

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salmonella TYPHIMURIUM *dam* MUTANTLARINDA BİYOFİLM
REGÜLASYONUNUN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ

Selma KEÇELİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Salmonella TYPHIMURIUM *dam* MUTANTLARINDA BİYOFİLM REGÜLASYONUNUN TRANSKRİPTOMİK ANALİZİ

Selma KEÇELİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *dam* geni delesyona uğratılmış mutantında biyofilm oluşumunun engellenmesi için etkin preparatların dizaynı yanında, söz konusu suşların stres koşullarında verdiği yanıtlar ve RNA ifade düzeyleri, karşılaştırmalı bir şekilde araştırıldı. Bu denemeler sonucunda; nisin 1 mg/mL + EDTA 10 mM + CIP 5 µg/mL kombinasyonu test edilen antibiyofilm ajanları arasında en etkin antibiyofilm kombinasyonu olarak belirlendi. Diğer yandan glukoz ve safra tuzları ile yaratılan stres koşulları altında doğal suş ve *dam* mutantında biyofilm oluşumunun inhibisyonu belirgin bir şekilde meydana geldi. *dam* mutantında ayrıca hareketlilik (swimming ve swarming), selüloz ve selülaz üretimlerinin yüksek oranda engellendiği fenotipik testler sonucu tanımlandı. *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ile onun *dam* geni bakımından mutant suşunun ürettiği biyofilm formları kullanılarak yürütülen karşılaştırmalı RNA seq analizleri sonucunda; *dam* geninin söz konusu organizmada stres yanıtı, biyofilm üretimi ve merkezi metabolizmaya dahil çok sayıda genin regülasyonuna doğrudan, ya da miRNA sentezini regüle etmek suretiyle dolaylı bir şekilde katıldığı tespit edildi. Bu veriler *dam* geninin *Salmonella*'da global regülatör olduğuna dair ilk kanıtları teşkil etmektedir.

Haziran 2021, 92 sayfa

Anahtar Kelimeler: *S. Typhimurium*, *dam*, RNA seq, biyofilm, regülasyon

ABSTRACT

Master Thesis

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS of BIOFILM REGULATION in IDENTIFICATION of MOLECULAR REGULATION in *Salmonella* TYPHIMURIUM *dam* MUTANTS

Selma KEÇELİ

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the design of effective preparations for the prevention of biofilm formation in *S. Typhimurium* 14028 wild strain and its *dam* gene deleted mutant, as well as the responses and RNA expression levels of these strains under stress conditions were investigated comparatively. As a result of these trials, nisin 1 mg / mL + EDTA 10 mM + CIP 5 µg / mL combination was determined as the most effective antibiofilm combination among the tested antibiofilm agents. On the other hand, under stress conditions created by glucose and bile salts, inhibition of biofilm formation in wild-type and *dam* mutant occurred significantly. In addition, it was identified as a result of phenotypic tests that mobility (swimming and swarming), cellulose and cellulose production was highly inhibited in the *dam* mutant. As a result of comparative RNA, seq analyzes conducted using the biofilm forms produced by the wild type strain *S. Typhimurium* 14028 and its mutant strain in terms of its *dam* gene, the *dam* gene can directly regulate the stress response, biofilm production, and central metabolism of a large number of genes in the organism in question, or indirectly by regulating miRNA synthesis, were determined. These data constitute the first evidence that the *dam* gene is a global regulator in *Salmonella*.

June 2021, 92 Pages

Keywords: *S. Typhimurium*, *dam*, RNA seq, biofilm, regulation

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri, sabır ve yardımlarını esirgemeyerek bilimsel gelişimimde başından sonuna kadar emeği olan ve bunlarla beraber hayata karşı çok farklı bakış açıları sağlayan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı);

Çalışmalarım süresinde bilgi, öneri, destek ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Süreç boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Dr. Caner ÖZDEMİR ve Dr. Fatma Neslihan ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarımın deneysel aşamalarına olan katkılarının yanı sıra arkadaşlıklarıyla da bana destek olan başta Elif Gamze HAS ve Tuba Nur SÜRKAÇ'a ve Prokaryotik Genetik Laboratuvarındaki arkadaşlarıma,

Desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili annem Gülnay KEÇELİ, babam Lütfi KEÇELİ, ablalarım Pınar ÇÖKLÜ, Ayşe KEÇELİ ve kardeşim Altay KEÇELİ'ye,

Beni her zaman destekleyen ve hep yanımda olan arkadaşlarım Ahmet Furkan NERGİZ, Çiğdem ATA, Kübra ÇELİK, Oğuzhan OĞUZ, Semih NARİNOĞLU ve Tuğçe PARLAK'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma 119Z632 No. lu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Selma KEÇELİ
Ankara, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETİ	5
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri	5
2.2 Biyofilmlerin Genel Özellikleri.....	6
2.3 Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	7
2.4 <i>Salmonella</i> Biyofilm Formlarının Genel Özellikleri	8
2.5 <i>Salmonella</i> 'da Biyofilm Formasyonunun Regülasyonu	9
2.5.1 CsgD Proteini	9
2.5.2 BarA/SirA ve Csr sistemi	10
2.5.3 PhoPQ ve RstA.....	11
2.6 Dam Metil Transferaz Enzimi	12
2.6.1 Dam enzimlerinin bakteriyel virülans üzerine etkisi	18
2.6.2 Dam metilasyonunun <i>Salmonella</i> 'nın virülanslığındaki rolü	20
2.7 RNA-Seq Analizleri	22
3.MATERYALVEYÖNTEM.....	25
3.1 Materyal.....	25
3.1.1 Bakteri suşları ve gelişme koşulları	25
3.1.2 Besiyerleri ve çözeltiler.....	25
3.1.3 Çözeltiler	26
3.2 Yöntem	28
3.2.1 <i>Salmonella</i> suşlarının polistiren yüzeylerde biyofilm üretim özelliklerinin belirlenmesi.....	28

3.2.2	Glukoz'un biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi.....	29
3.2.3	Safra tuzlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi.....	30
3.2.4	Biyosüpfaktanlar ve biyoenzimlerin biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	30
3.2.5	Transkriptomik analiz için gerçekleştirilen biyofilm denemeleri.....	31
3.2.6	Biyofilm yapılarından total RNA izolasyonu	32
3.2.7	Biyofilm yapılarından miRNA izolasyonu	33
3.2.8	rRNA Uzaklaştırılması Basamağı.....	34
3.2.9	cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve dizilenmesi	34
3.2.10	Biyoinformatik analiz	35
3.2.11	Farklı şekilde ifade edilen genlerin GO ve KEGG zenginleştirme analizi...	35
3.2.12	Isı haritası.....	36
3.2.13	Bakterilerin yüzme ve yayma hareketinin belirlenmesi	36
3.2.14	Selüloz aktivitesi	37
3.2.15	Kalkoflor Bağlanma Deneyi	37
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4.1	Nisin'in, Biyoenzimlerin ve Biyosüpfaktanların Polistiren Yüzeyde Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri	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	<i>S. Typhimurium</i> Doğal Tip ve <i>dam</i> Geni Bakımından Mutant Suşların Bakteriyel 'Swimming' ve 'Swarming' Hareketlerinin Karşılaştırılması.....	54
4.5	Selüloz Aktivitesi Belirleme Deneyi.....	55

4.6 Kalkoflor Bağlanma Deneyi.....	56
4.7 S. Typhimurium Doğal Suş ve Onun <i>dam</i> Mutantında Farklı İfade Edilen Genler.....	57
5.TARTIŞMA	75
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ.....	97



