBW18855	-4,2841	<i>fljB</i>	Flagellin
CBW17950	-3,6529	<i>cheA</i>	Kemotaksi proteini CheA
CBW17951	-3,8197	<i>motB</i>	Hareket proteini B
CBW17216	-3,6469	<i>flgK</i>	Flagellar kanca ilişkili protein 1
CBW17948	-3,1267	<i>cheM</i>	Metil kabul eden kemotaksi proteini II
CBW16636	-3,1455	<i>fimI</i>	Majör pilin proteini
CBW17208	4,7757	<i>flgC</i>	Teorik flagellar bazal-yapı çubuk proteini
CBW16638	-3,2158	<i>fimD</i>	Dış zar yer gösterici proteini FimD öncüsü
CBW17949	-2,7587	<i>cheW</i>	Purin bağlayıcı kemotaksis proteini
CBW20610	4,3768	<i>sthA</i>	Teorik fimbriyal şaperon protein
CBW16298	4,3757	<i>stfA</i>	Majör fimbriyal alt birim
CBW19636	-2,5659	<i>tcp</i>	Metil kabul eden kemotaksis sitrat dönüştürücü
CBW16301	-4,0345	<i>stfE</i>	Minör fimbriyal alt birim
CBW17210	-4,0345	<i>flgE</i>	Flagellar kanca proteini
CBW16128	-4,0334	<i>bcfG</i>	Fimbriyal şaperon
CBW16122	-4,0323	<i>bcfA</i>	Fimbriyal alt birimi
CBW17174	-6,1325	<i>csgE</i>	Curli üretimi montaj / taşıma bileşeni
CBW17172	-3,1675	<i>csgG</i>	Curli üretimi montaj / taşıma bileşeni
CBW16247	-4,5891	<i>pilA</i>	Majör pilin alt birimi

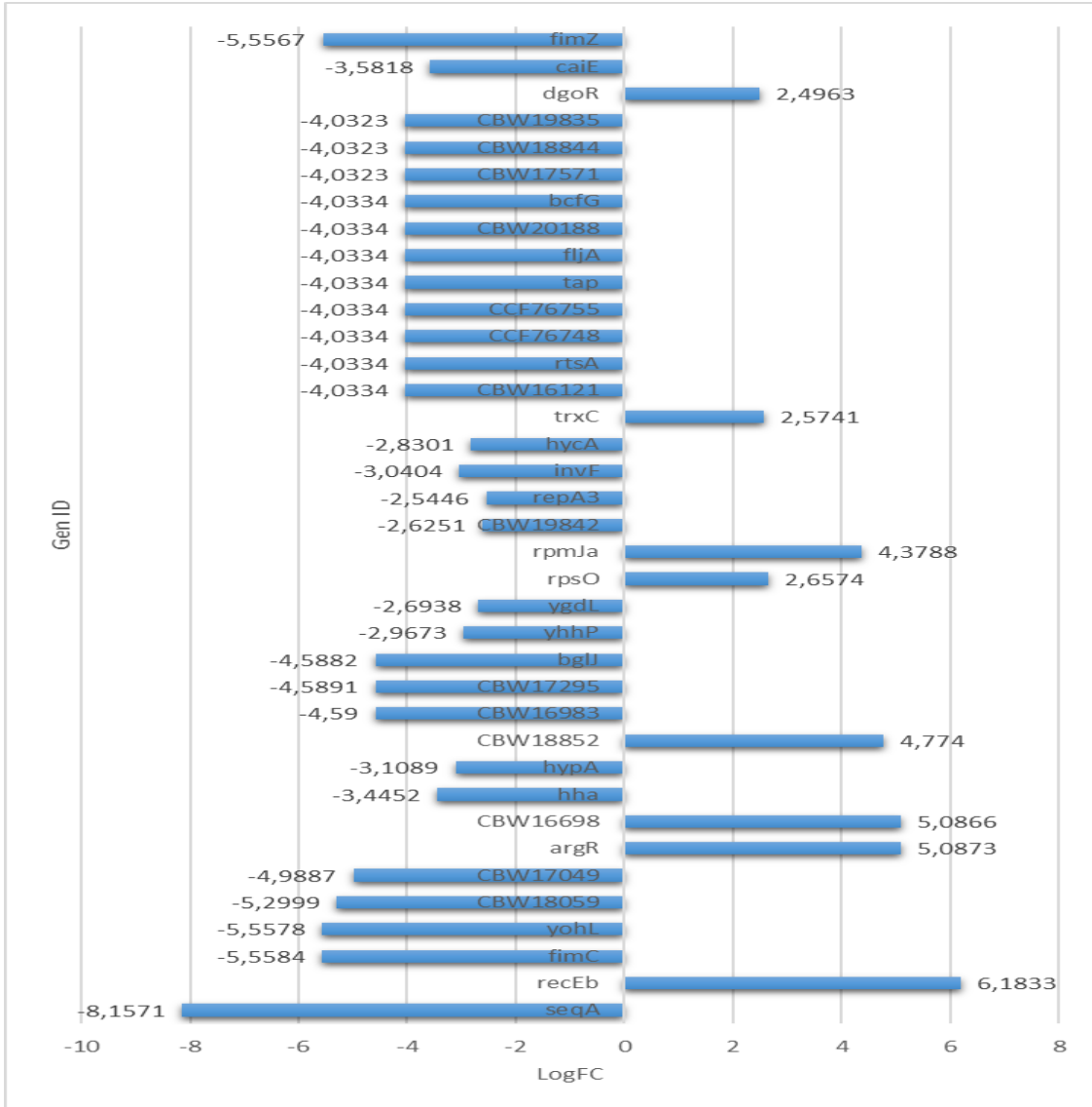


Şekil 4.20 Hareket ve fibriyal yapılar ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA mutantında genetik bilginin işleme süreçlerine katılan proteinleri kodlayan 37 adet genden transkripsiyon oranları, bu genlerin 6 adetinde artarken 31 adetinde düşme gösterdi. Transkripsiyon oranı artan genler; ekzodeoksiribonukleaz VIII, Arjinin biyosentez baskılayıcısı, bir moleküler şaperon ile S15 ve L36 ribozomal protein genleri olarak belirlendi. Özellikle replikasyon süreçleri ile ilişkili genlerin tamamında transkripsiyon oranı düştü (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.21).

Çizelge 4.2 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen genetik bilgi işleme proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW16778	-8,1571	<i>seqA</i>	Replikasyonun başlatılmasının negatif modülatörü
CBW18698	6,1833	<i>recEb</i>	Ekzodeoksiribonükleaz VIII
CBW16637	-5,5584	<i>fimC</i>	Fimbriyal şaperon proteini
CBW19100	-5,5578	<i>yohL</i>	Korunmuş teorik protein
CBW18059	-5,2999		Faj N-6-adenin-metiltransferaz
CBW17049	-4,9887		Faj DNA Replikasyon Proteini
CBW20481	5,0873	<i>argR</i>	Arginin biyosentezi baskılayıcısı
CBW16698	5,0866		Moleküler şaperon
CBW16567	-3,4452	<i>hha</i>	Hemolizin ekspresyonu modüle edici protein
CBW18932	-3,1089	<i>hypA</i>	Hidrojenaz olgunlaşma faktörü HypA
CBW18852	4,774		IS3 transpozaz
CBW16983	-4,59		ISPsy11, transpozaz OrfA
CBW17295	-4,5891		Teorik düzenleyici protein
CBW20568	-4,5882	<i>bglJ</i>	Korunmuş teorik düzenleyici protein
CBW19637	-2,9673	<i>yhhP</i>	Kükürt taşıyıcı protein TusA
CBW19066	-2,6938	<i>ygdL</i>	tRNA siklik N6-treonilkarbamoladenosin (37) sentaz
CBW19352	2,6574	<i>rpsO</i>	30S ribozomal alt birim protein S15
CBW16564	4,3788	<i>rpmJa</i>	Teorik 50s ribozomal protein L36
CBW19842	-2,6251		Teorik GntR ailesi transkripsiyonel düzenleyici
CCF76806	-2,5446	<i>repA3</i>	Plazmid replikasyon proteini
CBW18976	-3,0404	<i>invF</i>	AraC-ailesi transkripsiyonel düzenleyici protein
CBW18931	-2,8301	<i>hycA</i>	Format hidrojenilaz düzenleyici protein
CBW18715	2,5741	<i>trxC</i>	Tioredoxin 2
CBW16121	-4,0334		Crp / Fnr ailesi transkripsiyonel düzenleyici
CBW20337	-4,0334	<i>rtsA</i>	SPI-1 Düzenleyicisi
CCF76748	-4,0334		Teorik iç zar proteini
CCF76755	-4,0334		Teorik adenin spesifik DNA metilaz
CCF76805	-4,0334	<i>tap</i>	Plazmid replikasyon proteini
CBW18854	-4,0334	<i>fljA</i>	Faz 1 flagellin geninin baskılayıcısı
CBW20188	-4,0334		Tiamin biyosentez proteini
CBW16128	-4,0334	<i>bcfG</i>	Fimbriyal şaperon
CBW17571	-4,0323		Teorik düzenleyici protein
CBW18844	-4,0323		DNA bağlayıcı bakteriyofaj proteini
CBW19835	-4,0323		DNA bağlayıcı transkripsiyonel düzenleyici
CBW19888	2,4963	<i>dgoR</i>	Galaktonat operon transkripsiyonel baskılayıcı
CBW16171	-3,5818	<i>caiE</i>	Karnitin operon proteini CaiE
CBW16641	-5,5567	<i>fimZ</i>	Fimbriyal biyosentez transkripsiyonel regülatörü FimXZ

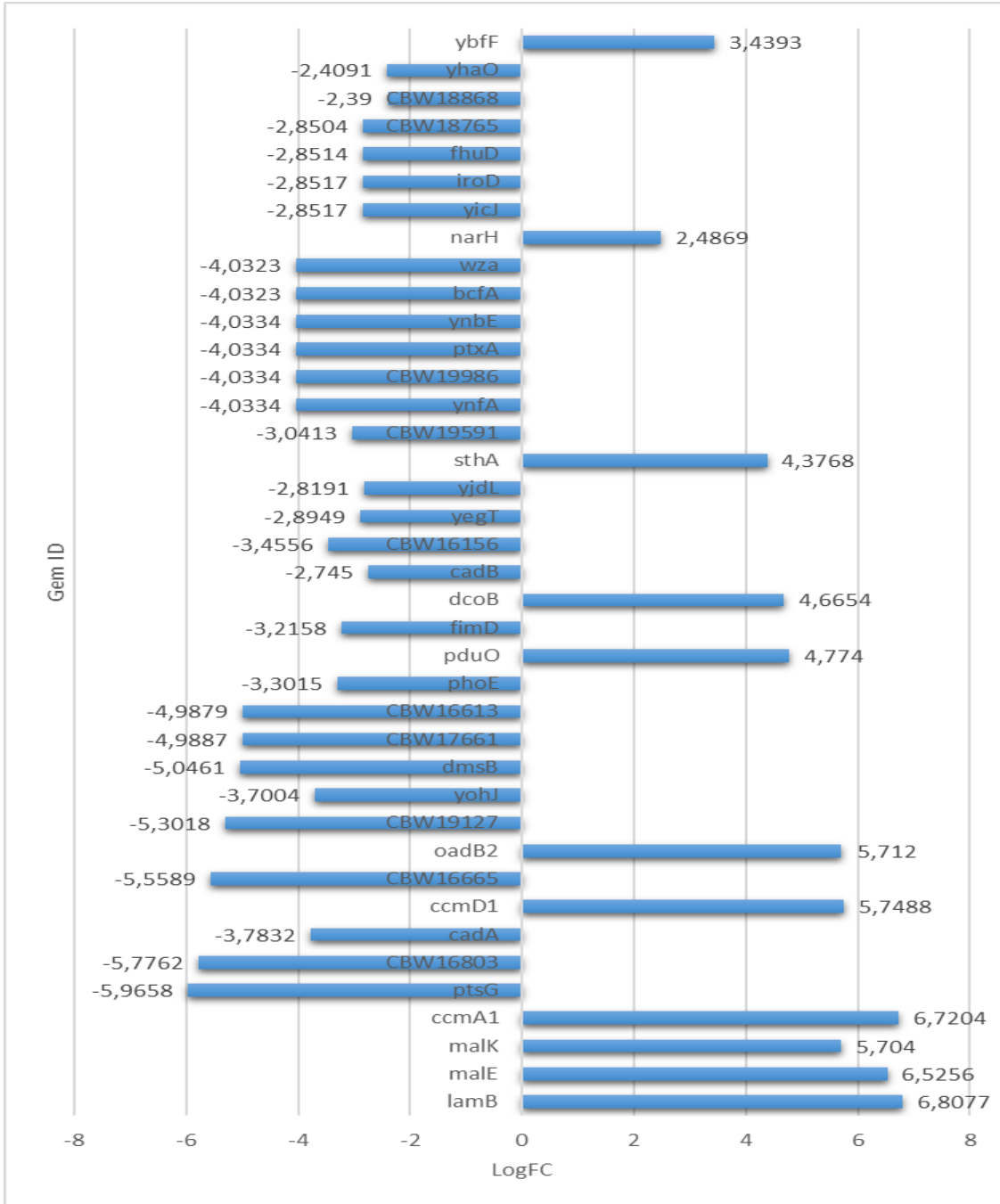


Şekil 4.21 Genetik bilgi işleme ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta, doğal suştan farklı olarak transkribe edilen taşıyıcı sistem proteinlerini kodlayan 39 adet genden 11 adetinde transkript oranı artarken, 28 adetinde azaldı. Transkripsiyon oranında artış belirlenen genlerden; *lamb*, *malE* ve *malK* maltoz kullanımı, *ccmA1* ve *ccmD1* protohem eksportu, *oadB2* ve *dcoB* okzalasetat dekarboksilaz beta zinciri bileşenleri, *pduO* korrinoid transferi ve *narH* nitrat redüktaz beta zinciri, proteinlerini kodlamaktadır. PTS ve ABC taşıma sistemlerinin temel elemanlarını kodlayan genler yanında, MSF metabolit taşıma protein genlerinde ve kadaverin/lizin antiportunu gerçekleştiren protein genlerinde transkripsiyon oranı düştü (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.22).