SİMGELER VE KISALTMALAR 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
Log ₂	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 munite)
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
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
SDS	Sodyum Dodezil Sülfat
SeqA	sequestration (tecrit) A regölatör protein
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SPI	Salmonella 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 <i>dam</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 <i>dam</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 <i>dam</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 suşu ve <i>dam</i> mutantında 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 <i>dam</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.6 EDTA'nın (1mM, 10mM ve 50mM) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal suşu ve <i>dam</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 <i>dam</i> mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi	46
Şekil 4.9 A, A1 ve A2 kombinasyonlarında hazırlanan preparatların (Çizelge 3.3) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve <i>dam</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 <i>dam</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 <i>dam</i> mutantlarının biyofilm oluşumuna etkisi	50
Şekil 4.12 Glukoz'un (% 1, % 2, % 3) <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve <i>dam</i> mutant suşunun biyofilm oluşumuna etkisi.....	51
Şekil 4.13 Safra tuzlarının (% 0,1, % 0,2 ve % 0,3) <i>S. Typhimurium</i> 14028 doğal tip ve <i>dam</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 <i>dam</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 <i>dam</i> mutantının biyofilm oluşumuna etkisi	54
Şekil 4.16 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve <i>dam</i> geni bakımından mutant suşların "swimming" hareketi	55
Şekil 4.17 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve <i>dam</i> geni bakımından mutant suşlarda "Swarming" hareketi.....	55
Şekil 4.18 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve <i>dam</i> geni bakımından mutant suşlarda selülaz aktivitesi zonları.....	56

Şekil 4.19 <i>S. Typhimurium</i> doğal tip ve <i>dam</i> geni bakımından mutant suşların kalkoflor bağlanma testi bulguları	56
Şekil 4.20 Hareket ile ilişkili proteinleri ve fimbriyal proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	58
Şekil 4.21 Salgı sistem proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	59
Şekil 4.22 Taşıyıcı sistem ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa orala <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	62
Şekil 4.23 Amino asit metabolizması ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	63
Şekil 4.24 Karbonhidrat metabolizması ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	64
Şekil 4.25 Enerji metabolizması ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	65
Şekil 4.26 Membran proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	67
Şekil 4.27 Transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	68
Şekil 4.28 DNA onarımı ve replikasyon mekanizması ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2).....	69
Şekil 4.29 Sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	70
Şekil 4.30 İki bileşenli sistem ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	71
Şekil 4.31 Şaperonlar ve katlanma katalizörleri ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	72
Şekil 4.32 miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla <i>dam</i> mutantındaki değişim miktarları (Log2)	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, antimikrobiyal maddeler ve dezenfektanlar	27
Çizelge 3.2 Denemelerde kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları.....	31
Çizelge 4.1 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen hareket ve fimbriyal yapılar ile ilişkili genler	57
Çizelge 4.2 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen salgı sistemi ile ilişkili genler.....	58
Çizelge 4.3 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen taşıyıcı sistem ile ilişkili genler.....	61
Çizelge 4.4 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen amino asit metabolizması ile ilişkili genler.....	62
Çizelge 4.5 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen karbonhidrat metabolizması ile ilişkili genler.....	63
Çizelge 4.6 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen enerji metabolizması ile ilişkili genler	65
Çizelge 4.7 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen mebran proteinlerini kodlayan genler	66
Çizelge 4.8 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler	67
Çizelge 4.9 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen DNA onarımı ve replikasyon ile ilişkili genler	68
Çizelge 4.10 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genler.....	69
Çizelge 4.11 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen iki bileşenli sistem ile ilişkili genler.....	70
Çizelge 4.12 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen şaperonlar ve katlanma katalizörleri ile ilişkili genler	71
Çizelge 4.13 dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen mikro RNA'ları (miRNA) kodlayan genler	73

1. GİRİŞ

Bakterilerin; canlıların dokularının ya da cansız maddelerin yüzey yapılarına tutunmaları, kolonizasyonları ve bu süreçte söz konusu hücrelerin ürettiği ve hücre dışına salgıladıkları çok sayıda tekrar eden alt ünitelerden oluşan makromoleküllerin oluşturduğu bir ağ içerisinde (hücre dışı polimerik yapı, EPS) oluşturdukları çok katmanlı yapı, biyofilm olarak tanımlanmaktadır (Davey ve O'Toole 2000). Bakteri hücrelerinin biyofilm yapısını oluşturmalarını teşvik eden çevresel koşulların, genellikle bakterilerin bu çevredeki kalıcılıklarını ya da üremelerini güçleştiren baskı (stres) faktörleri olmaktadır. Bunlar; hidrojen iyonu $[H^+]$ ile hidroksit iyonunun $[OH^-]$ derişimlerinin oranı, çevredeki karbon ve azot kaynaklarının yetersizliği, optimum gelişme sıcaklığından belirgin bir şekilde sapan sıcaklık değışimleri, bakterilerin bulundukları nişlerde meydana gelen oksijen seviyesi değışiklikleri veya iyonik kuvvetler gibi faktörler olabilir (Kostakioti vd. 2013). Bakterilerin, bulundukları çevrelerde genellikle karşılaştığı bu gibi zorlayıcı koşullara karşı yaşamda kalabilmek için; çok farklı fenotipik, genetik veya epigenetik yanıtlar oluşturabildikleri bilinmektedir (Chia vd. 2008). Özellikle bakterilerin plaktonik yaşam formundan biyofilm formuna geçmesi esnasında, bakteriyal genomların önemli bir kısmının ifade yönünden farklılaştığı saptanmıştır. Biyofilm formlarının oluşumundan sorumlu genlerdeki farklılaşmalar, biyofilmin türe özgü fenotipinin ortaya çıkmasında, ya da var olan biyofilm fenotipinin değıştirilmesinde temel basamağı oluşturmaktadır (Sauer 2003). Bakterilerin değışen ortam koşullarına uyum için sahip oldukları bu genetik esneklik, bulundukları çevreyi algılama yollarını ve bu algı paralelinde oluşturdukları yanıtların biyolojisinin detaylı bir şekilde anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Hareketli hücreler, bir yüzeye tutunup EPS üreterek stabil bir yapı olan biyofilmi oluştururken, hareketten sorumlu genlerin inaktif, matris üretimi için gerekli olan genlerin de aktif hale getirildiği görüşü genel kabul görmektedir (Monds ve O'Toole 2009).

Endüstriyel gıda üretiminde kullanılan araç/gereçler, gıda ambalajları ya da doğrudan gıda hammaddeleri ve mamul gıdalar üzerinde oluşan biyofilm yapılarından kaynaklanan kontaminasyonlar ve buna bağlı olarak gelişen enfeksiyonlar yüksek düzeylerde ekonomik kayıplara ve ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Brooks ve Flint 2008).

Evrensel boyutta gıda kökenli patojenlerin en önemlilerinden biri olarak kabul edilen *Salmonella* cinsi üyelerinin oluşturdukları enfeksiyonların kalıcılığını ve sürekliliğini sağlayan en önemli etkenlerden biri, tek tür ya da karışık türler ile birlikte oluşturdukları biyofilm yapılarıdır. *Salmonella* enfeksiyonlarının prevalansı, tüm dünyada görülen gıda kaynaklı enfeksiyonlar içerisinde ikinci sırada, ancak mortalite bakımından birinci sırada yer almaktadır (Hohmann 2001). *Salmonella* kontaminasyonlarının başlıca kaynakları; hijyenik koşullar, sosyal yapı ve endüstrileşme düzeyi ile bağlantılı olarak değişiklikler göstermekle birlikte, yarı mamul et ve mamul et ürünleri, çiğ yumurta, pastörize edilmemiş süt ve salata sosları olarak tanımlanabilir. Son yıllarda önemli bir diğer bulaş kaynağının ise, özellikle biyofilm etkinliğinin tanımlanması sonucu, iyi işlem görmemiş bitkisel ürünler olduğu saptanmıştır (Zhang vd. 2000).

Biyofilmler doğal koşullarda genellikle birden çok bakteri türü barındırmaktadır. Bu durum, biyofilm yapılarındaki bakteriler arasında yatay gen transferlerine uygun ortam oluşturmakta ve böylelikle bakteriyel çeşitlilik ve özellikle de antibiyotik dirençlilik artmaktadır. *Salmonella* cinsi üyeleri biyofilm oluşturarak; kanatlılar, domuz ve sığır gibi tarımsal üretimde kullanılan hayvanların bağırsak sistemlerinde kolaylıkla taşınırlar (Althouse vd. 2003, Ricke 2003, Morgan vd. 2004). Tüm doğal sistemlerde biyofilm oluşturabilme yetenekleri ve bu biyofilmlerin, onları oluşturan bakterilerin planktonik formlarına karşı yüksek etkinlik gösteren kimyasal ve fiziksel dezenfeksiyon ya da sterilizasyon sistemlerinden genellikle etkilenmemesi, *Salmonella* enfeksiyonlarının kontrolünü ve eradikasyonunu güçleştiren ana nedendir (Joseph vd. 2001, Prouty ve Gunn 2003). Bu ana sorun, biyofilm oluşumunun moleküler mekanizmasının detaylı bir şekilde incelenmesine ve elde edilecek bulgulardan hareketle, yeni kuşak çevreci biyofilm inhibitörlerinin geliştirilmesine elzem bir öncelik kazandırmıştır.

Bakterilerde çok sayıda fizyolojik ve yapısal karakterin epigenetik mekanizmalar tarafından regüle edildiği saptanmıştır. Günümüzde özellikle *Salmonella* biyofilmlerinin sıkı bir epigenetik regülasyon altında olduğuna ilişkin kanıtların toplanmaya başlaması, bu alana olan ilgiyi büyük ölçüde artırmıştır (Dubnou ve Losick 2006, Casadesus ve Low 2013). Bakterilerde epigenetik düzenlemelerde görev alan enzimlerin en önemlilerinden biri DNA metilazlardır. *S. enterica*'nın da içerisinde bulunduğu Gammaproteobacteria

taksonunun ana metil transferaz enziminin deoksiadenin metil transferaz (Dam) enzimi olduğu tespit edilmiştir. Dam metilasyonu 5'GATC3' tanıma dizilerinde, adenin bazının 6. pozisyonunda gerçekleştirilir. Dam metil transferaz enzimi de, 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). Günümüze kadar, *dam* genlerinin *Salmonella* biyofilmlerinin regülasyon üzerinde oynadığı role dair çok az sayıda bilimsel araştırma yapılmıştır. Aya Castaneda vd. (2015) *S. Enteritidis*'de *dam* geni mutantlarında, sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma kapasitelerinin ve polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturma düzeylerinin düştüğünü tespit etmiştir. Söz konusu çalışmada ayrıca, kıvrımlı fimbriya ve selülöz üretimin ana regülatörleri olan *csgA* ve *csgD* genlerini ifade düzeylerinin büyük oranda inhibe edildiği belirlenmiştir. Bu ve benzeri çalışmalarda kritik sorun tanımlanan fenotipik ya da fizyolojik değişimlerin doğrudan Dam metilasyonu ile ilişkisinin kurulamamasıdır. Bu eksikliği gideren ilk çalışma, araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş ve *dam* mutantlarında biyofilm üretiminin ve pelikül oluşturma özelliklerinin, metilasyon ile doğrudan ilişkisi fonksiyonel tamamlama testleri ile belirlenmiştir (Uğur vd. 2018). Bu araştırmanın devamı niteliğinde tasarlanan bu tez çalışmasında, transkriptomik analizler sonucu *dam* genlerinin biyofilm üretimi üzerindeki etkinlik mekanizmasının detaylandırılması ve bu mekanizmanın kontrolü altındaki diğer genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETİ

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella cinsi içerisinde tanımlanan çok sayıda serovaryetenin, küresel halk sağlığını tehdit eden önemli gıda kökenli patojenler olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Lee vd. 2015, Odoch vd. 2017). Gıda kökenli enfeksiyonlar ve bu enfeksiyonlar sonucu ölümler dikkate alınarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından çıkarılan istatistiklerde, yaklaşık 80000 adeti ölüm ile sonuçlanan milyonlarca vakanın % 50'sinin *Salmonella* esaslı olduğu saptanmıştır (Kirk vd. 2015). Diğer yandan, Çin'de 2006'dan 2010'a kadar gıda kaynaklı hastalık gözetim sistemi tarafından toplanan veriler, *Salmonella*'nın gıda kaynaklı salgınlara neden olan en yaygın ikinci bakteri olduğunu göstermiştir (Pang vd. 2011). Son yıllarda, *S. Typhimurium*'da antibiyotik direnç yaygınlaşmakta ve bu da onu, daha ciddi sağlık sonuçlarına yol açabilecek yönde farklı bir boyuta evrilen küresel bir sorun haline getirmektedir (Parisi vd. 2018, Jiu vd. 2020).

Salmonella cinsine dahil türler; Gram boyanma özellikleri dikkate alındığında Gram-negatif, oksijeninin varlığında aerobik solunum, ancak oksijen yokluğunda fermentasyon yolu ile enerji elde etme yeteğinde, 0.5-1.0 (en) x 1-5 (boy) µm boyutlarında, genel olarak flagella ile hareket yapabilen, çubuk şeklinde bakteriler olarak karakterize edilirler. Laboratuvar koşullarında ideal üreme sıcaklıkları 37 °C, pH değeri ise nötr pH değerlerine yakın olarak belirlenmiştir. Asidik pH değerlerine, düşük su aktivitesine veya yüksek yağ oranına sahip gıdalarda sıcaklığa direnç göstermelerine rağmen, dondurularak depolanan gıdalarda *Salmonella* canlılığı dikkate değer bir şekilde düşmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesine ait olan bu cins, insanların ve hayvanların bağırsaklarında otomatik bir şekilde bulunan patojen türler yanında, soğuk kanlı hayvanların da gastrointestinal sistemine özgü bazı tür ve serovaryeteleri de içermektedir (Singleton ve Sainsbury 1996, Gibson vd. 2006).

Salmonella cinsi, taksonomik olarak *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki tür altında sınıflandırılmaktadır. *Salmonella* sınıflandırmasının ilk dönemlerinde, günümüzde serotip olarak tanımlanan her farklı üye, tür olarak kabul edilmiştir. Ancak DNA-DNA

hibridizasyonu gibi daha gelişmiş genetik teknikler kullanıldığında bu serotiplerin çoğunun yüksek derecede genetik benzerlik içerdiği keşfedilmiştir. Özetle serolojik ve moleküler genetik tekniklerin gelişimi, *Salmonella* taksonomisini önemli ölçüde değiştirmiştir. Bugüne kadar, büyük bir çoğunluğu insanda ve diğer hayvanlarda salmonelloz etmeni olan, *S. enterica* türüne ait 2600'den fazla serovaryete tanımlanmıştır (Mezal vd. 2014). Bunların içerisinde *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) birçok ülkede baskın salmonelloz etmeni serotip olarak tespit edilmiştir. Ancak, söz konusu baskın serotip kavramı, bulaşı kaynağına ya da ekosistem koşullarına göre değişim gösterebilmektedir (Barnhart ve Chapman 2006, Pieter-Jan vd. 2015, Simpson vd. 2018).