Çizelge 4.3 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen taşıyıcı sistem proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW20255	6,8077	<i>lamB</i>	Maltoporin öncüsü
CBW20253	6,5256	<i>malE</i>	Periplazmik maltoz bağlayıcı protein
CBW20254	5,704	<i>malK</i>	Maltoz/maltodekstrin taşıma ATP bağlayıcı protein
CBW19876	6,7204	<i>ccmA1</i>	Protohem eksport proteini 1A
CBW18842	-5,9658	<i>ptsG</i>	PTS sistemi, glikoza özgü IIbc bileşeni
CBW16803	-5,7762		ABC taşıyıcı proteini
CBW18622	-3,7832	<i>cadA</i>	Lizin dekarboksilaz
CBW19873	5,7488	<i>ccmD1</i>	Protohem eksport proteini D1
CBW16665	-5,5589		Teorik protein
CBW19419	5,712	<i>oadB2</i>	Oksaloasetat dekarboksilaz beta zinciri 2
CBW19127	-5,3018		Teorik protein
CBW18254	-3,7004	<i>yohJ</i>	Teorik membran proteini
CBW17522	-5,0461	<i>dmsB</i>	Dimetilsülfoksit redüktaz alt birimi B
CBW17661	-4,9887		Teorik amino asit ABC taşıyıcısı
CBW16613	-4,9879		Teorik MFS metabolit taşıma proteini
CBW16417	-3,3015	<i>phoE</i>	Dış membran por proteini E öncüsü
CBW18122	4,774	<i>pduO</i>	Korrinoid adenosiltransferaz
CBW16638	-3,2158	<i>fimD</i>	Fimbriyal biyogenez dış membran başlatıcı protein
CBW16843	4,6654	<i>dcoB</i>	Oksaloasetat dekarboksilaz beta zinciri (ec 4.1.1.3)
CBW18621	-2,745	<i>cadB</i>	Kadaverin / lizin antiporter
CBW16156	-3,4556		Oksaloasetat dekarboksilaz beta zinciri (ec 4.1.1.3)
CBW18215	-2,8949	<i>yegT</i>	Teorik nükleozit permeaz
CBW18623	-2,8191	<i>yjdL</i>	Teorik transmembran taşıyıcı protein
CBW20610	4,3768	<i>sthA</i>	Teorik fimbriyal şaperon proteini
CBW19591	-3,0413		Teorik MFS-ailesi membran taşıma proteini
CBW17529	-4,0334	<i>ynfA</i>	UPF0060 membran proteini YnfA
CBW19986	-4,0334		Teorik iç membran proteini
CBW20404	-4,0334	<i>ptxA</i>	PTS askorbat taşıyıcı alt birimi IIA
CBW17670	-4,0334	<i>ynbE</i>	Teorik lipoprotein
CBW16122	-4,0323	<i>bcfA</i>	Fimbriyal alt birim
CBW18191	-4,0323	<i>wza</i>	Teorik polisakkarit salgı proteini
CBW17786	2,4869	<i>narH</i>	Solunum, nitrat redüktaz 1 beta zinciri
CBW19810	-2,8517	<i>yicJ</i>	Glikozit-pentosit-hekzurinit ailesi taşıyıcı protein
CBW18859	-2,8517	<i>iroD</i>	Teorik ferrik enterokelin esteraz
CBW16296	-2,8514	<i>fhuD</i>	Fe (3+) - hidroksamat ABC taşıyıcı protein
CBW18765	-2,8504		Teorik tip I salgı proteini, ATP bağlayıcı
CBW18868	-2,39		Teorik salgı proteini
CBW19309	-2,4091	<i>yhaO</i>	Teorik membran taşıma proteini
CBW16777	3,4393	<i>ybfF</i>	Teorik esteraz / lipaz YbfF



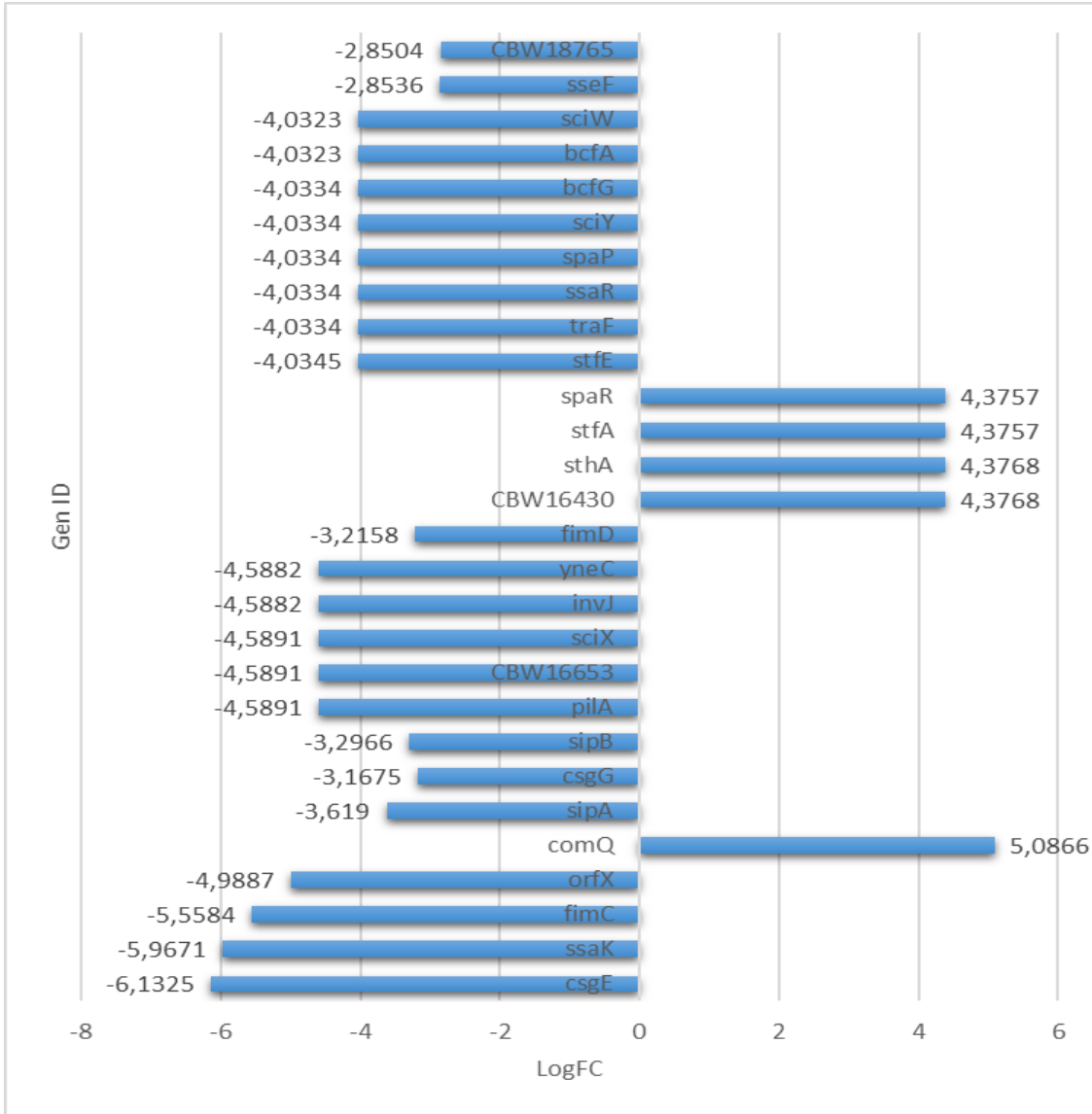
Şekil 4.22 Taşıyıcı sistem proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşa doğal suştan farklı olarak transkribe edilen salgı sistem proteinlerini kodlayan genler (29 adet) incelendiğinde; bunların sadece 5 adetinde (*comQ*, kompetens geni ve *spaR*, bir tip III salgı sistemi aparatını kodlayan gen, diğer 3 genin fonksiyonu ise in vivo koşullarda tanımlanmamış) transkript oranının yüksek olduğu, bunun yanında curli fimbriya üretimi, fimbriyal şaperon proteinleri, SPI1, SPI5 ve SPI6 proteinleri,

TipIII salgı sistemi proteinleri, kompetens genleri, quorum-sensing proteinleri ve fimbriyal biyogenez ve fimbriyal şaperonlar ile ilişkili genlerin tamamında transkripsiyon oranının düştüğü tespit edildi (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.23).

Çizelge 4.4 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen salgı sistem proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW17174	-6,1325	<i>csgE</i>	Curli üretiminde montaj / taşıma bileşeni
CBW17441	-5,9671	<i>ssaK</i>	Tip III salgı sistem aparatı
CBW16637	-5,5584	<i>fimC</i>	Fimbriyal şaperon proteini
CBW17127	-4,9887	<i>orfX</i>	LT2- Patojenite adası proteini (SPI5)
CBW19074	5,0866	<i>comQ</i>	Kompetans geni
CBW18959	-3,619	<i>sipA</i>	Patojenite adası 1 Tip III salgı sistemi efektör proteini
CBW17172	-3,1675	<i>csgG</i>	Curli üretiminde montaj / taşıma bileşeni
CBW18962	-3,2966	<i>sipB</i>	Patojenite adası 1 Tip III salgı sistemi efektör proteini
CBW16247	-4,5891	<i>pilA</i>	Kompetans geni - DNA bağlanması ve taşınması
CBW16653	-4,5891		Teorik salgı proteini
CBW16390	-4,5891	<i>sciX</i>	Korunmuş teorik protein (SPI-6 ile ilişkili)
CBW18969	-4,5882	<i>invJ</i>	Antijen proteininin yüzey sunumu (tip III sekresyon ve virülans ile ilişkili)
CBW20117	-4,5882	<i>yneC</i>	(4S)-4-hidroksi-5-fosfonooksipentan-2,3-dion izomeras (Quorum sensing)
CBW16638	-3,2158	<i>fimD</i>	Fimbriyal biyogenez dış membran başlatıcı protein
CBW16430	4,3768		Teorik salgı proteini
CBW20610	4,3768	<i>sthA</i>	Teorik fimbriyal şaperon proteini
CBW16298	4,3757	<i>stfA</i>	Teorik fimbriyal alt birim stfa
CBW18965	4,3757	<i>spaR</i>	Tip III salgı sistemi salgı aparatı
CBW16301	-4,0345	<i>stfE</i>	Teorik fimbriyal alt birim stfe (küçük alt birim)
CCF76720	-4,0334	<i>traF</i>	konjugatif transfer montaj proteini
CBW17449	-4,0334	<i>ssaR</i>	SPI-2 tip III sekresyon sistemi ihracat aparatı protein SsaR
CBW18967	-4,0334	<i>spaP</i>	SPI-1 tip III salgılama sistemi, salgı aparatı protein SpaP
SL1344_0289	-4,0334	<i>sciY</i>	Teorik fosfotriesteraz (psödogen)
CBW16128	-4,0334	<i>bcfG</i>	Fimbriyal şaperon
CBW16122	-4,0323	<i>bcfA</i>	Fimbriyal alt birimi
CBW16386	-4,0323	<i>sciW</i>	Korunmuş teorik protein (SPI-6)
CBW17434	-2,8536	<i>sseF</i>	Tip III salgı sistemi efektör proteini, SCV'yi düzenler ve korur
CBW18765	-2,8504		Teorik tip I sekresyon proteini, ATP bağlayıcı protein

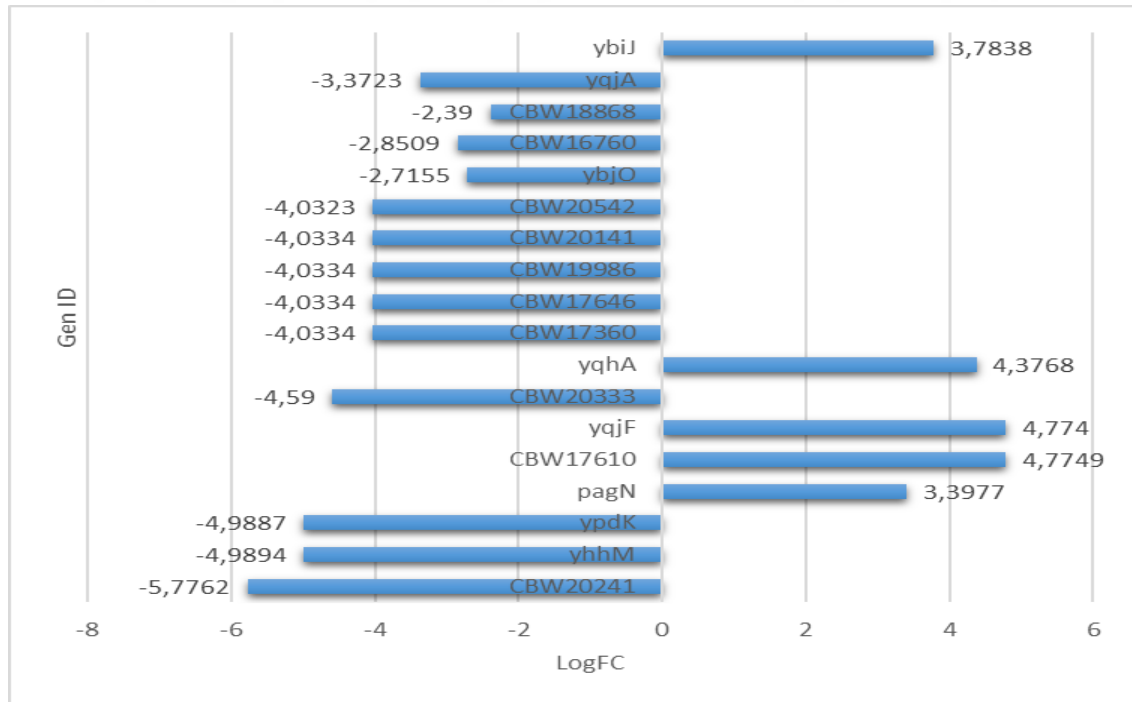


Şekil 4.23 Salgı sistem proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta membran proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyon profilleri değerlendirildiğinde; endolizin ve iç zar proteini gibi fonksiyonel tanısı yapılmış 2 protein geni yanında 11 adet teorik protein geninin transkripsiyon oranında düşme, *pagN* (dış membran adhezin/invazin proteini) yanında teorik diğer 4 membran protein geni transkripsiyon oranında ise artış belirlendi (Şekil 4.24 ve Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen membran proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW20241	-5,7762		Endolizin
CBW19633	-4,9894	<i>yhhM</i>	Teorik iç zar proteini
CCG27791	-4,9887	<i>ypdK</i>	Korunmuş sORF
CBW16403	3,3977	<i>pagN</i>	Dış membran adhesin/invasin proteini
CBW17610	4,7749		Teorik lipoprotein
CBW19302	4,774	<i>yqjF</i>	Teorik zar proteini
CBW20333	-4,59		Teorik zar proteini
CBW19226	4,3768	<i>yqhA</i>	Teorik zar proteini
CBW17360	-4,0334		Teorik zar proteini
CBW17646	-4,0334		Teorik salgı proteini
CBW19986	-4,0334		Teorik iç zar proteini
CBW20141	-4,0334		İç zar proteini
CBW20542	-4,0323		Teorik iç zar proteini
CBW16954	-2,7155	<i>ybjO</i>	Teorik zar proteini
CBW16760	-2,8509		Teorik salgı proteini
CBW18868	-2,39		Teorik salgı proteini
CBW19297	-3,3723	<i>yqjA</i>	Teorik zar proteini
CBW16897	3,7838	<i>ybiJ</i>	Teorik salgı proteini