2.2 Biyofilmlerin Genel Özellikleri

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarla ilgili çalışmalar, klinik enfeksiyonların çoğunda rol oynadıkları için giderek artan bir önem kazanmaktadır. Patojenik ve patojenik olmayan mikroorganizmalar tarafından kullanılan genel bir hayatta kalma mekanizması olarak kabul edilen biyofilm formasyonu, bir matriks içinde kapsüle edilmiş heterojen hücrelerin yüzeylere bağlı ve üreme yeteneğindeki yapıları ile karakterize edilmektedir (Kumar vd. 2017). Biyofilm ile ilişkili organizmalar, transkribe edilen genlere göre değerlendirildiğinde, planktonik benzerlerinden önemli düzeyde farklılık içermektedir. Biyofilmler, canlı organizma dokuları, özellikle implantlar gibi tıbbi açıdan kritik cihazlar, endüstriyel veya içme suyu sistemleri boruları veya doğal su sistemleri dahil olmak üzere, çok çeşitli yüzeylerde oluşabilir (Donlan 2002). Bakteriyel savunma mekanizmasının uyarılması, kolonizasyon için uygun alan sağlanması, quorum sensing (yeter sayı algılama sistemleri) ve habitat içerisindeki planlanmayan çoğalma gibi çeşitli faktörler, biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır (Jefferson 2004). Biyofilm matriksi, antibiyotiklere ve diğer olumsuz çevresel koşullara karşı büyük bir direnç gelişimine ve mikroorganizmalara korunaklı bir ekolojik niş içerisinde kalmasına olanak sağlayarak, bu yapıda bulunan hücrelerin hayatta kalma oranını artırır. Bir biyofilm yapısı, içerisinde tek bir bakteri türü veya birden fazla mikroorganizma barındırabilir. *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida albicans* (*C. albicans*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus epidermidis* (*St. Epidermidis*), *Mycobacterium tuberculosis* (*M.*

tuberculosis) ve *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*) gibi birçok türün neden olduğu biyofilm ile ilişkili hastalıklar ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Kumar vd. 2017).

Biyofilm matriksi içeriğinin % 97 gibi büyük kısmını su oluşturmaktadır. Diğer ana bileşenler ise ekzopolisakkaritler (% 1-2), globuler glikoproteinler ve diğer proteinler (% 1-2), deoksiribonükleik asit, lipit ve fosfolipitler (% 1-2) gibi makromoleküllerdir. Ancak yukarıda ifade edilen bileşenler ve onların oranları; biyofilmi oluşturan hücrelerin tipine, biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerine, hücrelerin üreme ortamının doğasına, biyofilm çevresindeki akışkanın çeşidi ve genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Allison 2003).

2.3 Biyofilm Oluşum Aşamaları

Bağımsız yaşam formlarından biyofilm komünitelerine geçişte temel aşamalar; biyofilm tesis edilecek yüzeylerde gerçekleşen planktonik tutunma, bu ortamlarda mikrokoloni olarak adlandırılan temel bazal biyofilm yapılarının oluşumu (kolonizasyon), hücre dışı polimerik bir ağ olan matriks ile mikrokolonilerin çevrelenmesinin tamamlanması ve optimum hücre yoğunluğuna ulaşma ile karakterize edilen olgunlaşma ve olgun biyofilmlerden biyofilm formlarının yönlendirilmiş bir davranışı ile ya da çevresel etkiler sonucu, hücrelerin kopması (dağılma) olarak tanımlanabilir. Tutunmanın geri dönüşümsüz aşamasında hücreler; tutunma hedefi olan yüzeye yakın bir mesafede bulunurlar ancak, yüzeye temas gerçekleşmez. Bu evrede yüzeyin fizikokimyasal özellikleri, (yükü ve hidrofobisitesi vb. gibi) ve besin maddelerinin varlığı kritik bir önem taşımaktadır. Bu fazdaki hücreler sudan geçirme gibi basit işlemlerle ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (Lindsay ve Van Holy 2006). Hücrelerin yüzeylere tutunmasının ikinci aşamasında, organizma ile yüzeyler arasında gerçekleşen hidrofobik etkileşimler ya da dipol-dipol etkileşimleri, iyonik ve kovalent bağlar ağırlıklı bir etkinlik göstermektedir. Geri dönüşümsüz tutunma olarak da adlandırılan bu safhada mikroorganizmalar flagellaları, fimbriyaları ve ürettikleri EPS (Ekstraselüller polimerik madde) diğer etkin yapılar olarak tanımlanmıştır. Tutunan hücreler, diğer hücrelere sinyal moleküllerini göndererek, toplanmayı başlatırlar. Bu

evrede bir hücrenin tutunduğu yüzeyde koloni meydana getirmesi (mikrokoloni oluşumu) tipiktir. Söz konusu kolonileri aynı yüzeyde bulunan farklı türlere ait hücreler de oluşturabilir (Poulsen 1999).

Biyofilmdeki mikroorganizmalar, nihai (olgun) biyofilm yapılarını tesis ederken besin maddelerinin ve oksijen konsantrasyonunun etkisiyle mantar ya da kule şeklinde yapılar oluştururlar (Chmielewski ve Frank 2003, Klausen vd. 2003). Mikroorganizmaların bu maksimum hücre konsantrasyonundaki olgun yapıyı oluşturma süresi, biyofilmi oluşturan hücre türlerine ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Stoodley vd. 2002). Bu aşamada hücreler etraflarında bulunan matriksin stabilizasyonu ile yüksek düzeyde antibiyotik direnci sağlamaktadır (Kumar vd. 2017). Dördüncü ve son aşama, olgunlaşan biyofilmin dağılmasıdır. Bu aşamada; fiziksel aşınma, hücre içi enzimatik reaksiyonlar, ortamdaki besin yetersizliği sonucu, matriks içerisinde bulunan hücreler koparak biyofilmden ayrılmaktadır. Bu süreç bazı araştırmacılara göre biyofilm yapılarının sürekliliği ve yaygınlığı için doğrudan biyofilm hücreleri tarafından kontrol edilen yönlendirilmiş bir biyofilm fonksiyonu olarak görülmektedir (O'Toole vd. 2000).

2.4 *Salmonella* Biyofilm Formlarının Genel Özellikleri

Salmonella cinsi bakterilerin büyük bir çoğunluğu, doğal habitat ve nişlerde ya da laboratuvar koşullarında bitki, cam, metal, plastik, et ve et ürünleri ve bitkisel ürünler gibi biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği içermektedir. Tüm bunlara ilave olarak, *Salmonella* cinsi bakteriler insan safra taşları üzerinde de kolonize olarak biyofilm formları oluşturabilirler. Biyofilm oluşumunda daha önce tanımlanan temel aşamalar, *Salmonella* biyofilmlerinde de tipik bir şekilde gözlemlenmektedir (Stepanović vd. 2004). *Salmonella* cinsi bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin içerdiği ekstraselüler matriks bileşenleri; olduğu ortamdaki çevresel etkenlere ve besin çeşitliliğine göre farklılık göstermektedir. *Salmonella* biyofilmlerinde baskın olarak görülen morfortip, EPS komponentleri ve onların regülasyonu ile karakterize edilen ve R_{dar} (kırmızı, kuru ve pürüzlü) olarak adlandırılan morfortiptir. Bu morfortipe ait biyofilmlerin matriks yapısında ağırlıklı olarak protein kompleksleri ve ekzopolisakkaritler bulunmaktadır (Latasa vd. 2005, Castelijns vd. 2012). Bu bileşenler büyük ölçüde curli fimbriya (kırımlı fimbriya),

selüloz, biyofilm ile ilişkili protein (Bap), O-Ag-kapsülü ve ekstrasellüler DNA, olarak tanımlanmıştır. Biyofilmin ifade profilleri serovaryeteye özgüdür ve temas yüzeyinin bütün özelliklerinden etkilenmektedir (Wang vd. 2014).