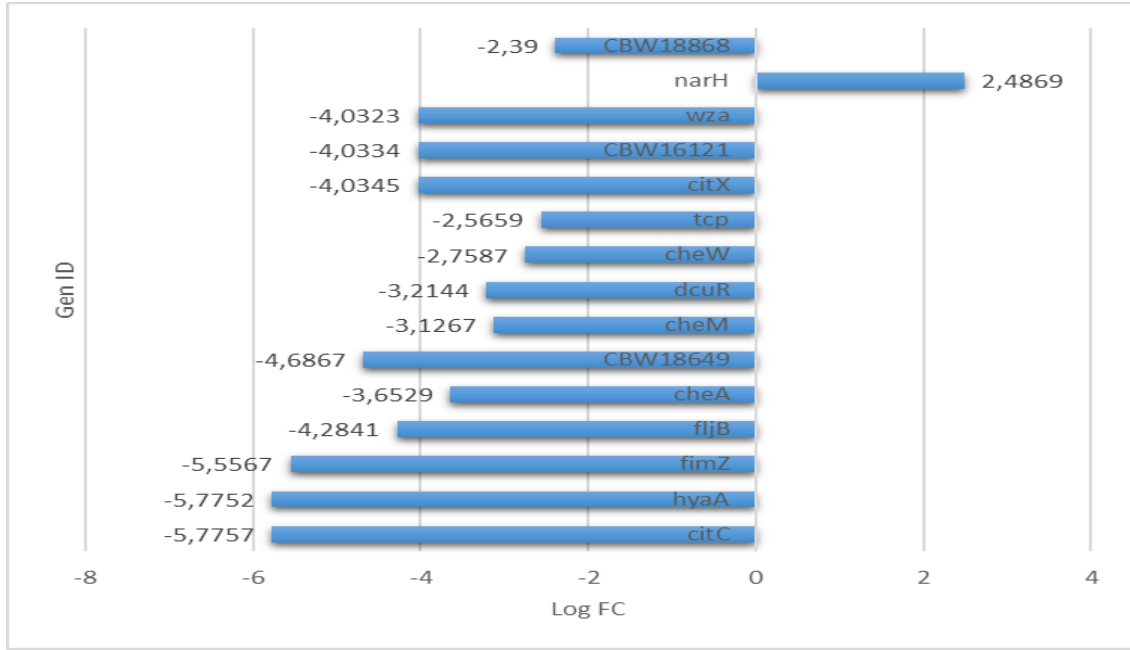


Şekil 4.24 Membran proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Sinyal aktarımı ile ilgi genlerin *seqA* mutantında transkripsiyonu artan tek üyesi *narH* (nitrat redüktaz 1 beta zinciri) olurken; sitrat liyaz, hidrojenaz alt birimi, fimbriya regülatörü, flagellin, kemotaksi proteinleri, endodeoksiribonuklez, Crp/Fnr ailesi transkripsiyonel düzenleyici genlerinde transkripsiyon oranı düştü (Şekil 4.25 ve Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen sinyal transdüksiyon proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW16712	-5,7757	<i>citC</i>	[sitrat (pro-3S) -liyaz] ligaz
CBW17809	-5,7752	<i>hyaA</i>	Hidrojenaz-1 küçük alt birim
CBW16641	-5,5567	<i>fimZ</i>	Fimbriya biyosentez transkripsiyonel düzenleyici FimZ
CBW18855	-4,2841	<i>fljB</i>	Flagellin
CBW17950	-3,6529	<i>cheA</i>	Kemotaksi proteini CheA
CBW18649	-4,6867		Endodeoksiribonükleaz
CBW17948	-3,1267	<i>cheM</i>	Metil kabul eden kemotaksis protein II
CBW20326	-3,2144	<i>dcuR</i>	İki bileşenli yanıt düzenleyici
CBW17949	-2,7587	<i>cheW</i>	Purin bağlayıcı kemotaksis proteini
CBW19636	-2,5659	<i>tcp</i>	Metil kabul eden kemotaksis sitrat dönüştürücü
CBW16708	-4,0345	<i>citX</i>	Apo-sitrat liyaz fosforibosil-defosfo-coa transferaz
CBW16121	-4,0334		Crp / Fnr ailesi transkripsiyonel düzenleyici
CBW18191	-4,0323	<i>wza</i>	Teorik polisakkarit ihraç proteini
CBW17786	2,4869	<i>narH</i>	Solunum nitrat redüktaz 1 beta zinciri
CBW18868	-2,39		Teorik salgı proteini

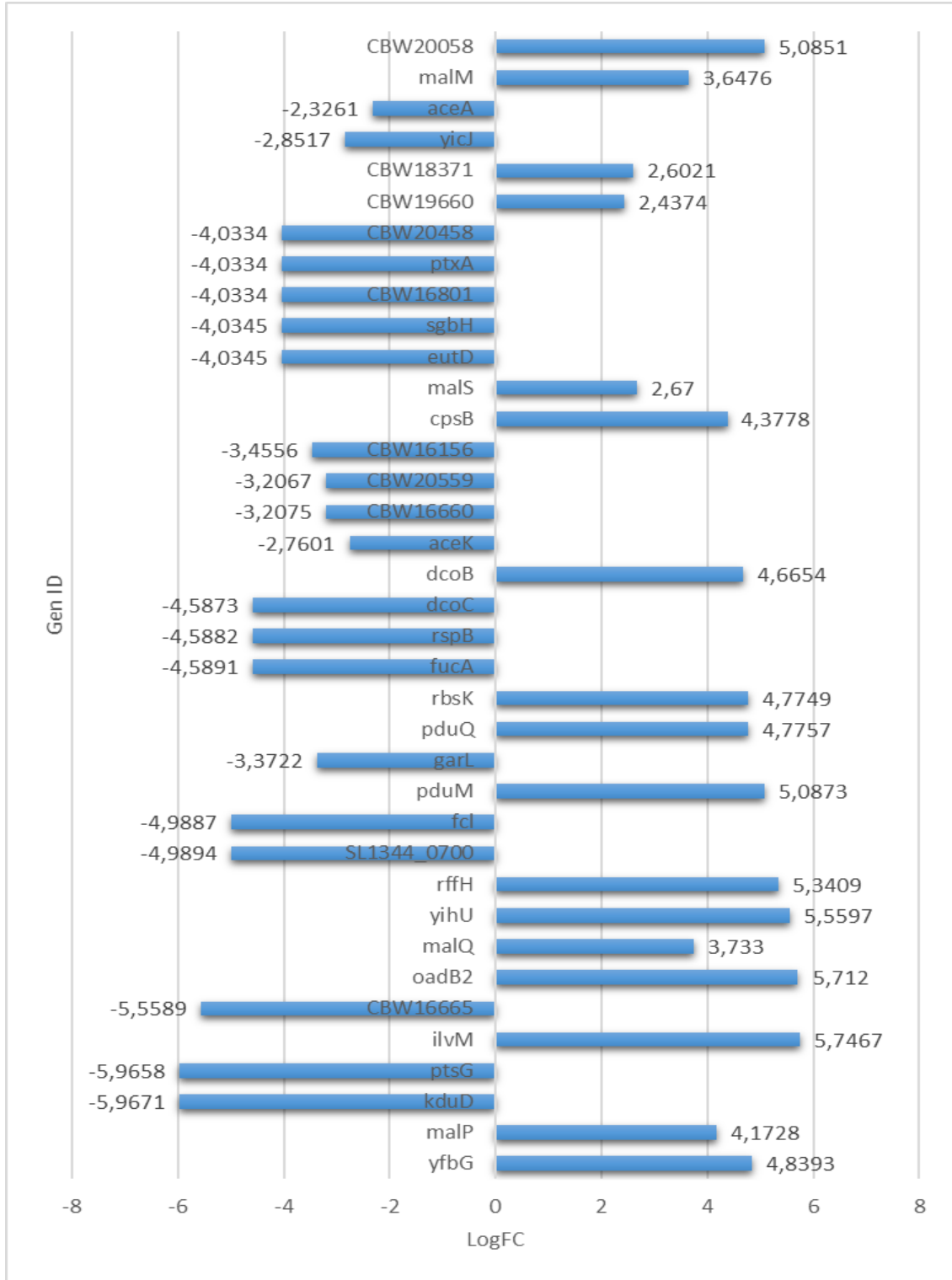


Şekil 4.25 Sinyal transdüksiyon proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşa karbonhidrat metabolizmasına katılan genlerden 38 adetinden 20 adetinin transkripsiyon oranının düştüğü, 17 adetinin ise transkripsiyon oranının yükseldiği tespit edildi. Transkripsiyon oranı düşen genlerden açlık algılama proteinini kodlayan gen (*rspB*), PTS sistemi bileşenleri, dehidrohenazlar, dekarboksilazlar, galaktoziltransferazlar ve etanolamin kullanım proteini genleri dikkat çekmektedir. Transkripsiyon oranı artan genler içerisinde ise maltoz dekstrin fosforilaz, glukano transferaz, aseto hidroksi asit sintaz, ozalalasetat dekarboksilaz, oksido redüktaz, ribokinaz, 1-propanol dehidrogenaz, glikoz-1-fosfat timidililtransferaz, mannoz-1-fosfat guanililtransferaz ve alfa amilaz fonksiyonları iyi tanımlanmış karbonhidrat metabolizması ile ilişkili genlerdir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.26)

Çizelge 4.7 *seqA* geni bakımından mutant sušta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen karbonhidrat metabolizması proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW18370	4,8393	<i>yfbG</i>	Teorik lipopolisakkarit modifikasyon proteini
CBW19576	4,1728	<i>malP</i>	Maltodekstrin fosforilaz
CBW19094	-5,9671	<i>kduD</i>	2-keto-3-deoksiglukonat oksidoredüktaz
CBW18842	-5,9658	<i>ptsG</i>	PTS sistemi, glikoza özgü IIbc bileşeni
CBW19951	5,7467	<i>ilvM</i>	Asetohidroksi asit sentaz II, küçük alt birim
CBW16665	-5,5589		Teorik protein
CBW19419	5,712	<i>oadB2</i>	Oksaloasetat dekarboksilaz beta zinciri 2
CBW19575	3,733	<i>malQ</i>	4-alfa-glukanotransferaz
CBW20059	5,5597	<i>yihU</i>	Teorik oksidoredüktaz
CBW19972	5,3409	<i>rffH</i>	Glikoz-1-fosfat timidililtransferaz
SL1344_0700	-4,9894		Teorik udp-galaktopiranoz mutaz (psödogen)
CBW18181	-4,9887	<i>fcl</i>	GDP-L-fukoz sentetaz
CBW18120	5,0873	<i>pduM</i>	Propandiol kullanım mikro-kompartıman proteini PduM
CBW19318	-3,3722	<i>garL</i>	5-keto-4-deoksi-D-glukarat aldolaz
CBW18124	4,7757	<i>pduQ</i>	1-propanol dehidrojenaz
CBW19607	4,7749	<i>rbsK</i>	Ribokinaz
CBW19053	-4,5891	<i>fucA</i>	Fukuloz-1-fosfat aldolaz
CBW17531	-4,5882	<i>rspB</i>	Açlık algılama proteini RspB
CBW16841	-4,5873	<i>dcoC</i>	Oksaloasetat dekarboksilaz gama zinciri(ec 4.1.1.3)
CBW16843	4,6654	<i>dcoB</i>	Oksaloasetat dekarboksilaz gama zinciri (ec 4.1.1.3)
CBW20208	-2,7601	<i>aceK</i>	İzositrat dehydrogenase kinase/phosphatase
CBW16660	-3,2075		Teorik fosfataz izomeraz
CBW19722	2,67	<i>mals</i>	Alfa-amilaz
CBW18531	-4,0345	<i>eutD</i>	Etanolamin kullanım proteini EutD
CBW19733	-4,0345	<i>sgbH</i>	3-keto-L-gulonat-6-fosfat dekarboksilaz UlaD
CBW16801	-4,0334		Galaktoziltransferaz
CBW20404	-4,0334	<i>ptxA</i>	PTS askorbat taşıyıcı alt birimi IIA
CBW20458	-4,0334		Glisin dehidrojenaz
CBW19660	2,4374		Teorik fosfo şeker bağlayıcı protein
CBW18371	2,6021		Teorik 4-deoksi-4-formamido-L-arabinoz-fosfoundekaprenol deformilaz ArnD
CBW19810	-2,8517	<i>yicJ</i>	Glikozid-pentosid-hekzuronid ailesi taşıyıcı
CBW20207	-2,3261	<i>aceA</i>	İzositrat liyaz
CBW20256	3,6476	<i>malM</i>	Maltoz operonu periplazmik proteini
CBW20058	5,0851		Sülfofruktosfosfat aldolaz
CBW20559	-3,2067		İzositrat dehidrojenaz kinaz / fosfataz
CBW16156	-3,4556		Oksaloasetat dekarboksilaz gama zinciri (ec 4.1.1.3)
CBW18178	4,3778	<i>cpsB</i>	Mannoz-1-fosfat guanililtransferaz

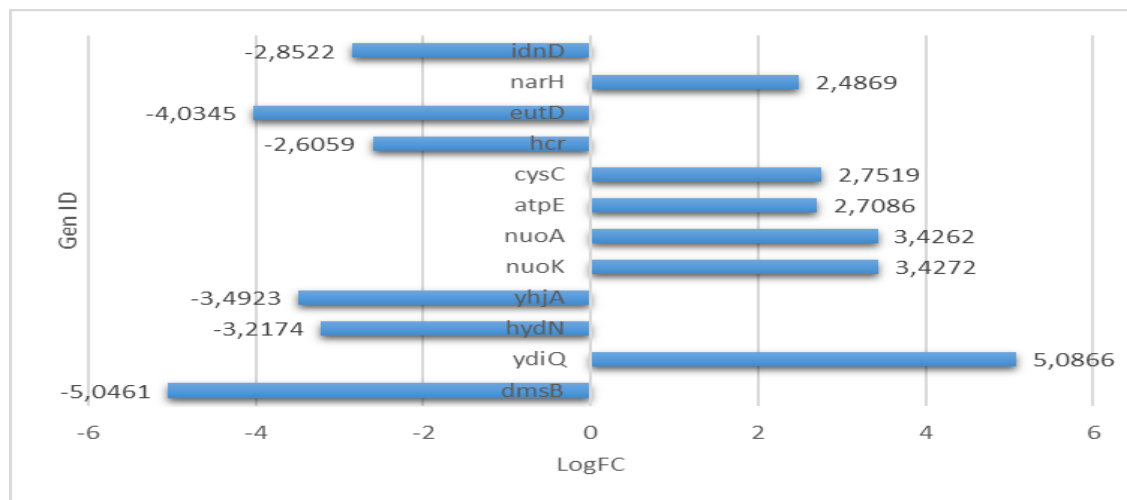


Şekil 4.26 Karbonhidrat metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla seqA mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta dimetilsülfoksit redüktaz, bazı elektron taşıma proteinlerini kodlayan genlerin, oksidoredüktaz-FAD ve [2FE-2S] kofaktörü, etanolamin kullanım proteini ve l-idonat 5-dehidrojenaz genlerinin transkripsiyon oranında düşme; NADH-kinon oksidoredüktaz alt birimi K ve A, ATP sentaz alt birimi C, adenilsülfat kinaz ve nitrat redüktaz 1 beta zinciri genlerinin transkripsiyon oranında artış tespit edildi (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.27).

Çizelge 4.8 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen enerji metabolizması proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW17522	-5,0461	<i>dmsB</i>	Dimetilsülfoksit redüktaz alt birimi B
CBW17385	5,0866	<i>ydiQ</i>	Teorik elektron transferi flavoprotein alt birimi
CBW18921	-3,2174	<i>hydN</i>	Elektron taşıma proteini
CBW19877	-3,4923	<i>yhjA</i>	Teorik sitokrom c peroksidaz
CBW18390	3,4272	<i>nuoK</i>	NADH-kinon oksidoredüktaz alt birimi K
CBW18399	3,4262	<i>nuoA</i>	NADH-kinon oksidoredüktaz alt birimi A
CBW19928	2,7086	<i>atpE</i>	ATP sentaz alt birimi C
CBW19011	2,7519	<i>cysC</i>	Adenilsülfat kinaz
CBW16971	-2,6059	<i>hcr</i>	Hibrit küme protein oksidoredüktaz-FAD ve [2FE-2S] kofaktörü
CBW18531	-4,0345	<i>eutD</i>	Etanolamin kullanım proteini EutD
CBW17786	2,4869	<i>narH</i>	Solunum nitrat redüktaz 1 beta zinciri
CBW20502	-2,8522	<i>idnD</i>	l-idonat 5-dehidrojenaz (ec 1.1.1.264)

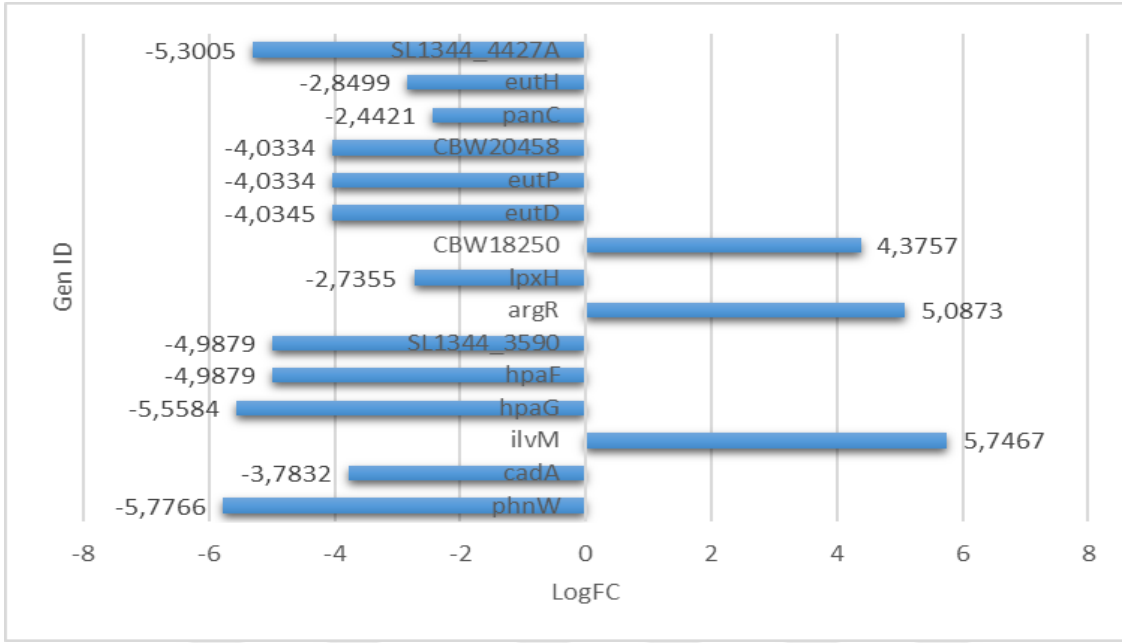


Şekil 4.27 Enerji metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2).

seqA geni bakımından mutant suшта doğal suştan farklı olarak transkribe edilen amino asit metabolizması proteinlerini kodlayan genler içerisinde piruvat aminotransferaz, lizin dekarboksilaz, amfibolik yollarda işlev gören dekarboksilazlar izomerazlar, liyazlar (metiyonin), kinazlar, ligazlar ve dehidrogenazlar yanında etonamin kullanım proteinleri transkripsiyon oranlarında düşme; FAA hidrolaz, Arjinin baskılayıcısı ve asetohidroksi asit sentaz II küçük alt birim genlerinin transkripsiyon oranlarında artış tespit edildi (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.28).

Çizelge 4.9 *seqA* geni bakımından mutant suшта doğal suştan farklı olarak transkribe edilen amino asit metabolizması proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW16525	-5,7766	<i>phnW</i>	2-aminoetilfosfonat: piruvat aminotransferaz
CBW18622	-3,7832	<i>cadA</i>	Lizin dekarboksilaz
CBW19951	5,7467	<i>ilvM</i>	Asetohidroksi asit sentaz II, küçük alt birim
CBW17136	-5,5584	<i>hpaG</i>	4-hidroksifenilasetat bozunması iki işlevli izomeraz dekarboksilaz
CBW17139	-4,9879	<i>hpaF</i>	5-karboksimetil-2-hidroksimukonat delta-izomeraz
SL1344_3590	-4,9879		Metiyonin gama-liyaz (fragment)
CBW20481	5,0873	<i>argR</i>	Arginin baskılayıcı
CBW16627	-2,7355	<i>lpxH</i>	UDP-2,3-diasilglukozamin hidrolaz
CBW18250	4,3757		FAA hidrolaz ailesi proteini
CBW18531	-4,0345	<i>eutD</i>	Etanolamin kullanım proteini EutD
CBW18534	-4,0334	<i>eutP</i>	Etanolamin kullanımı asetat kinaz EutP
CBW20458	-4,0334		Glisin dehidrojenaz
CBW16284	-2,4421	<i>panC</i>	Pantoat-beta-alanin ligaz
CBW18525	-2,8499	<i>eutH</i>	Etanolamin kullanım proteini EutH
SL1344_4427A	-5,3005		Teorik fumarilasetoasetat (faa) hidrolaz

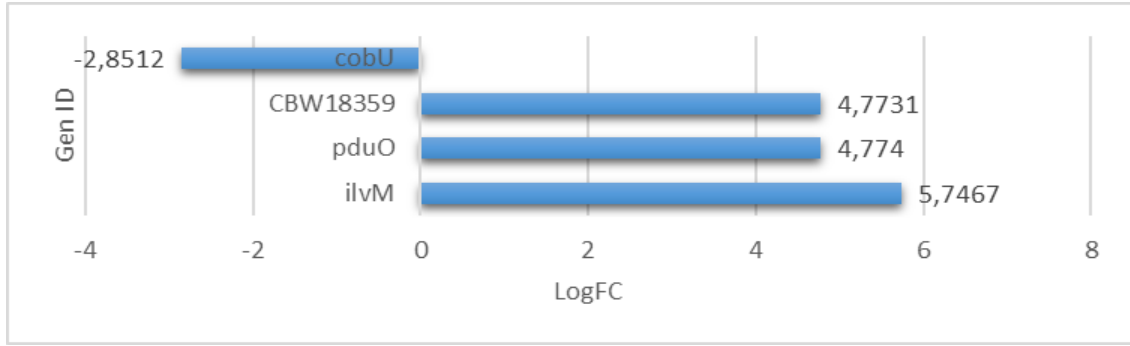


Şekil 4.28 Amino asit metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşta oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen kofaktör ve vitamin metabolizması proteinlerini kodlayan 4 genden sadece kobinamid kinaz ve guaniltransferaz geni transkripsiyon oranında düşme; asetohidroksi asit sentaz II küçük alt birimi, korinoid adenozil transferaz ve molibdopterin bağlayıcı protein geni transkripsiyon oranlarında ise artış saptandı (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.29).

Çizelge 4.10 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen kofaktör ve vitamin metabolizması proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW19951	5,7467	<i>ilvM</i>	Asetohidroksi asit sentaz II, küçük alt birim
CBW18122	4,774	<i>pduO</i>	Korinoid adenoziltransferaz
CBW18359	4,7731		Molibdopterin bağlayıcı protein
CBW18090	-2,8512	<i>cobU</i>	Kobinamid kinaz ve guanililtransferaz

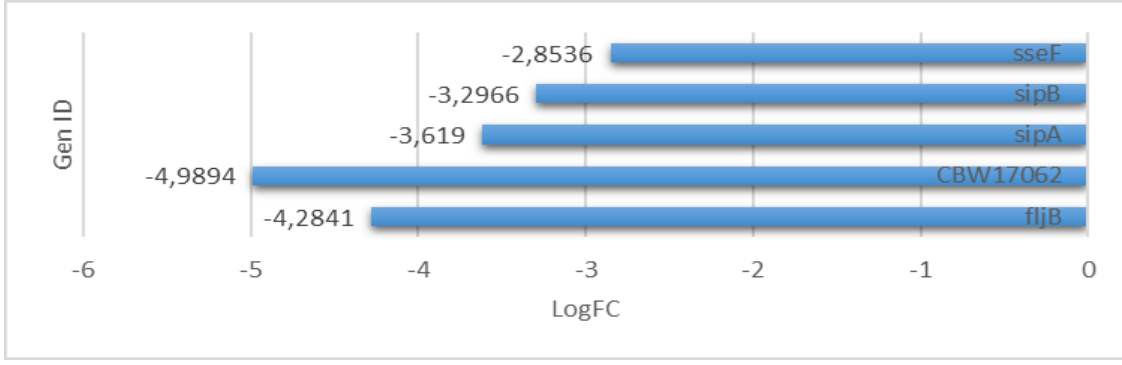


Şekil 4.29 Kofaktör ve vitamin metabolizmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA mutant suşunda *Salmonella* enfeksiyonu ile ilgili tespit edilen flagellin, gfsy-2-bakteriyofaj holin, Tip III salgı sistemi efektör proteini SipA, Tip III salgı sistemi efektör proteini invazin B ve Tip III salgı sistemi *Salmonella* vokuolü koruyucu efektör proteini genlerinin tamamının transkripsiyon oranında düşme belirlendi (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.30).

Çizelge 4.11 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen *Salmonella* enfeksiyonunda rol alan proteinleri kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW18855	-4,2841	<i>fljB</i>	Flagellin
CBW17062	-4,9894		Gfsy-2 bakteriyofaj holin
CBW18959	-3,619	<i>sipA</i>	Patojenite adası 1 Tip III sekresyon sistemi efektör invazyon proteini SipA
CBW18962	-3,2966	<i>sipB</i>	Patojenite adası 1 Tip III sekresyon sistemi efektör protein invazin B
CBW17434	-2,8536	<i>sseF</i>	Tip III salgı sistemi efektör proteini - SCV'yi düzenler ve korur

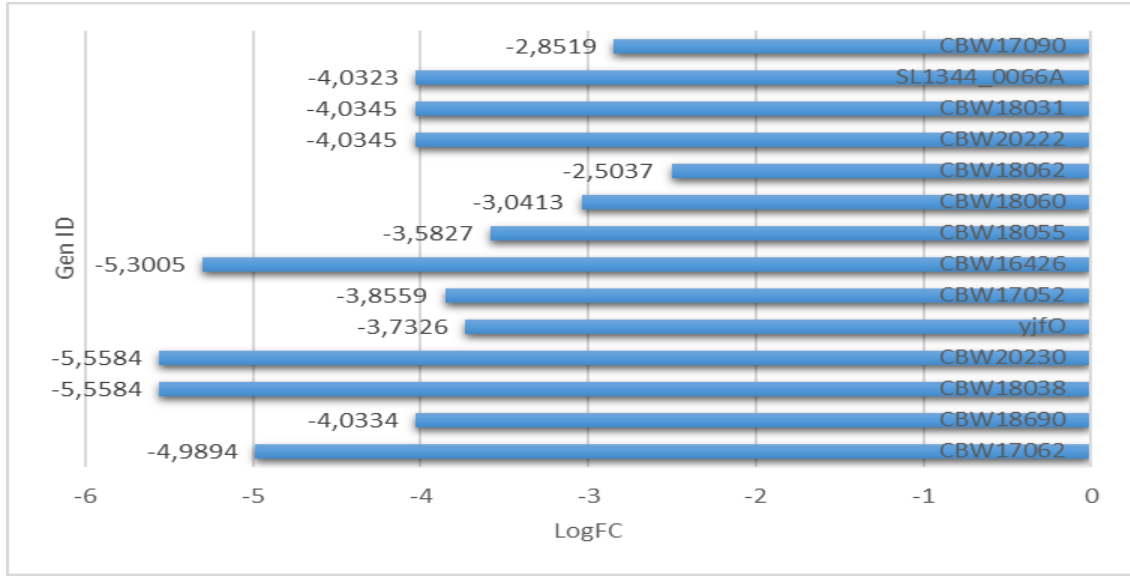


Şekil 4.30 *Salmonella* enfeksiyonunda görev alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen faj bölgeleri ve virülans proteinleri kodlayan 14 genin tamamının transkripsiyon oranı belirgin bir şekilde düştü. Bunların içerisinde en dikkat çekici olanı biyofilm peroksit direnç genidir (*yjfO*). Bakteriyofaj yapısal genleri muhtemelen bakteriyal kromozoma göç etmiş genler olarak yorumlanmıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.31).

Çizelge 4.12 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen faj bölgeleri ve virülans proteinleri kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
CBW17062	-4,9894		Gifsy-2 bakteriyofaj holin
CBW18690	-4,0334		Ead / Ea22 benzeri aile bakteriyofaj proteini
CBW18038	-5,5584		Bakteriyofaj kuyruk kılıfı proteini
CBW20230	-5,5584		Bakteriyofaj kuyruk proteini
CBW20398	-3,7326	<i>yjfO</i>	Biyofilm peroksit direnç proteini
CBW17052	-3,8559		Teorik bakteriyofaj proteini
CBW16426	-5,3005		Teorik bakteriyofaj proteini
CBW18055	-3,5827		Teorik bakteriyofaj proteini
CBW18060	-3,0413		Teorik bakteriyofaj proteini
CBW18062	-2,5037		Teorik bakteriyofaj proteini
CBW20222	-4,0345		Teorik bakteriyofaj proteini
CBW18031	-4,0345		Teorik bakteriyofaj proteini
SL1344_0066A	-4,0323		Teorik viral protein (psödogen)
CBW17090	-2,8519		Teorik bakteriyofaj proteini (psödogen)

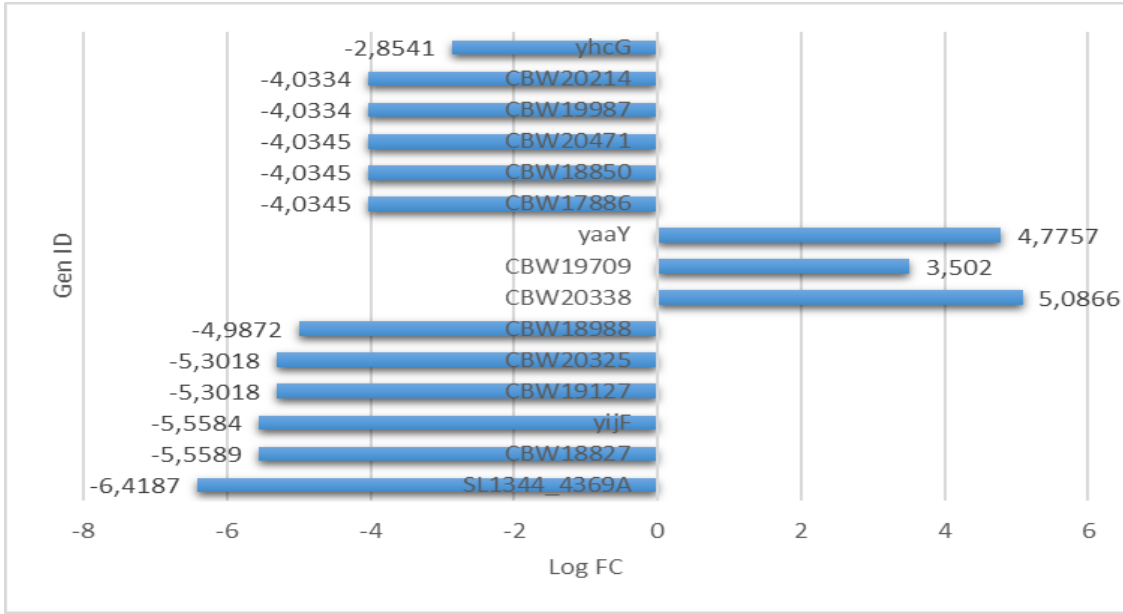


Şekil 4.31 Faj bölgeleri ve virülans proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen fonksiyonu bilinmeyen proteinleri kodlayan genlerin 3 adetinin transkripsiyon oranında artma, 12 adetinin transkripsiyon oranında ise azalma tespit edildi (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.32).