Salmonella cinsi üyeleri epitel hücreler üzerinde biyofilm yapısı oluşturabilmek için fimbriyalara [uzun polar fimbriya (lpf), tip 1 fimbriya (fim), plazmidle kodlanmış fimbriya (pef), bovin kolonizasyon faktörü (bcf), curli fimbriya (csg)], selüloza ve kolanik asite ihtiyaç duymaktadır (Ledeboer ve Jones 2005, Ledeboer vd. 2006). Safra taşları üzerinde biyofilm oluşturmak için O-Ag-kapsülü ve fimbriyanın alt birimleri önemli bir faktör iken, bitki yüzeylerine tutunma sağlayabilmeleri için O-Ag-kapsülünün yanısıra; flagella, curli fimbriya ve selüloz ekspresyon düzeyleri önem arz etmektedir (Barak ve Liang 2008, Berger vd. 2009, Crawford vd. 2010). *Salmonella* biyofilmlerindeki ekstrasellüler matrikte bulunan kapsüller hücre dışı polisakkarit olarak bilinen kolanik asit; epitel hücre yüzeylerindeki üç boyutlu oluşum ve HEp-2 hücre yüzeylerindeki ince biyofilm oluşumu için gereklidir (Ledeboer vd. 2006). Ayrıca, LB besiyerinde üretilen *Salmonella* serovaryetelerinin sıvı-hava ara fazında yoğun pelikül oluşturma karakteristiği üzerinde de kolanik asidin önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir (Solano vd. 2002).

2.5 *Salmonella*'da Biyofilm Formasyonunun Regülasyonu

2.5.1 CsgD Proteinini

Curli (kıvrımlı) fimbriya, hücre yüzeyinde uzunluğu 0.5-1 μm , çapı ise 6-12 nm arasında değişkenlik gösteren hücre dışı sert uzantılardır. Farklı hücre tiplerinin hücre dışı matrisinde bulunan; fibronektin, laminin ve plazminojen gibi proteinlere bağlanma (tutunma) yeteneği içeren bu proteiner yapı uzantıları, *Salmonella* hücrelerinin birbirine ya da değişik tip hücrelere tutunmasını sağlayan temel elemanlardır. Kıvrımlı fimbriya üretimine dahil olan genler, iki operon halinde organize olmuştur. Bu operonlar; kıvrımlı fimbriyanın yapısal bileşenlerini kodlayan *csgBAC* operonu, *csgD* transkripsiyonel regülatörü ve kıvrımlı fimbriya transport sistemini kodlayan *csgDEFG* operonudur (Beloin vd. 2008). Kıvrımlı fimbriyanın bu genetik organizasyonu; *Salmonella* spp, *E.*

coli, *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. ve *Raoultella ornithinolytica* gibi enterik bakterilerde ortaktır (Gerstel ve Römling 2003). *csgD* geni; heliks dönüş heliks motifi içeren DNA bağlanma proteinleri süper ailesi olan LuxR benzeri bir protein kodlamaktadır. Söz konusu protein, selüloz ve kıvrımlı fimbriya olmak üzere, iki hücre dışı temel matriks bileşiğinin pozitif regülatörüdür (Gerstel ve Römling 2003, Stepanović vd. 2004). CsgD transkripsiyonel regülatörü, alıcı bir N-terminal bölgeye (domain) sahiptir ve bu alanda korunmuş bir aspartat (D59) bulunmaktadır. Kongo Kırmızısı (CR) içeren katı besin ortamında *csgD* geni bakımından mutant suşlar, “saw” (düz ve beyaz) biyofilm morfolipinde saptanmaktadır (Römling vd. 2000). Yüksek düzeyde regüle edilen *csgD* promotor bölgesinde gerçekleşmesi mümkün olan nokta mutasyonları (*csgB* ve *csgD* genleri arasındaki 521 bç’lik bölgede) korunmuş promotor bölgesini, yarı korunumlu hale getirebilmektedir (Römling vd. 1998).

2.5.2 BarA/SirA ve Csr sistemi

Gama-proteobakterilerde karbon tutumu regülatörü (Csr) çok sayıda patojenin virülans faktörlerinin ekspresyonunda önemli görevler almaktadır. CsrA, 61 amino asitten oluşan, oldukça küçük bir translasyonel regülatör proteindir. Global regülatör olan bu protein; karbon metabolizması, flagella biyosentezi ve glikoliz reaksiyonlarının pozitif regülasyonunda, biyofilm oluşumunun ise, negatif regülasyonunda görev almaktadır. Bunların yanında, bu regülatör proteinin; glikojen biyosentezinde ve katabolizmasında, *E. coli*’de gerçekleşen glikoneogenezde ve ayrıca hayvan, bitki konakçıları ile etkileşimlerde önemli roller aldığı saptanmıştır (Jonas 2008, Fröhlich ve Vogel 2009). Örneğin; CsrA regülatörü, karbon açlığıyla ilgili olan glikojen sentezini yöneten *pgaABCD* operonunun baskılayıcısıdır (Jonas 2008). Diğer yandan, global bir transkripsiyonel regülatör olan SirA’nın, *Salmonella* Patojenite Adası-1 (SPI-1)’de bulunan genlerin ifadesini pozitif yönde kontrol ettiği belirlenmiştir (Johnston vd. 1996, Ahmer vd. 1999, Teplitski vd. 2003). SirA, proteini FixJ yanıt düzenleyiciler ailesinin bir elemanıdır. Söz konusu aile üyeleri BarA proteini ile birlikte hareket eden iki bileşenli yanıt regülatörleridir (Altier vd. 2000, Teplitski vd. 2003). SirA / BarA ortologları, *E. coli* (UvrY / BarA), *Pseudomonas* türleri (GacA / GacS), *Vibrio cholerae* (VarA / VarS), *Erwinia carotovora* (ExpA / ExpS) ve *Legionella pneumoniae* (LetA / LetS) dahil olmak

üzere birçok bakteride mevcuttur. Bu bakterilerde; virölans, hareketlilik, ikincil metabolizma, ekzoenzim üretimi, yeter sayı algılama veya biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol ettikleri saptanmıştır (Goodier ve Ahmer 2001, Lapouge vd. 2008). *E. coli*'de UvrY / BarA, her biri RNA bağlayıcı protein CsrA tarafından tanınan bazı motifler içeren, translasyonu yapılmayan iki küçük RNA'nın yani *csrB* ve *csrC*'nin ekspresyonunu aktive eder (Suzuki vd. 2002, Weilbacher vd. 2003, Babitzke ve Romeo 2007).