Çizelge 4.13 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen fonksiyonu bilinmeyen proteinleri kodlayan genler

Gen Kimliği	logFC	Gen Adı	Gen Tanımı
SL1344_4369A	-6,4187		Korunmuş teorik protein (psödogen)
CBW18827	-5,5589		Korunmuş teorik protein
CBW20146	-5,5584	<i>yijF</i>	Korunmuş teorik protein
CBW19127	-5,3018		Teorik protein
CBW20325	-5,3018		korunmuş teorik protein (psödogen)
CBW18988	-4,9872		korunmuş teorik protein
CBW20338	5,0866		korunmuş teorik protein
CBW19709	3,502		korunmuş teorik protein
CBW16146	4,7757	<i>yaaY</i>	korunmuş teorik protein
CBW17886	-4,0345		korunmuş teorik protein
CBW18850	-4,0345		korunmuş teorik protein
CBW20471	-4,0345		Teorik protein
CBW19987	-4,0334		Teorik varsayımsal protein
CBW20214	-4,0334		Teorik protein
CBW19400	-2,8541	<i>yhcG</i>	Teorik protein



Şekil 4.32 Fonksiyonu bilinmeyen proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

seqA geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen 18 adet mikro RNA tanımlandı. Bunlardan 4 adeti *Salmonella*'da bu çalışma kapsamında tanımlan yeni miRNA'lardır. Bunun dışında tanımlanan 9 miRNA'nın ise hedef genleri bilinmemektedir. Diğer miRNA'lardan transkripsiyon oranı düşenlerin hedef genleri; dimetil adenozin transferaz, metilsitrat sentaz ve molibden kofaktör biyosentez proteini (CCCAATTACCACTTCTTT), ribozomal L7/L12 proteini (TCTGCTGCTGCTGCTGT TGCTG), polinükleotid fosforilaz (ACCTGTTGCTCGCCGC) genleri; transkripsiyon oranı artan miRNA'ların hedef genleri ise, maltodekstrin glukozidaz, potasyum taşıyan ATPaz zinciri ve varsayımsal flagellar bazal-yapı çubuk proteini (TGCCAGCCTCG CCCAGC), sitokrom o ubikinol oksidaz alt birimi II, NADH dehidrojenaz I zinciri k, bakteriyofaj integras, gama-glutamiltanspeptidaz öncüsü, DNA helikaz I süper ailesi genleri (CTGTCCTTTGTGTTC), 8-amino-7-oksononanoat sentaz, GDP-mannoz mannosil hidrolaz, NADH dehidrojenaz I G zinciri ve etonalamın kullanan etanol dehidrojenaz (GCCACGCCCTTCATCGCC, bu çalışmada tanımlanan yeni miRNA türü) ve ferrikrom taşıma proteini FhuB öncüsü (TAGGCCGGATAAGA CGCGT, bu çalışmada tanımlanan yeni miRNA türü), genleri olarak tanımlandı. miR-4486-TGCCAGCCTCGCCCAGC miRNA'nın hedeflediği *flgC* geni ve miR-7238-3p-CTGTCCTTTGTGTTC miRNA'nın hedeflediği *nuoK* geni, *seqA* geni bakımından mutant suşun biyofilm formlarından yapılan

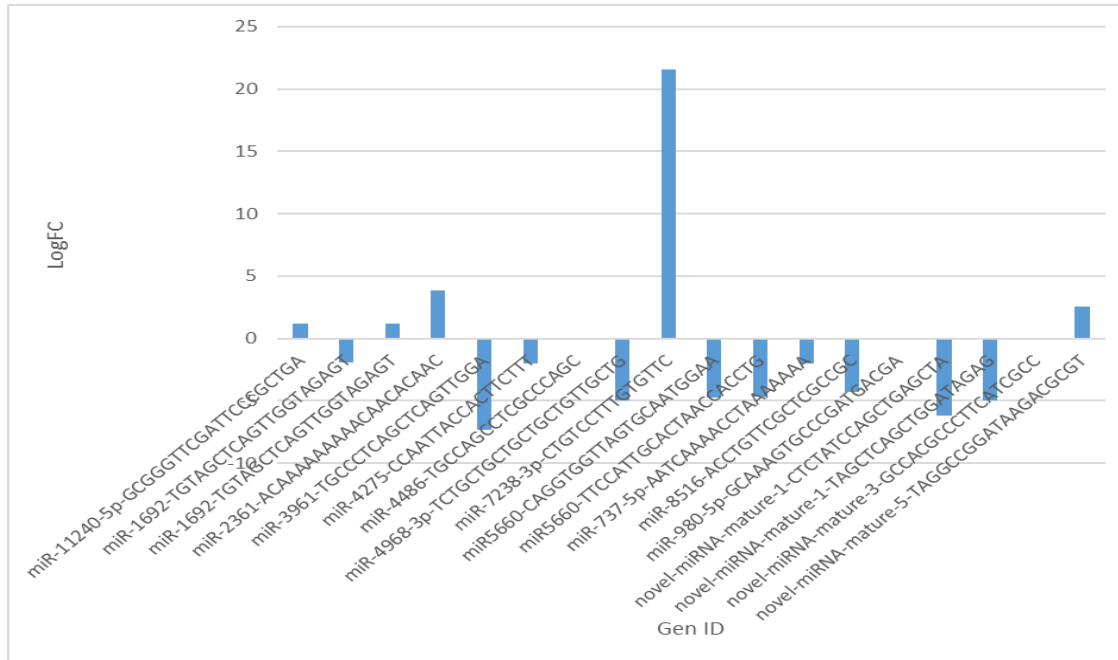
mRNA analizinde de anlamlı olarak artan genlerdir. Bu bakımdan çalışmada miRNA bulguları ile mRNA verileri arasında paralellik bulunmuştur (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.33).

Çizelge 4.14 *seqA* geni bakımından mutant suшта doğal suştan farklı olarak transkribe edilen mikro RNA'ları (miRNA) kodlayan genler

Anlamlı miRNA	Kat Değişimi (Log FC)	Hedef Gen	Hedef Gen Tanımı
miR-11240-5p-GCGGG TTCGATTCCCGCTGA	1,154		
miR-1692-TGTAAGCT CAGTTGGTAGAGT	-1,918		
miR-1692-TGTAAGCT CAGTTGGTAGAGT	1,154		
miR-2361-ACAAAAA AAAACAACACAAC	3,881		
miR-3961-TGCCCTC AGCTCAGTTGGA	-7,314		
miR-4275-CCAATTACC ACTTCTTT	-1,986	<i>ksgA</i>	Dimetiladenozin transferaz
		<i>prpC</i>	Metil sitrat sentaz
		<i>moaC</i>	Molibden kofaktör biyosentez proteini C
miR-4968-3p-TCTGCTG CTGCTGCTGTTGCTG	-4,98	<i>rplL</i>	50S ribozomal alt birim protein L7 / L12
miR5660-CAGGTGGTT AGTGCAATGGAA	-4,749		
miR5660-TTCCATTGC ACTAACCACCTG	-4,659		
miR-737-5p-AATCA AAACCTAAAAAAA	-1,981	SL1344_2696	Teorik bakteriyofaj proteini
miR-8516-ACCTGTTC GCTCGCCGC	-4,321	<i>pnp</i>	Polinükleotid fosforilaz
miR-980-5p-GCAAAG TGCCCGATGACGA	Transkripsiyon oranı arttı	<i>yjbJ</i>	Korunmuş teorik protein
miR-7238-3p-CTGTCC TTTGTGTTC	21,585	<i>cyoA</i>	Sitokrom o ubikinol oksidaz alt birimi II
		<i>nuoK</i>	NADH dehidrojenaz I zinciri k
		SL1344_2709	bakteriyofaj integras
		<i>ggt</i>	Gama-glutamiltranspeptidaz öncüsü
		SL1344_4418	DNA helikaz I süper ailesi

Çizelge 4.14 *seqA* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen mikro RNA'ları (miRNA) kodlayan genler (devam)

Anlamlı miRNA	Kat Değişimi (Log FC)	Hedef Gen	Hedef Gen Tanımı
miR-4486-TGCCAG CCTCGCCCAGC	Transkripsiyon oranı arttı	<i>malZ</i>	Maltodekstrin glukozidaz
		<i>kdpA</i>	Potasyum taşıyan ATPaz A zinciri
		<i>flgC</i>	Flagellar bazal-yapı çubuk proteini FlgC
novel-miRNA-mature-CTC TATCCAGCTGAGCTA	-6,17		
novel-miRNA-mature-1-TA GCTCAGCTGGATAGAG	-4,962		
novel-miRNA-mature-3-GC CACGCCCTTCATCGCC	Transkripsiyon oranı arttı	<i>bioF</i>	8-amino-7-oksononanoat sentaz
		<i>gmm</i>	GDP-mannoz mannosil hidrolaz
		<i>nuoG</i>	NADH dehidrojenaz I zinciri G
		<i>eutG</i>	Etanolamin kullanımı etanol dehidrojenaz EutG
novel-miRNA-mature-5-TA GGCCGGATAAGACGCGT	2,52	<i>fhuB</i>	Ferrikrom taşıma proteini <i>FhuB</i> öncüsü



Şekil 4.33 miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *seqA* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ile onun, homolog bölge rekominasyonu yöntemiyle *seqA* geni çıkarılmış (delesyonlu) mutant suşu kullanılarak; bu suşların olgun biyofilm yapıları arasındaki gen ifadesi, stres yanıtları ve bazı fenotipik değişimler incelendi. Ayrıca bu çalışma kapsamında söz konusu bakterinin biyofilm formları ile mücadelede etkin preparat formülasyonlarının geliştirilmesi gerçekleştirildi. Öncelikle RNA-seq analizleri sonucunda; *seqA* geninin doğrudan ya da miRNA sentezini regüle etmek suretiyle dolaylı bir şekilde, planktonik formlar ile biyofilm formları arasındaki dönüşümün ana regülatörlerinden biri olduğu belirlendi. *S. Typhimurium*'da replikasyon sürecinde DNA tecridi aşamasında görev alan *seqA* gen ürününün, bakteri metabolizmasının ve fizyolojisinin global regülatörleri olduğu ilk kez bu tez kapsamında detaylandırıldı. Biyofilm formlarının yapısal elemanları yanında, fonksiyonu ile ilgili çok sayıda genin *seqA* geninin fonksiyonuna bağlı değişimi, *Salmonella*'da biyofilm oluşumunun temel (ana) regülatörleri olduğuna işaret etmektedir. Yukarıda da ifade edildiği üzere, merkezi metabolizmada yer alan birçok genin regülasyonuna katıldığına da belirlenmesi, biyofilm yapılarına geçisteki büyük metabolik ve fizyolojik değişikliklerin bu genin regülasyonu yolu ile sağlandığının kanıtlarıdır.

seqA mutantında fimbriyal yapılar, pililer ve hareket ile ilişkili genlerin, *sth* fimbriya hariç, transkripsiyon oranının düşmesi; genel anlamda yüzeylerde tutunma, hareket ve eşleşme fonksiyonlarının SeqA proteini varlığında pozitif yönde regüle edildiğine işaret etmektedir. Fare model sistemlerinde kalıcılıkta rol oynadığı belirlenen *sth* fimbriyanın (Weening vd. 2005) sadece major alt ünitesinin *seqA* mutantında transkripsiyon oranının artmasının, *seqA* mutasyonu sonucunda hücrede meydana gelen bütünsel fizyolojik değişimlere uyum için, SthA proteininin, fimbriya üretimi yanında bir ikincil hücresel fonksiyon içerebileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan *stfA/stfE* ve *flgB/flgC* gibi aynı operonda kodlanan fimbriya ve flagella genlerinin, *seqA* mutantında farklı transkrip oranlarında belirlenmesi, söz konusu genlerin mRNA ürünlerinin ilave bir post transkripsiyonel regülasyon geçirdiğini göstermektedir. Bu durum özellikle *flg* operonunda daha önce de tanımlanmıştır (Lee ve Hughes 2006). Yine transkriptom analizinde elde ettiğimiz sonuçlarda, hareketlilikten sorumlu *fljAB* ve *motB* genlerinin ifade seviyesinin azalması ile hareketin büyük ölçüde

engellendiği ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda bu durum, *seqA* mutantında bireysel yüzme (swimming) ve toplu göç hareketlerinin (swarming) her ikisinin de önemli ölçüde engellendiğinin morfolojik testlerle tanımlanması sonucunda desteklenmiştir. Aynı şekilde *curli* fimbriya yanında, selüloz biyosentezinden de dolaylı bir şekilde sorumlu olduğu bilinen *csg* operonu ile ilgili genlerin *seqA* mutantında transkripsiyon oranının düşmesi, kalkoflor bağlanma testi ile bu mutantta tanımlanan selüloz üretimindeki azalmanın nedeni olarak açıklanabilir. Söz konusu mutantta selülözün azalmasına paralel olarak selülaz enzim üretiminin düşmesi de genetik regülasyonun doğal bir sonucu olarak meydana gelmiş olabilir. Tüm bu bulgular *seqA* geninin öncelikle flagellar ve fimbriyal yapıların regülasyonunu gerçekleştirerek biyofilm oluşumunun ilk aşamasına (yüzeye tutunma) müdahale ettiğinin moleküler destekleridir.

seqA mutantında genetik yapının stabilitesi ve ifadesi ile ilişkili genlerden transkripsiyonel ifade değişimleri bakımından en ilginç olanı ekzodeoksiribonukleaz VIII enzimini kodlayan gen için belirlenmiştir. Bu genin transkripsiyonu *seqA* mutantında ciddi bir oranda artmıştır. Bu durum *seqA* geni yokluğunda genetik stabilitenin ciddi bir riske girdiğini ve replikasyon sonrası bir tamir enzimi olan ekzodeoksiribonukleaz VIII üretiminin artırılarak bu duruma yanıt geliştirdiğinin işaretidir (Pietro vd. 2006). Bu mutantta mRNA ribozom 30S alt ünitesi ile ilişkilenebilir. S15 ve 50S alt ünitesinin bileşiminde bulunan ve protein translokasyonunda rol oynayan L36 (Ikegami vd. 2005) protein genlerinin ve IS3 transpozaz genlerinin transkripsiyon oranlarındaki artış ise bozulan genetik stabilite ve elastisiteye karşı geliştirilen hücresel bir yanıtı işaret etmektedir. *seqA* mutantında baskılanan fimbriyal şaperonlar, faj ve plazmid replikasyon proteinleri bu mutantta metabolik yükün azaltılması ile ilişkili regülasyon karakteristiklerinin tipik örneğidir. Bu öngörümüzü destekleyen en önemli bulgu ise, Tip-III salgı sistemini kodlayan SPI 1'in (*Salmonella* Patojenite Adası 1) transkripsiyonel aktivatörü olan *rtsA* geni transkriplerinde belirlenen düşüştür. RtsA regülatörü aynı zamanda dolaylı bir şekilde bakteriyel swimming hareketini de pozitif yönde etkilediği kanıtlanan bir regülatördür (Hamed vd. 2019).