2.5.3 PhoPQ ve RstA

PhoP / PhoQ iki bileşenli sistem, *S. enterica*'daki çeşitli fizyolojik ve virölans fonksiyonları regüle etmektedir. Bu sistem, düşük Mg^{2+} , asidik pH ve antimikrobiyal peptitler tarafından aktive edilir (Groisman vd. 2009). İki bileşenli düzenleyici sistemlerin aracılık ettiği sinyal iletimi, bakteri hücrelerinin çeşitli stres koşullarına hızla adapte olmalarını ve hayatta kalmalarını sağlar. PhoP / PhoQ iki bileşenli sistemde, PhoP yanıt düzenleyicisi ve PhoQ ise sensör kinaz olarak işlevseldir. PhoQ proteini, Mg^{2+} konsantrasyonlarını spesifik bir sinyal olarak algılamaktadır (Vescovi vd. 1996). Çevresel Mg^{2+} konsantrasyonu mikromolar seviyelere düşürüldüğünde, PhoQ, PhoP proteininin fosforilasyonunu teşvik eder (Vescovi vd. 1996, Shin ve Groisman 2005). *Salmonella enterica*'da, düşük Mg^{2+} ile aktive olan PhoP proteini, memeli konakçılarda virölans ve diğer fizyolojik süreçler için gerekli olan birçok genin transkripsiyonunu doğrudan düzenler (Groisman 2001). PhoP / PhoQ sistemleri, Mg^{2+} taşıyıcılarını kodlayan *mgtA* ve *mgtB* genlerinin PhoP ile etkinleştirilmesi nedeniyle *Salmonella* cinsi üyelerinin sınırlı Mg^{2+} konsantrasyonlarında üremesine olanak tanır (Soncini vd. 1996, Vescovi vd. 1996). PhoQ aracılı PhoP fosforilasyonu, asidik pH değerlerinde meydana gelir ve PhoP ile aktive edilen genlerin *pagA*, *phoN* ve *pmrD* transkripsiyon seviyeleri, asidik koşullarda üretilen *Salmonella* suşlarında artış gösterir (Bearson vd. 1998, Perez ve Groisman 2007, Prost vd. 2007). Belirli antimikrobiyal peptitlerin, PhoP tarafından düzenlenen genlerin bir alt kümesinin ifadesini teşvik ettiği dikkate alındığında, PhoP / PhoQ sisteminin aktivitesinin en az üç farklı sinyale yanıt verdiği ortaya çıkmaktadır (Bader vd. 2005). PhoP / PhoQ sistemi ayrıca diğer düzenleyicilerin seviyelerini ve / veya aktivitelerini kontrol ederek gen ekspresyonunu düzenler (Kato ve Groisman 2008). Bir yanıt

düzenleyici RstA ve onun ortak algılayıcısı RstB'den oluşan RstA / RstB iki bileşenli sistem, ifadesi PhoP / PhoQ sistemi tarafından düzenlenen bir sistemdir. *Escherichia coli*'de, PhoP proteini *rstA* promotoruna bağlanır ve *rstA* geninin transkripsiyonu, yüksek bir Mg^{2+} konsantrasyonunda üretilen hücrelerde PhoP / PhoQ sistemi tarafından baskılanır (Minagawa vd. 2003). RstA proteini, asidik strese adaptasyon için gerekli bir ürünü kodlayarak *asr* geninin transkripsiyonunu destekler (Ogasawara 2007). Sonuç olarak, *asr* geninin transkripsiyonu, düşük RstA proteini seviyeleri nedeniyle *phoP* geninden yoksun bir suşta tam olarak aktive edilmez. Ek olarak, *rstA* geni, temel genler *yjeE*, *yeaZ* ve *ygjD*'nin çok kopyalı bir baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Campbell vd. 2007, Handford vd. 2009). *Salmonella* PhoP proteini ayrıca düşük Mg^{2+} düzeylerinde *rstA* promotoruna doğrudan bağlanır ve onu etkinleştirir. Yapılan çalışmalarda bir plazmidten aşırı eksprese edildiğinde, spesifik olarak *feoA* promotoruna bağlanan RstA proteininin ferröz demir (Fe^{2+}) taşıyıcısı FeoB'yi kodlayan *feoAB* operonunun transkripsiyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Jeon vd. 2008). Tüm bu genlerin çevresel stres ve biyofilm formasyonu ile doğrudan ya da dolaylı bir şekilde ilişkili oluşu, PhoPQ ve RstA sistemlerinin biyofilm regülasyonunun global regülatörü olma olasılığını güçlendirmektedir.

2.6 Dam Metil Transferaz Enzimi

Çözeltilerde monomerik formda tespit edilen Dam metil transferaz enzimi; S-adenosil-L-metiyonin (SAM) kofaktöründen aldığı metil grubunun, 5'GATC3' tetramer palindromik serilerdeki adenin bazının N6 konumuna transferini katalize eder. Bu enzimin doğal substratı hemimetillenmiş DNA'dır. Hemimetillenmiş DNA dizilerinde, metilasyon sadece DNA tek zincirinde söz konusudur. Bu durum, hücrelerde replikasyon çatalının hemen arkasındaki DNA konfigürasyonunda gerçekleşir. Çift sarmallı DNA, denatüre DNA'dan daha iyi bir metil alıcısı olduğu için, metillenmemiş ve hemimetillenmiş DNA arasında metilasyon oranı bakımından çok az fark vardır (Herman ve Modrich 1982). Dam metil transferaz enzimi, biri katalitik bölgede biri de allosterik efektör bölgesinde olmak üzere, iki özgül SAM bağlanma bölgesi içermektedir (Bergerat vd. 1991).

Logaritmik fazdaki bakteri hücrelerinde DNA'daki spesifik GATC bölgelerinin metilasyonu oldukça hızlıdır. Kromozomal DNA için bu süre maksimum 1 dakika iken, plazmid DNA'da 2-4 saniye arasında gerçekleşmektedir (Allers vd. 1995, Stancheva vd. 1999). Ancak, replikasyon orijin bölgesindeki 5'GATC3' dizileri, diğer DNA bölgelerindekilerden daha uzun süre hemimetillenmiş durumda kalırlar. Bu durum, söz konusu bölgelere SeqA (replikasyon orijini tecrit proteini) bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Dam metil transferaz enziminin en yüksek saflaştırılmış halinin moleküler ağırlığı 32 kDa (Kilo Dalton) olup, 278 amino asit içeren tek bir polipeptit zinciridir. Enzimin devir sayısı, dakikada 19 metil transferi olarak saptanmıştır. Dam, tamamen metillenmemiş bir bölgeye bağlarken bile, DNA bağlanma olayı başına bir metil grubu transferi gerçekleştirir. DNA bağlanması ve / veya metil transferi, tanıma serisi yakınındaki diziden önemli düzeyde etkilenir. Bu enzim için en uygun yakın dizi (kuşatma sekansı) 5'-GGGGATCAAG-3' olarak tespit edilmiştir. Dam enzimi, hedef DNA dizisine spesifik bağlanmayı gerçekleştirdikten sonra, DNA üzerinde kayma hareketi yaparak işlevselliğini sürdürür. Kayma mekanizması, her enzim bağlanması gerçekleştiğinde enzim DNA'dan ayrılmadan önce yaklaşık 55 metillenmiş GATC bölgesinin oluştuğunun gösterilmesi ile kanıtlanmıştır (Peterson vd. 2006, Coffin ve Reich 2008).