Diğer yandan, *seqA* mutantında ATP, PTS ve MFS taşıma sistemlerinin çok sayıda geninde görülen transkripsiyonun negatif regülasyonu da, bu mutantta metabolik kısıtlama yolu ile çevresel adaptasyonun sağlandığı görüşünü güçlendirmektedir. Taşıyıcı sistemlerle ilişkili

olan ve pozitif yönde regüle edilen genlerin en ilginç örneği ise maltoz regülönü genleri olarak tanımlanmıştır (*lamB*, *malE* ve *malK*). Maltoz regülönü için belirlenen bu durum, *Salmonella*'da besinsel stres yanıtının tipik bir örneğini teşkil etmektedir. Zira, karbon kaynaklarının kullanımındaki sınırlamalar bu bakteride metabolizmanın ikincil karbon kaynaklarına yönlendirilmesine neden olmaktadır (Kenyon vd. 2005).

Salgı sistem proteinleri ve membran proteinleri bakımından değerlendirildiğinde, *seqA* mutandında fonksiyonu in vivo koşullarda tanımlı tek bir genin (kompetens proteinini kodlayan gen) transkripsiyon oranında artış, diğer salgı proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyon oranlarındaki belirgin düşme (özellikle fibril yapı salgı proteinleri ve Tip 1 ve Tip 3 salgı sistem proteinlerini kodlayan genlerde), metabolizmanın *seqA* geninden kaynaklanan stresinin genel bir stres olduğunu tanımlayan önemli bir diğer bulgudur. *Salmonella*'nın özellikle biyofilm oluşumu ve patojen konakçı ilişkilerinde kritik bir role sahip olan salgı sistemlerine ve patojenite adalarına ait birçok genin (Biao vd. 2020) *seqA* mutantında düşük oranda tanımlanan transkripsiyonu, azalan biyofilm üretiminin ve virülansın (Uğur vd. 2018) mekanizmasını açıklamaktadır. *seqA* mutantında doğal suştan farklı ifade edilen en ilginç gen *pagN* geni olmuştur. Transkripsiyon oranı artan bu genin *Salmonella*'da adhezyon ve invazyonda rol aldığı düşünülmekle birlikte (Lambert ve Smith 2008) detaylı fonksiyonel tanısı henüz gerçekleştirilememiştir. Diğer transkripsiyon oranı düşen genler ise veri tabanı analizleri ile tanımlanmış teorik proteinleri kodlamaktadır.

Salmonella'da sinyal transdüksiyonunda rol alan ve özellikle fimriyal, flagellar ve kemotaksi ile ilgili fonksiyonlarda rol alan genlerde belirlenen negatif transkripsiyonel regülasyon, *seqA* mutantında fizyolojik koşullarda tanımlanan hareket azalmasının temel nedeni olarak yorumlanmıştır.

seqA mutantında doğal suştan farklı ifade edilen karbonhidrat metabolizmasında görev alan genlerin transkripsiyonel regülasyon karakteristikleri dikkate alındığında, SeqA proteininin yokluğunda, *ptsG* geninde olduğu gibi, glukoz gibi primer karbon kaynaklarının metabolizmasında rol alan genlerin baskılandığı, bu durumda da organizmanın ikincil karbon kaynaklarına (maltoz, etanol ve propandiol gibi) yöneldiği ortaya çıkmaktadır. Bu durumun, aynı zamanda *Salmonella*'nın konakçı sisteme dahil olduğunda karşılaştığı stres

koşullarına verdiği bir yanıt olduğu değişik çalışmalarda belirlenmiştir (DSteeb vd. 2013, Dandekar vd. 2014, Bumann ve Schorthost 2017). Karbonhidrat metabolizmasında doğal suşa oranla meydana gelen kritik değişimlerin bu mutantta tipik bir fizyolojik karakteristiği olan biyofilm oluşumunun ciddi oranda düşmesinin bir diğer nedenidir.

seqA mutantında enerji metabolizmasında görev alan elektron taşıma sisteminin ana elemanlarını kodlayan genlerin transkripsiyon oralarında meydana gelen genel artış ve tam aksine amino asit merkezi metabolizmasında rol alan genlerin transkripsiyonunda tespit edilen genel azalma, daha önce de ifade edildiği gibi, *seqA* geninde oluşturulan delesyonun, organizmanın metabolizmasında bütünsel bir stres yarattığını açık bir şekilde göstermektedir. Bu mutantta, *Salmonella*'da anaerobik koşullarda üretildiği belirlenmiş olan (Jeter vd. 1984) B12 vitamini sentezine katılan kobinamit kinaz geninin baskılanma durumu, *seqA* mutasyonundan bağımsız olabilir. Zira bu denemede suşlar mikroaerofilik koşullarda üretilmiştir.

Salmonella enfeksiyonunda anahtar rol oynayan ve *seqA* mutantında farklı ifade edilen beş genin (*fljB*, *sipA*, *sipB*, *sseF* ve bir holin geni) yanında *Salmonella* virülanslığında rol aldığı belirlenen tüm genlerin transkripsiyon oranının istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde düşmesi, *seqA* geninin *Salmonella* patojenitesinde merkezi bir rol oynadığına açık bir şekilde işaret etmektedir. Özellikle Tip III salgı sistemi efektörleri olan, *sipA*, *sipB*, *sseF*'nin (Brummell vd. 2001) negatif regülasyonu bunun en önemli kanıtıdır. Diğer yandan biyofilm peroksit direnç proteinini kodlayan genin transkripsiyon oranının düşmesi, *seqA* geninin sadece biyofilm oluşumunda değil aynı zamanda çevresel koşullara direncin kazanılmasında da rol oynadığının ilk kanıtıdır. Tüm bunların dışında transkriptomik veriler, *seqA* geninin *Salmonella*'da fonksiyonel olup olmadığı henüz tanımlanmamış birçok genin regülasyonuna da katıldığını göstermiştir. Bu genlerin fonksiyonel analizleri, bu çalışmadan elde edilen verilerin ileri düzeyde detaylandırılması açısından önem taşımaktadır. Amino asit metabolizmasında görev alan global regülatörlerin varlığının ve bazı stres koşullarında amino asit merkezi metabolizmasında rol oynayan genlerin transkripsiyonunun proteomik ve transkriptomik analizler sonucu büyük ölçüde inhibe edildiğinin tanımlanmış oluşu (Borchert vd. 2020) bu çıkarımımızı desteklemektedir.

seqA mutantında yürütülen transkriptomik analizlerin son aşamasında doğal suştan farklı olarak üretilen miRNA'lar belirlendi. Tespit edilen 18 adet mikro RNA'nın 4 adeti ilk kez bu çalışmada tanımlanan miRNA'lardır. Bunların içerisinde *nuoK* ve *flgC* genlerini hedeflediği belirlenen miRNA'ların transkripsiyon oranlarındaki artış, aynı genlerin mRNA transkriplerindeki artış ile paralellik saptanmıştır. Bu durum söz konusu miRNA'ların *nuoK* ve *flgC* (Flannagan vd. 2009, Lu vd. 2010) genlerinin ürünlerinin posttranskripsiyonel regülasyonunda oynadığı rolü net bir şekilde kanıtlamaktadır.

Transkripsiyon sonrası düzenleyici mekanizmalar, normal bir fizyolojik sürecin (yani hücre duvarı yenilenmesi) uyarılmasıyla sürdürülebilir. Analiz edilen tüm membran proteinlerinin peptidoglikan ile ilişkisinin, *seqA* eksikliğinde anlamlı derecede değişmiş olması gerçeği, temel bir membran fizyolojisi sürecinin değişebileceğini düşündürmektedir. Bakterilerin yüzey aktif maddelerle kaplanan yüzeyler ile temas ettiğinde ön koşullandırmanın hücrelerin yüzeye tutunmasını önlediği bildirilmiştir (Chen 2012, Choi vd. 2011). Benzer bir gözlem, *Pseudomonas fluorescens* biyofilm hücrelerinin % 95'inden fazlasının yaklaşık 0,33 mg/mL CTAB'ye maruz kaldıktan sonra eradikasyonunu saptayan Simoes ve arkadaşları (2010) tarafından da bildirildi. Aynı çalışma grubu 2008'de CTAB'nin bağımsız uygulamasının *P. fluorescens*'in (6 Log CFU / cm²) eradikasyonunda önemli ölçüde etkili olduğunu vurguladı. Bu çalışmada tween-80'e maruz kalan mutant suşların maruz kalan biyofilminde % 70 oranında azalma saptandı. Bu bulgu başka bir gözlemle de desteklendi (Schreiberova vd. 2009). Splendiani ve arkadaşları (2006), *Burkholderia* biyofilminin azaltılması için yirmi iki yüzey aktif maddenin potansiyelini değerlendirmiş ve yüzey aktif maddelerin bakteri negatif yükünü artırabileceğini ve hücrelerin bağlanma kapasitesini azaltabileceğini ortaya çıkarmıştır. CTAB ile muamele edilen *P. fluorescens*'in pozitif yüklü hale geldiği kanıtlanmıştır, bu da CTAB'nin hücreleri negatif yüklü katı yüzeyden çıkarmak yerine yapıştırdığını gösterir (Azeredo vd. 2002). CTAB, hücrelerin yüzey değişikliklerini teşvik etmenin yanı sıra, hücre zarının lipid bileşenlerini de parçalayabilir ve ikincil bir etki olan hücre lizisi olabilir (Gilbert vd. 2002, Simoes vd. 2006). Tez çalışması kapsamında, denemede kullanılan *S. Typhimurium* 14028 doğal suş ve onun *seqA* mutantının antibiyofilm ajanlarına karşı davranışları belirlenmiştir. Nisin ile yürütülen çalışmalarda; 10 mg/mL nisinin kullanımı sonucu, doğal suşta ve onun *seqA* mutantında 72. saatte maksimum antibiyofilm etkinliğine ulaşıldığına işaret etmiştir. Siprofloksasin de nisin gibi en yüksek

etkinliğini 72. saat sonunda göstermiştir. % 97 oranına varan biyofilm etkinliğinin engellenme gücü, oldukça yüksek bir değerdir. Alfa amilaz ilavesi ile doğal suş ve onun *seqA* mutantında 72. saat sonunda % 70 oranına varan inhibisyonu etkinliği gerçekleştirmiştir. Proteinaz-K, siprofloksasin gibi, *S. Typhimurim* doğal suşu ve *seqA* mutantında denenen konsantrasyonların tümünde ve tüm deneme sürelerinde yüksek bir antibiyofilm etkinliği göstermiştir. Söz konusu etkinlik 72. saatte en yüksek seviyelere ulaşmıştır. CTAB doğal suşta, denenen tüm konsantrasyonlarda yüksek bir antibiyofilm aktivitesine sahipken, *seqA* mutantında bu aktiviteyi sürdürememiştir. 72. saatte *seqA* mutantında gözlenen antibiyofilm aktiviteleri doğal suşa oranla düşük bir şekilde gerçekleşmiştir. 24. ve 48. saatlerde bazı konsantrasyonlarda biyofilm miktarında artış belirlenmiştir. EDTA denenen tüm konsantrasyonlarda ve tüm suşlarda yüksek antibiyofilm etkinliği gösterdi. Benzer etkinlikler SDS için de tanımlandı. Tween 80 denenen tüm suşlarda 72. saatte diğer antimikrobiyallerden düşük de olsa antibiyofilm etkinliği gösterdi. Ancak diğer inkübasyon süreleri ve konsantrasyonlarda söz konusu etki sabit bir durum arz etmedi. 1 mg/mL nisin + 10 mM EDTA + 5 µg/mL CIP kombinasyonu nisin ile hazırlanan kombinasyonlar içerisinde en etkin antibiyofilm konsantrasyonu olarak belirlendi. Bu konsantrasyonlar çevreci ve tüketici sağlığı açısından herhangi bir zararlı etkinin meydana gelmediği konsantrasyonlardır. Zira söz konusu konsantrasyonların daha yüksek oranları gıda korumasında, bu ajanlarla tek tek yapılan muamelelerde kullanılmaktadır. Bu proje kapsamında geliştirilen kombinasyonlar *Salmonella* biyofilmlerinin etkili bir şekilde engellenmesi için potansiyel arz etmektedir. Gerçek etkinliklerinin ve ticari kullanım olanaklarının belirlenebilmesi için endüstriyel uygulamalara geçilmesi gerekmektedir. SeqA proteini üretimi engellenmiş mutantlarında biyofilm etkinliğinin yüksek derecede düşmesinin moleküler mekanizmalarla kanıtlanması, biyofilm yapıları ile mücadelede SeqA inhibitörlerinin kullanılabileceğini açık bir şekilde göstermektedir. Bu alternatif antibiyofilm stratejilerine ışık tutması, çalışmanın uygulama boyutundaki yenilikçi yanını ve yaygın etki potansiyelini tanımlamaktadır.

Son olarak glukoz ve safra tuzlarının *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumu üzerindeki inhibisyonu etkisinin belirlenmesi, biyofilm oluşumu ile çevresel metabolitlerin konsantrasyonları arasındaki ilişkiye yeni boyutlar kazandıracak nitelik taşımaktadır. Safra tuzu stresine bağlı olarak biyofilm miktarlarının denenen tüm suşlarda düşmesi, özellikle

Salmonella'nın konak sisteme dahil olduğunda safra stresine bağlı olarak biyofilm üretimini tetiklediği öngörüsünü çürütmektedir. *seqA* geninin bozulmasıyla ilişkili safra duyarlılığının nedeni bilinmemektedir. *S. Typhimurium* enfeksiyonun bağırsak aşamasında gerileyebileceğini, yapılan çalışmalar doğrultusunda *seqA* mutantlarının safra duyarlılığından kaynaklanabileceğini ve bunun da membran kararsızlığının bir sonucu olabileceğini varsayıyoruz. *E. coli*'de *seqA* mutantları, çeşitli boyalara karşı artan duyarlılıklarını açıklayabilen, değiştirilmiş membran geçirgenliği (Wegrzyn vd. 1999) ve anormal fosfolipid bileşimi (Daghfous vd. 2006) gösterir. *S. Typhimurium seqA* mutantlarının hücre zarının da aynı şekilde kararsız olduğuna dair gözlemimiz, safra duyarlılığı ile geçici olarak ilişkilendirilebilir, çünkü konjuge olmayan safra tuzları difüzyon yoluyla hücreye girebilir (Thanassi vd. 1997). *E. coli*'de, *seqA*'nın *E. coli* dış membranı ile replikasyon döngüsüne bağlı bir şekilde birleştiği gösterilmiştir (Slater vd. 1995). Bu nedenle, *seqA*'nın hücre zarı stabilitesindeki yapısal rolü ve aynı zamanda membran stabilitesine dahil olan genlerin ekspresyonunu düzenleyebileceğine işaret etmektedir (Strzelczyk vd. 2003, Wegrzyn vd. 1999). Diğer yandan glukoz stresinin de biyofilm üzerinde inhibisyonu etkisi yaratması, tüm çevresel stres koşullarının biyofilm oluşumunu tetiklemeyeceğinin açık kanıtlarıdır. Özellikle şeker konsantrasyonunun bu beklenmedik etkisi biyofilm yapılarından korunmada yeni yaklaşımların geliştirilmesi için bir hareket noktası oluşturabilir.