Logaritmik fazdaki *E. coli* K-12 suşunda, hücre başına 130 Dam molekülü bulunduğu tespit edilmiştir. Bu moleküllerin *E. coli*'de bir jenerasyon süresi içerisinde DNA'daki mevcut tüm GATC bölgelerini metillenmesi için, dakikada en az 39 metil grubu aktarma yeteneğinde olması gerektiği hesaplanmıştır. Dam, Lon proteaz için uygun bir substrattır (Calmann ve Marinus 2003). Bu nedenle üreme hızına bağlı transkripsiyonel kontrole ek olarak, başka bir düzenleyici mekanizma daha içerdiği düşünülmektedir. *E. coli*'nin Dam enzimi, SAM bağlanmasında rol oynadığı tespit edilen yüksek oranda korunmuş -DPPY- dahil olmak üzere, dokuz amino asit dizisi motifinin ortak olduğu bir metiltransferaz ailesinin üyesidir. Bu enzimin yakın akrabaları; P1, T1, T2 ve T4 fajlarında ve EcoRV, FokI, MboI, NlaIII ve DpnII bakteri suşlarında tanımlanmıştır. Dam'ın evrimi, SeqA ve MutH ile birlikte evrim (uyumlu evrim) modeli ile açıklanmaktadır (Malone vd. 1995). Dam enzimleri, *Enterobacteriales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales*, *Pasteurellales* ve *Alteromonadales* takımları üyesi bakterilerde bulunmaktadır. Bu taksonlarda *dam*

genlerinin ortak özellikleri mevcuttur; 1. *dam* geni *aroK* ve *aroB* ile birlikte bir operonda düzenlenmiş durumdadır, 2. Dam ile aynı hemimetillenmiş substrata sahip SeqA ve MutH protein homologları bulunmaktadır, 3. Dam enzimleri, replikasyon başlatıcı genini (*dnaA*) replikasyonun orijinininden (*oriC*) tecrit etmede görev görürler, 4. GATC sekansları, *oriC* ve *dnaA* promotorlarında yaklaşık 10 kat daha fazla temsil edilirler. GATC dizilerinin metilasyon durumu (metillenmiş, metillenmemiş, hemi-metillenmiş) DpnI, DpnII, Sau3A (BfuCI), Dam, SeqA ve MutH proteinlerinin spesifik bağlanmasını etkileyebileceğinden, bu tetranükleotidin promotor veya diğer DNA regülatör dizilerdeki varlığı da gen ifadesini etkiler. Bu durumda baskılayıcı veya aktivatör bağlanmasının önlenmesi veya teşvik edilmesi yoluyla gen ifadesi regüle edilir (Brezellec vd. 2006). *mtlA*, *cdd*, *flhD*, *gcd*, *yedZ*, *yffE*, *ppiA*, *proP* ve *srl* (gut) operonları yanında, *hrsA*, *kdgT* (*Fnr*), *pspA*, *yjdG* (*IHF*), *fep* (*Fur*), *carA* (*CarP*, *IHF*), *agn43* (*flu*) (*OxyR*), *ppiA* (*Lrp*, *CAP*) ve *yhiP* (*Lrp*) genlerinde de siklik AMP bağlayıcı protein (CAP) bağlanma bölgelerinde diferansiyel CAP bağlanması yoluyla Dam metilasyonu gerçekleştirilmektedir. Protein bağlanma bölgeleriyle örtüşen ve GATC içeren diğer genler: *hrsA*, *kdgT* (*Fnr*), *pspA*, *yjdG* (*IHF*), *fep* (*Fur*), *carA* (*CarP*, *IHF*), *agn43* (*flu*) (*OxyR*), *ppiA* (*Lrp*, *CAP*) ve *yhiP* (*Lrp*) olarak tanımlanmıştır. Promotorlarda metilasyon aktivitesine ait bazı özel koşullar tespit edilmiştir. Örneğin; karbamoil fosfat sentaz (*carA*) gen promotorunun GATC metilasyon seviyesinin kültürel koşullara bağlı bir değişim gösterdiği saptanmıştır. Arjinin ve pirimidinler mevcut olduğunda, söz konusu promotorda bunların yokluğundan daha fazla metilasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. *yhiP* geninde GATC'nin Lrp ile korunması, lösin varlığına gerçekleşmektedir. *RspA*, *ydjL*, *yahM*, *bhsA*, *yjdD*, *yhiP*, *yiaK*, *yidX* ve *yihU / V* genlerinin kod içermeyen bölgelerinde ek metillenmemiş GATC bölgeleri bulunmuştur, ancak bunların önemi henüz bilinmemektedir (Palmer ve Marinus 1994, Brezellec vd. 2006, Chahar vd. 2010).

E. coli'de bir ototransporter protein olan antijen 43'ü kodlayan gen (*agn43*) GATC dizilerine sahip tipik bir gen örneğidir. Bu gen, promotor bölgesinde üç - GATC- alanına sahiptir ve bunların metilasyonu, tam transkripsiyon başlangıcına yol açar. Gen replikasyonu sırasında, hemimetillenmiş DNA'ya, Dam, SeqA veya OxyR proteinleri bağlanabilir. Dam enziminin GATC dizilerine bağlanması sürekli transkripsiyona olanak sağlar. SeqA bağlanması ise geçici bir durumdur ve nihai olarak bu protein Dam ile yer

değiştirir. Bununla birlikte, OxyR bağlanması SeqA'dan daha sıkı bir şekilde meydana geldiğinden, Dam enzimini dışlayabilir. Böylece ikinci bir replikasyon turundan sonra, bağlı OxyR ile tamamen metillenmemiş bir promotor bölgesi oluşturulur ve gen transkripsiyonu bloke edilir (Kaminska vd. 2010). Metile edilmemiş dizilere ek olarak, hemimetillenmiş GATC bölgelerinde de gerçekleşen düzenleme, gen ifadesinin regülasyonunda görev almaktadır. Örneğin; Tn10'un transpozisyon frekansı, IS10 serisinin sağında yer alan iki spesifik GATC bölgesinde hareket eden Dam'ın hücresel konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Dam enziminin aşırı üretimi transpozisyonu azaltırken, *dam* mutantında transpozisyon oranının arttığı tespit edilmiştir. GATC alanlarından biri, transpozaz (tsp) promotorunun -10 bölgesiyle örtüşürken, diğeri, transpozisyon eylemi için hedef alanda ve IS10'un ucuna yakındır. Kopyalanmayan DNA'da bu bölgeler metillenmiştir ve transpozisyon için etkisizdir. Replikasyon sürecinde bu bölgeler hemimetile durumdadır, ancak bunlardan sadece biri transpozisyon için aktive edilir. Başka birkaç *E. coli* promotorunun, -10 veya -35 bölgelerinde GATC bölgeleri saptanmıştır. Bunlar *sulA*, *trpS*, *trpR*, *tyrR* ve *glnS* genleridir ve bu genlerin ifadesinin, doğal tip suşa kıyasla, *dam* mutantlarında arttığı belirlenmiştir (Barras vd. 1991). Söz konusu genlerin ekspresyonunun hemimetillenmiş konfigürasyonda artıp artmadığı ise, bilinmemektedir. Bu bulgular söz konusu genlerde transkripsiyonunun replikasyonla çakışma sorununun çözümüne işaret etse de, bu konuda net kanıtlar elde edilememiştir. TrpR baskılayıcı proteini için; *trpR* geninin *oriC* ve *trp* operonu arasında yer alması nedeniyle, *trpR* transkripsiyonundaki geçici bir artışın, operonun eşlenmesi (replikasyonu) meydana geldiğinde ihtiyaç duyulan Trp baskılayıcı konsantrasyonundaki artışı sağlayabilmesi ile açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak, bu doğrultuda yapılan çalışmalar, bu fikri desteklememiştir (Balbontin vd. 2006).