Tez çalışmasında, *S. Typhimurium* 14028 *seqA* mutant suşlarında biyofilm etkinliğinin düşmesinin ana nedeninin flagella, hareket, iki elemanlı sistem regülatörleri, transkripsiyonel regülatörler, karbonhidrat metabolizması, amino asit metabolizması, membran ilişkili yapısal, taşıyıcı proteinler ve diğer ekzoenzimler yanında DNA stabilitesi ile ilişkili genlerin transkripsiyonel ya da posttranskripsiyonel regülasyonunun değişimi olduğu belirlenmiştir. *seqA* geni; çoğu *Salmonella*'nın merkezi metabolizmasında rol alan birçok genin pozitif ya da negatif regülatörü olarak işlev görmektedir. Bu durum *seqA* geninin sadece biyofilm yapıları için bir ana regülatör olmadığını, aynı zamanda *Salmonella* merkezi metabolizmasının da global regülatörü olduğunu kanıtlamaktadır. Bu açıdan çalışma bulguları orijinaldir ve bilime katkı değeri taşımaktadır. Bu bulgular ayrıca, biyofilm oluşumunun engellenmesi amacıyla yürütülecek tıbbi ve endüstriyel uygulamalara yeni bir

boyut kazandırması ile de ciddi bir uygulama potansiyeli yaratmaktadır. SeqA inhibitörlerinin bu doğrultuda kullanım olanaklarının araştırılması önemlidir.

Diğer yandan bu çalışmada geliştirilen ve biyofilm oluşumuna karşı yüksek etkinlik gösteren nisin ile kombine edilmiş gıda düzeyli ajan karışımları tıbbi ve endüstriyel antibiyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere, endüstriyel boyutta denemeler için hazır durumdadır. Söz konusu kombinasyonlardaki antibiyofilm ajanlarının ucuz ve kolay bulunabilir oluşu, çevre ve insan sağlığı için ciddi riskler arzeden *Salmonella* biyofilmlerinin engellenmesinde denenmesinin önemine işaret etmektedir.



KAYNAKLAR

- Ahmad, I., Rouf, S.F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Guyon, S.L., Schottkowski, M., Rhen, M., Römling, U. 2016. *BcsZ* inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Cell Factories*, 15, 177.
- Aloui, A. Mihoub, M., Sethom, M.M., Chatti, A., Feki, M., Kaabachi, N., Landoulsi, A. 2010. Effects of *dam* and/or *seqA* mutations on the fatty acid and phospholipid membrane composition of *Salmonella enterica* Sero var Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 573-583.
- Althouse, C., Patterson S., Fedorka-Cray, P., Isaacson, R.E. 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity*, 71(11), 6446-52.
- Arnold, J.W. ve Silvers, S. 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poult Science*, 79(8), 1215-21.
- Azeredo, J., Pacheco, A. P., Lopes, I., Oliveira, R., Vieira, M. J. 2002. Monitoring cell detachment by surfactants in a parallel plate flow chamber. In *Proceedings of the International Specialised Conference on Biofilm Monitoring*, Porto, 62-65.
- Bach, T., Krekling, M.A. ve K. Skarstad. 2003. Excess *seqA* prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division. *EMBO Journal*, 22, 315-323.
- Bae, S.H., Cheong, H.K., Cheong, C., Kang, S., Hwang, D.S., Choi, B.S. 2003. Structure and dynamics of hemimethylated GATC sites: implications for DNA-*seqA* recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 14, 278(46), 45987-93.
- Balbontín, R., Rowley, G., Pucciarelli, M.G., López-Garrido, J., Wormstone, Y., Lucchini, S., García-Del Portillo, F., Hinton, J.C., Casadesús, J. 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8160-8.
- Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L., Charkowski, A.O. 2007. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 1083-1091.
- Baumgartner, J., Murcott, S., & Ezzati, M. 2007. Reconsidering 'appropriate technology': the effects of operating conditions on the bacterial removal performance of two household drinking-water filter systems. *Environmental Research Letters*, 2, 024003.
- Baumler, A., Kusters, J.G., Stojiljkovic, I., Heffron, F. 1994. *Salmonella* Typhimurium loci involved in survival within macrophages. *Infection and Immunity*, 62, 1623-1630.

- Begley, M., Gahan, C., Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*, 29, 625–651.
- Biao, H., Wang, S., Zhao, J-H., Liu, S-L. 2020. *Salmonella* secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. *Microbiological Research*, 241, 126-136.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J., Groisman, E.A. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 181, 998-1004.
- Blanc, P.D., Jarvholm, B., Toren, K. 2015. Prospective risk of rheumatologic disease associated with occupational exposure in a cohort of male construction workers. *The American Journal of Medicine*, 128, 1094–101.
- Bolker, M. ve Kahmann, R. 1989. The *Escherichia coli* regulatory protein OxyR discriminates between methylated and unmethylated states of the phage Mu mom promoter. *EMBO Journal*, 8, 2403–2410.
- Borchert, A.J., Walejko, J.M., Le Guennec, A., Ernst, D.C., Edison, A.S., Downs, D. 2020. Integrated metabolomics and transcriptomics suggest the global metabolic response to 2-Aminoacrylate stress in *Salmonella enterica*, *Metabolites*, 10, 12-24.
- Borukhov, S. ve Nudler, E. 2003. RNA polymerase holoenzyme: Structure, function and biological implications. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 93–100.
- Boye, E. ve Lobner-Olesen, A. 1990. The role of Dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell*, 62, 981–989.
- Braaten, B.A., Nou, X., Kaltenbach, L.S., Low, D.A. 1994. Methylation patterns in pap regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell*, 11, 76(3), 577-88.
- Brendler, T. ve Austin, S. 1999. Binding of *seqA* protein to DNA requires interaction between two or more complexes bound to separate hemimethylated GATC sequences. *EMBO Journal*, 18, 2304-2310.
- Brendler, T., Sawitzke, J., Seerguev, K., Austin, S. 2000. A case for sliding *seqA* tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. *EMBO Journal*, 19, 6249-6258.
- Brooks, J.D. ve Flint, S.H. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science ve Technology*, 43: 2163-2176.
- Brumell JH, Tang P, Mills SD, Finlay BB. 2001. Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Salmonella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic*, 2:643–653.
- Bumann, D. ve Schorthorst, J. 2017. Intracellular *Salmonella* metabolism. *Cellular Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/cmi.12766>.

- Burgos, M.J.G., Lopez, R.L., Aguayo, M.D.C.L., Pulido, R.P., Galvez, A. 2013. Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides. *Food Control*, 30, 214-221.
- Camara, M., Williams, P., Winzer, K. and Chan, W.C. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences*, 362(1483), 1119-34.
- Campbell, J. ve L., Kleckner N., 1990. *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from Dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell*, 62, 967-979.
- Casadesus, J. ve Low, D. 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 830-856.
- Casadesus, J. ve Low, D. A. 2013. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 13929-13935.
- Charlebois, A., Jacques, M., Archambault, M. 2016. Comparative transcriptomic analysis of *Clostridium perfringens* biofilms and planktonic cells. *Avian Pathology*, 45(5), 593-601.
- Chatti, A., Daghfous, D., Landoulsi, A. 2008. Effect of repeated in vivo passage (in mice) on *Salmonella* Typhimurium *dam* mutant virulence and fitness, *Pathologie Biologie*, 56, 121-124.
- Chatti, A., Aloui, M., Tagourti, J., Mihoub, M., Landoulsi, A. 2014. Novobiocin sensitivity of *Salmonella* Typhimurium *dam* and/or *seqA* mutants. *Polish Journal of Microbiology*, 63, 51-56.
- Chen, G. 2012. *Escherichia coli* adhesion to abiotic surfaces in the presence of non-ionic surfactants. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 17, 2131-2139.
- Chessa, D., Dorsey, C.W, Winter, M., Bäumlér, A.J. 2008. Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 28, 283(13), 8118-24.
- Choi, N.C., Park, S.J., Lee, C.G., Park, J.A., Kim, S.B. 2011. Influence of surfactants on bacterial adhesion to metal oxide-coated surfaces. *Environmental Engineering Research*, 16, 219-225.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connorb, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican M. 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (4), 1507-1514.

- Correnti, J., Munster, M., Chan, T. and van der Woude, M. 2002. Dam-dependent phase variation of Ag43 in *Escherichia coli* is altered in a *seqA* mutant. *Molecular Microbiology*, 44, 521-532.
- Costerton, J. W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318–1322.
- Crump, J.A., Luby, S.P., Mintz, ED. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346-53.
- Çiftçi, Z. 2005. Kronik tonsillitte biofilmin rolü. Uzmanlık Tezi, T. C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, İstanbul.
- Daghfous, D., Chatti, A., Marzouk, B., ve Landoulsi, A. 2006. Phospholipid changes in *seqA* and *dam* mutants of *Escherichia coli*. *Comptes Rendus Biologies*. 329, 271-276.
- Dandekar, T., Fieselmann, A., Fischer, E., Popp, J., Hammsel, M., Noster, J. 2014. *Salmonella* how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 29, 1-12.
- Davey, M. E. ve O'Toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847–867.
- Denef, V.J., Kalnejais, L.H., Mueller. R.S., Wilmes, P., Baker, B.J., Thomas, B.C., VerBerkmoes, N.C., Hettich, R.L., Banfield, J.F. 2010. Proteogenomic basis for ecological divergence of closely related bacteria in natural acidophilic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 9, 107 (6), 2383-2390.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A.R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50:930–936.
- Donabedian, H. 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *Journal of Infections*, 46(4), 207-14.
- Donlan, R.M. ve Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- DSteeb, B., Claudi, B., Burton, N. A., Tienz, P., Schmidt, A., Farhan, H., Bumann, D. 2013. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003301.
- Dubnau, D. ve Losick, R. 2006. Bistability in bacteria, *Molecular Microbiology*, 61, 564-572.

- Espeli, O., Mercier, R., Boccard, F. 2008. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Molecular Microbiology*, 68, 1418-1427.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC, 2020.
- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala J. 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 11978–11982.
- Ferrieres, L., Hancock, V., Klemm, P. 2007. Specific selection for virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation. *Federation of European Microbiological Societies Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), 212-9.
- Fey, P.D. ve Olson, M.E. 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*, 5(6), 917-33.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., Grinstein, S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology* 7, 355–366.
- Fraud, S., Maillard, J.Y., Denyer, S.P., Kaminski, M.A., Hanlon, G.W. 2007. A simulated oral hygiene model to determine the efficacy of repeated exposure of amine oxide on the viability of *Streptococcus mutans* biofilms. *European Journal of Oral Sciences*, 115(1), 71-6.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176, 269–275.
- Gabrielian, A. ve Bolshoy, A. 1999. Sequence complexity and DNA curvature. *Computers & Chemistry*, 23, 263–274.
- García-del-Portillo, F., Pucciarelli, M. G., Casadesús, J. 1999. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella* Typhimurium are deficient in protein secretion, cell invasion and M cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 11584–11588.
- Giaouris, E., Heir, E., Hebraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Moretro, T. 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97, 298-309.
- Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J. 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms influx cross-resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 98S-110S.

- Gonzalez-Escobedo, G., Marshall, J.M., Gunn, J.S. 2011. Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: Understanding the carrier state. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 9–14.
- Govan, J.R., Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Reviews*, 60(3), 539-74.
- Görs, S., Schumann, R., Häubner, N., & Karsten, U. 2007. Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll a as biomarkers. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(1), 50–59.
- Groisman, E.A. ve Ochman, H. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiology*, 5, 343-349.
- Grzymski, J.J., Murray, A.E., Campbell, B.J., Kaplarevic, M., Gao, G.R., Lee, C., Daniel, R., Ghadiri, A., Feldman, R.A., Cary, S.C. 2008. Metagenome analysis of an extreme microbial symbiosis reveals eurythermal adaptation and metabolic flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 17516-17521.
- Gunn, J.S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection* 2, 907–913.
- Hamed, H., Wang, X., Shawky, R. M., Emara, M., Aldridge, P. D., Rao, C. V. 2019. Synergistic action of SPI-1 gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium through transcriptional crosstalk with the flagellar system, *BMC Microbiology*, 19, 211.
- Hattman, S., Brooks, J.E., Masurekar, M. 1978. Sequence specificity of the P1 modification methylase (M.Eco P1) and the DNA methylase (M.Eco *dam*) controlled by the *Escherichia coli dam* gene. *Journal of Molecular Biology*, 126,367–380.
- Hayward, M.R., Jansen, V.A., Woodward, M.J. 2013. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. *BMC Genomics*, 14, 1.
- Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., Mahan, M.J. 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science*, 7, 284(5416), 967-70.
- Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 478-503.
- Heusipp, G., Falker, S., Schmidt, M.A. 2007. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 1-7.
- Hiraga, S., Ichinose, C., Niki, H., Yamazoe, M. 1998. Cellcycle-dependent duplication and bidirectional migration of *seqA*-associated DNA–protein complexes in *E. coli*. *Molecular Cell*, 1, 381–387.

- Hodgman, T.C. 2000. A historical perspective on gene/protein functional assignment. *Bioinformatics*, 16, 10–15.
- Hohmann, E.L. 2001. Non-typhoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 263–269.
- Ikegami, A., Nishiyama, K-I., Matsuyama, S-I., Tokuda, H. 2005. Disruption of *rpmJ* encoding ribosomal protein L36 decreases the expression of *secY* upstream of the *spc* operon and inhibits protein translocation in *Escherichia coli*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69: 1595-1602.
- Ishii, S., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T.M., Tenney, A., Chain, P.S., Scholz, M.B., Nealson, K.H., Bretschger, O. 2013 A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer. *Nature Communications*, 4, 1601.
- Islam, M.T., Oishi, A., Machida, C., Ogura, A., Kin, S., Honjoh, K.I. 2014. Combined effects of selected food additives on adhesion of various foodborne pathogens onto microtiter plate and cabbage leaves. *Food Control*, 46, 233-241.
- Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L., Shirtliff, M.E. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 26-59.
- Jahid, I. K. ve Ha, S. D. 2012. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*, 21, 299-316.
- Jakomin, M., Chessa, D., Baumler, A.J., Casadesus, J. 2008. Regulation of the *Salmonella enterica* *std* fimbrial operon by DNA adenine methylation, SeqA, and HdfR. *Journal of Bacteriology*, 190, 7406–7413.
- Javaherdashti, R. 2011. Impact of sulphate-reducing bacteria on the performance of engineering materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1507-17.
- Jayaraman, A., Wood, T.K. 2008. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *The Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 145-67.
- Jeter, R.M., Olivera, B.M., Roth, J.R. 1984. *Salmonella* Typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B12) de novo under anaerobic growth conditions. *Journal of Bacteriology*, 159, 206-213.
- Johansen, C., Falholt, P., Gram, L. 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3724-8.
- Joseph, B., Otta, S.K., Kraunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 367-372.

- Julio, S.M., Heithoff, D.M., Provenzano, D., Klose, K.E., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., Mahan, M.J. 2001. DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 69(12):7610-5.
- Kahlmeter, G., ECO.SENS. 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 69-76.
- Kanhere, A. ve Bansal, M. 2005. Structural properties of promoters: similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 33,3165–3175.
- Kang, S., Lee, H., Han, J.S., Hwang, D.S. 1999. Interaction of SeqA and Dam methylase on the hemimethylated origin of *Escherichia coli* chromosomal DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11463-8.
- Karatan, E. ve Watnick, P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 310-347.
- Kenyon, W.J., Thomas, S.M., Johnson, E., Pallen, M.J., Spector, M.P. 2005. Shifts from glucose to certain secondary carbon-sources result in activation of the extracytoplasmic function sigma factor σ^E in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 151, 2373-2383.
- Kidner, C.A. ve Martienssen, R.A. 2005. The developmental role of microRNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), 38-44.
- Klungsoyr, H.K. ve Skarstad, K. 2004. Positive supercoiling is generated in the presence of *Escherichia coli* SeqA protein. *Molecular Microbiology*, 54, 123-131.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the post- antibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3.
- Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, S.K., Hammarlöf, D.L., Canals, R., Grissom, J.E., Conway, T., Hokamp, K., Hinton, J.C.D. 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe*, 14:683–695.
- Kuramitsu, H.K., Qi, M., Kang, I.C., Chen, W. 2001. Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Annals of Periodontology*. 6(1), 41-7.
- Lacks S. ve Greenberg B. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology* 114, 153–168.

- Lambert, M.A. ve Smith, S.G.J. 2008. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasion. BMC Microbiology, 8, 142-153.
- Lange, R. ve Hengge-Aronis, R. 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 5, 49–59.
- Lasa, I., ve Penades, J. R. 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Research Microbiology, 157, 99-107.
- Ledeboer, N.A. ve Jones, B.D. 2005. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. The Journal of Bacteriology, 187(9), 3214-3226.
- Lee, D.G., Park S.J., Kim, S.J. 2007. Influence of pipe materials and VBNC cells on culturable bacteria in a chlorinated drinking water model system. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(9), 1558-62.
- Lee, S., Hayashi, H., Mastuzaki, H. 2017. Silicosis and autoimmunity. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 17:78–84.
- Lindsay, D. ve von Holy, A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. The Journal of Hospital Infection, 64(4), 313-25.
- Lobner-Olesen, A., Marinus, M.G., Hanssen, F.G. 2003. Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 4672-4677.
- Lobner-Olesen, A., Skovgaard, O., Marinus, M.G. 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. Current Opinion in Microbiology, 8(2), 154-160.
- Low, D.A., Weyand, N.J., Mahan, M.J. 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. Infection and Immunity, 69(12):7197-204.
- Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E., Kleckner, N. 1994. SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. Cell, 77, 413-426.
- Lu, L.F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.L., Taganov, K.D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D., Rudensky, A.Y. 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. Cell, 142, 914–929.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11, 133-147.

- Marcinkiewicz, J. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is a potent inducer of phagocyte hyperinflammation. *Inflammation Research*, 68(4).
- Mattick, J.S. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56, 289-314.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 25, 413(6858), 852-6.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. 2011. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 28, 10(1), 39-50.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607–25.
- Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S., Jensen, B.B. 2004. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3485-92.
- Miller, F.W., Alfredsson, L., Costenbader, K.H. 2012. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a national institute of environmental health sciences expert panel workshop. *The Journal of Autoimmunity*, 39, 259–71.
- Mizan, M. F. R., Jahid, I. K., & Ha, S. D. 2015. Microbial biofilms in seafood: a foodhygiene challenge. *Food microbiology*, 49, 41-55.
- Moretro, T., Vestby, L.K., Nesse, L., Hannevik, S., Kotlarz, K., Langsrud, S. 2009. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1005-1012.
- Morgan, E., Bowen, A.J., Carnell, S.C., Wallis, T.S., 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), 1524-33.
- Morgan, E., Campbell, J.D., Rowe, S.C., Bispham, J., Stevens, M.P., Bowen, A.J., Barrow, P.A., Maskell, D.J., Wallis, T.S. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 54(4), 994-1010.

- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A., Foster, K.R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *Public Library of Science Biology*, 6, e14.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Foster, K.R. 2009. The sociobiology of biofilms. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 33(1), 206-24.
- Nicholson, B. ve Low, D. 2000. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 35, 728–742.
- Novick, R.P. ve Muir, T.W. 1999. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2(1), 40-5.
- Ogden G. B., Pratt M. J., Schaechter M. 1988. The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell*, 54, 127-135.
- Ohl, M.E. ve Miller, S.I. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259-74.
- Olivares-Zavaleta N, Jauregui R, Merino E. 2006. Genome analysis of *Escherichia coli* promoter sequences evidences that DNA static curvature plays a more important role in gene transcription than has previously been anticipated. *Genomics*, 87, 329–337.
- Oulahal, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., ve Blum, L.J. 2004. Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to “*Escherichia coli* milk” and “*Staphylococcus aureus* milk” biofilms. *Biofilms*, 1, 65–73.
- Ovri, J., Okeahialam, S., Onyemaobi, O. 2013. Microbial corrosion of mild and medium carbon steels” *Journal of Engineering Science and Technology*, 8, 639-653.
- O'Toole, G.A. ve Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- Park, J. H., Lim, J. G., Choi, S. H. 2015. Effects of elevated intracellular cyclic di-GMP levels on biofilm formation and transcription profiles of *Vibrio vulnificus*. *Food Science and Biotechnology*, 24, 771-776.
- Perez-Rodriguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., Zurera, G. 2008. Understanding and modeling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 131-144.
- Pietro, A.I., Ramos-Morales, F., Casadesus, J. 2006. Repair of DNA Damage Induced by Bile Salts in *Salmonella enterica*. *Genetics*, 174: 575-58.

- Pratt, L.A., Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *E. coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I Pili. *Molecular Microbiology*, 30, 285-293.
- Pritchard C.C., Kroh E., Wood B., Arroyo J.D., Dougherty K.J., Miyaji M.M., et al. 2012. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prevention Research*, 5, 492–497.
- Prouty, A.M. ve Gunn, J.S. 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity* 68, 6763–6769.
- Prouty, A.M. ve Gunn, J.S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 71, 7154–7158.
- Prouty, A.M., Brodsky, I.E., Manos, J., Belas, R., Falkow, S., Gunn, J.S. 2004. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology Reviews* 41:177–185.
- Radman, M., Wagner, R. 1986. Mismatch repair in *Escherichia coli*. *The Annual Review of Genetics* 20, 523–538.
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D. and Young, J.M. 2005. Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 417-23.
- Reyes, K. ve Zervos, 2013. M. Endocarditis caused by resistant enterococcus: an overview. *Current Infectious Disease Reports*, 15(4), 320-8.
- Rice, D.H., Hancock, D.D., Roozen, P.M., Szymanski, M.H., Scheenstra, B.C., Cady, K.M. 2003. Household contamination with *Salmonella enterica*. *Emerging Infectious Diseases*. 9, 120–2.
- Ricke, S.C. 2003. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella enteritidis* colonization in molting hens. *Journal of Poultry Science*, 82(6), 1003-7.
- Roberts, D., Hoopes, B.C., McClure, W.R., Kleckner, N. 1985. IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell*, 43(1), 117-30.
- Sabbagh, S.C., Forest, C.G., Lepage, C., Leclerc, J.M., Daigle, F. 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 305, 1–13.

- Sandoe, J.A., Witherden, I.R., Au-Yeung, H.K., Kite, P., Kerr, K.G., Wilcox, M.H. 2002. Enterococcal intravascular catheter-related bloodstream infection: management and outcome of 61 consecutive cases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 577-82.
- Schreiberova, O., Hedbavna, P., Cejkova, A., Jirku, V., Masak, J. 2009. Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants. *New Biotechnology*, 30, 62-68.
- Sengupta, C., Ray, S., Chowdhury, R. 2014. Fine tuning of virulence regulatory pathways in enteric bacteria in response to varying bile and oxygen concentrations in the gastrointestinal tract. *Gut Pathogens*, 6, 38.
- Shi, X. M. ve Zhu, X. N. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 407-413.
- Simoes, M., Pereira, M.O., Machado, I., Simoes, L.C., Vieira, M.J. 2006. Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 741-749.
- Simoes, M., Simoes, L. C., Vieira, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 573-583.
- Simoes, L.C., Lemos, M., Pereira, A.M., Abreu, A.C., Saavedra, M.J., Simoes, M. 2011. Persister cells in a biofilm treated with a biocide, *Biofouling*, 27, 4, 403-411.
- Sistrunk, J.R., Nickerson, K.P., Chanin, R.B., Rasko, D.A., Faherty, C.S. 2016. Survival of the fittest: how bacterial pathogens utilize bile to enhance infection. *Clinical Microbiology Reviews* 29, 819–836.
- Skarstad, K., Lueder, G., Lurz, R., Speck, C., Messer, W. 2000. The *Escherichia coli* SeqA protein binds specifically and cooperatively to two sites in hemimethylated and fully methylated *oriC*. *Molecular Microbiology*, 36, 1319–1326.
- Slater, S., Wold, S., Lu, M., Boye, E., Skarstad, K., Kleckner, N. 1995. *E. coli* SeqA protein binds *oriC* in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication and origin sequestration. *Cell*, 82, 927-936.
- Slominska, M., G. Konopa, J. Ostrowska, B. Kedzierska, G. Wegrzyn, and A. Wegrzyn. 2003. SeqA-mediated stimulation of a promoter activity by facilitating functions of a transcription activator. *Molecular Microbiology* 47, 1669-1679.
- Splendiani, A., Livingston, A.G., Nicoletta, C. 2006. Control membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 15-23.
- Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S.D. 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.

- Srivatsan, A. ve Wang, J.D. 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 100-5.
- Stepanović, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Sternberg, N. 1985. Evidence that adenine methylation influences DNA-protein interactions in *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, 164, 490–493.
- Strzelczyk, B., Slominska-Wojewodzka, M., Wegrzyn, G., Wegrzyn, A. 2003. Non- random distribution of GATC sequences in regions of promoters stimulated by the SeqA protein of *Escherichia coli*. *Acta Biochimica Polonica*, 50, 941-945.
- Syne, S., Ramsubhag, A., Adesiyun, A. 2013. Microbiological hazard analysis of ready- to-eat meats processed at a food plant in Trinidad. West Indies. *Infection Ecology and Epidemiology*, 20450.
- Takeuchi, A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. *The American Journal of Pathology*, 50, 109-119.
- Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G. M. 2013. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnology Journal*, 8, 97-109.
- Thanassi, D.G., Bliska, J.B., Christie, P.J. 2012. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: Diversity in structure and function. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 36:1046–1082.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*. 179, 2512-2518.
- Torreblanca, J. ve Casadesus, J. 1996. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella* Typhimurium and a novel *dam*-regulated locus. *Genetics*, 144, 15–26.
- Torreblanca, J., Marques, S., Casadesus, J. 1999, Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation. *Genetics*, 152, 31–45.
- Turakhia, M.P., Varosy, P.D., Lee, K., Tseng, Z.H., Lee, R., Badhwar, N., Scheinman, M., Lee, B.K., Olgin, J.E. 2007. Impact of renal function on survival in patients with implantable cardioverter-defibrillators. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 30(3), 377-84.
- Uğur, S., Akçelik, N., Fatma Neslihan, Y., Taşkale Karatug, N., Akçelik, M. 2018. Effects of *dam* and *seqA* genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Pathogens and Global Health*, 112, 368–377.

- van den Brandhof, W.E., van Pelt, W., Wagenaar, J.A., van Duynhoven, Y.T.H.P. 2003. Study on the sources of human campylobacteriosis and salmonellosis in the Netherlands. *Infectieziekten Bulletin*, 14, 132–5.
- van der Woude M., Braaten, B., Low, D. 1996. Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* 4, 5–9.
- van Velkinburgh, J.C. ve Gunn, J.S. 1999. PhoP-PhoQ-regulated loci are re-quired for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 67, 1614-1622.
- Vázquez-Torres, A. 2018. Less Is Best in the Convergent Evolution of Typhoidal *Salmonella*. *Cell Host Microbe*, 14, 23(2), 151-153.
- Vestby, L.K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5(20), 1-6.
- Vogel, L., Sloos, J.H., Spaargaren, J., Suiker, I., Dijkshoorn, L. 2000. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 36(2), 139-41.
- Wall, P.G., Morgan, D., Lamden, K., Griffin, M., Threlfall, E.J., Ward, L.R. 1995. Transmission of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium from cattle to man. *Veterinary Record*, 136, 591–2.
- Wang, H.H., Ye, K.P., Zhang, Q.Q., Dong, Y., Xu, X.L., Zhou, G.H. 2013. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Control*, 32, 650-658.
- Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., Zhou, G. 2016. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 298-304.
- Weening, E., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M., Baumler, A.J.B. 2005. The *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infection and Immunity*, 73, 3358-3366.
- Wegrzyn, A., B. Wrobel, and G. Wegrzyn. 1999. Altered biological properties of cell membranes in *Escherichia coli* *dnaA* and *seqA* mutants. *Molecular Genetics & Genomic*, 261, 762-769.
- Weitao, T., Nordstrom, K., and Dasgupta, S. 1999. Mutual suppression of *mukB* and *seqA* phenotypes might arise from their opposing influences on the *Escherichia coli* nucleoid structure. *Molecular Microbiology*, 34, 157–168.

- Wesley, S.B., Maurya, D.P., Goyal, H.S., Negi, S. 2013. Experimental investigation of microbiologically influenced corrosion of selected steels in sugarcane juice environment. *The World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(12), 2353-7.
- White, A.P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W., Surette, M.G. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J. Bacteriol*, Vol. 188; pp. 3219- 3227.
- Williamson K., Richards L., Osorio A., Pitts B., McInnerney K., Stewart P.S., and Franklin M.J. 2012. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *The Journal of Bacteriology*, 194, 2062-2073.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., Galyov, E.E. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular Microbiology*, 29, 883–891.
- Woodward, M.J., Sojka, M., Sprigings, K.A., Humphrey, T.J. 2000. The role of sef14 and sef17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *The Journal of Medical Microbiology*, 49, 481-487.
- Xu, H., Lee, H.Y., Ahn, J. 2010. Growth and virulence properties of biofilm-forming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under different acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7910-7917.
- Yamada, T., Alpers, D.H., Owyang, C., Powell, D.W., and Silverstein, F.E. 1995. Textbook of gastroenterology. Joshua Ballinger Lippincott, 1606–1629.
- Yamazoe M., Adachi S., Kanaya S., Ohsumi K., Hiraga S. 2005. Sequential binding of SeqA protein to nascent DNA segments at replication forks in synchronized cultures of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 55, 289-298.
- Yang, X., Wu, Q., Zhang, J., Huang, J., Guo, W., Cai, S. 2015. Prevalence and Characterization of Monophasic *Salmonella* Serovar 1,4,[5],12:i:- of Food Origin in China. *PLOS ONE* 10(9), e0137967.