Doğal tip ve *dam* mutantlarında global gen ifadesi, *E. coli* ve *S. enterica*'da mikrodizin çalışmaları ile karşılaştırılarak, Dam enziminin genetik ifade üzerindeki etkinliğinin detaylı bir şekilde belirlenmesini hedefleyen çalışmalardan elde edilen veriler; genellikle farklı tür arka planları, deneysel hedefler ve deneysel koşullar ile dizayn edilmiş olduğundan, birbirleri ile karşılaştırılacak durumda değildir. Bununla birlikte, *dam* arka planında SOS gen ekspresyonunun aktivasyonu ve hareketlilikte düşüş her durumda tespit edilmiştir. RT-PZR yöntemi kullanarak bazı SOS genlerinin transkripsiyonundaki artışı

doğrulamıştır. Oshima ve arkadaşları (2002), artan SOS regülön ekspresyonuna ek olarak, aerobik solunum, amino asit ve nükleotit metabolizmasına dahil olan genlerin, *dam* mutant suşunda daha yüksek seviyelerde ifade edildiğini bulmuşlardır. Anaerobik solunum, flagellar biyosentez, kemotaksi ve hareketlilik üzerinde etkili genlerde ise, gen ifade seviyesinde düşme yönünde bir regülasyon tespit edilmiştir. *dam* mutantlarında dizi verilerine ek olarak, YeaF (hücre zarfı), G3P1 (gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz A), GroEL (ısı şoku tepkisi), Pgc (fosfoglisarat kinaz), SodA (süperoksit dismutaz) ve G3P1 (gliseraldehit 3 fosfat) proteinlerinin ifadelerinde de önemli düzeylerde düşmeler tespit edilmiştir (Riva vd. 2004). Løbner-Olesen ve arkadaşları (2003) tarafından yürütülen çalışmada; *dam*, *seqA* mutantları ve aşırı Dam ifadesi gerçekleştirilen suşların transkripsiyon profillerini karşılaştırıldığında, *seqA* mutantı ve *dam* geni aşırı ifade edilen hücrelerin profillerinin çok benzer olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç; SeqA'nın replikasyon çatalının arkasındaki hemi-metillenmiş bölgeye bağlandığını ve Dam enzimi yüksek konsantrasyonda iken, SeqA'nın bu işlevinin engellendiğini kanıtlamaktadır. SeqA'nın yokluğu kromozomal DNA'nın süperhelisitesi arttığından, transkripsiyon doğal tip hücrelerin fizyolojik süperhelisel yoğunluğuna bağlı olarak aktif olmayan promotorlarda başlatılabilir. *dam* mutantında, ifade seviyelerinde doğal tipe kıyasla önemli farklılıklar gösteren, SOS regülönü dışında genler de tespit edilmiştir. Bunlardan biri, *lac* füzyonları ile elde edilen *dnaA*'dır (Weitao vd. 2000). Diğer yandan bazı çalışmalarda SOS regülönünün doğal tip hücrelerde düşük bir seviyede ifade edildiği, ancak *dam* mutantında ifade seviyesinin çok yükseldiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *mutS* mutantı da, neredeyse *dam* mutantı kadar SOS regülön ifadesine sahip bulunmuştur. Bu nedenle SOS regülön genlerinin ekspresyonu, bir *dam* arka planında uyumsuz onarımın neden olduğu çift sarmallı kırılmalarla ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, doğası bilinmemekle birlikte, *dam* hücrelerinde bir indükleyici sinyal (muhtemelen RecA ile kaplanmış tek iplikli DNA) olarak işlev gören MutHLS kaynaklı çift iplikli kırılmaların işlenmesinden başka bir DNA substratı olmalıdır. Bu öngörü için bir olasılık, *dam* mutantlarında eşzamanlı olmayan çoğalmanın başlamasıyla ilgilidir. Birbirine çok yakın zamanlarda başlayan iki replikasyonda, çatalların birbirine çok yakın aralıkta olması nedeniyle çarpışma ve replikasyon çatalı çökmesi olayının meydana gelmesi kuvvetle muhtemeldir. Böylesi bir durumda açığa çıkacak çift sarmallı uç, RecBCD ekzonükleaz için bir substrat haline gelir ve bir *chi* bölgesi ile karşılaşıldığında, RecA

yüklü tek sarmallı DNA oluşturulur. Bu durum da SOS sinyali üretimi ile sonuçlanır (Seshasayee vd. 2007).

Salmonella patojenite adası SPI-1'deki istila genlerinin (konak hücre işgalini yöneten genler) transkript seviyeleri *dam* mutantlarında azalırken, *std* fimbriyal operonunun transkripsiyon oranının arttığı belirlenmesi, *Salmonella* virulanslığı ve patojenitesi üzerinde *dam* etkisinin tespit edildiği kritik bir bulgudur. Belirli flagellar (*fliCD*) ve kemotaksi (*cheR*, STM3216) genleri ve *lppB* lipoprotein geni için de doğal suş ve *dam* mutantlarında ifade düzeyi farklanmalarının tespit edilmesi, yukarıda anılan bulguları daha da önemli hale getirmiştir. *fli* ve *che* genlerinin azalan ekspresyonu, muhtemelen düşük hareketlilik sonucunu doğurmaktadır. Konjugatif virülans bir plazmit pSLT'nin transfer operon (*tra*) genleri, *dam* mutantlarında ifade artışı gösteren bir diğer grubu oluşturmaktadır. *dam* geni mutantlarının transkripsiyon profillerindeki tüm bu değişiklikler; muhtemelen azalan hareketlilik, zarlarda ve süpernatantlarda Std proteinin birikimi, zarf kararsızlığı ve indirgenmiş virülanslık ile ilişkilidir. Bu çalışma, patojenite adası ve flagella genlerinin karmaşık düzenlemesine yönelik daha fazla araştırma için temel oluşturmuştur (Chahar vd. 2010).

Dam metilasyonu ile modüle edilen gen ekspresyonunun örnekleri, bakteriyofaj sistemlerinde de açıklanmıştır. Bakteriyofaj Mu'nun *mom* geninin ekspresyonunun Dam metilasyonundan etkilendiği bulunmuştur. Faj yaşam döngüsünün sonlarında ifade edilen *mom* geni, adenini N6-karboksi-metil adenine dönüştüren bir modifikasyon enzimini kodlamaktadır. *mom* geni faj yaşam döngüsü için zorunlu bir gen değildir. Ancak mutantın kısıtlı bir konakçı aralığı vardır. Bu da *mom* geninin fonksiyonunun faj DNA'sını konak restriksiyon sistemlerinden korumak olduğunu düşündürmektedir. Dam metilasyonu, *E. coli* OxyR düzenleyici proteinin, üç GATC içeren faj Mu *mom* geninin yukarı akışındaki (upstream) 43-bç'lik bir bölgeye bağlanmasını önler (Hatman vd. 1997). OxyR bağlanmasının in vitro olarak metillenmemiş DNA substratlarında meydana geldiği gösterilmiş olmasına rağmen, bağlanmanın in vivo hemimetillenmiş bölgelerde meydana gelmesi olasıdır. Bağlandıktan sonra OxyR baskılayıcı, Dam'ın üç kritik GATC bölgesini metile etmesini engeller ve transkripsiyonun başlamasını, belki de RNA polimeraz üzerindeki trans-aktif edici C proteininin etkisine müdahale ederek önler. Son

olarak; faj Cre proteini, konağın enfeksiyonu sonrasında, faj DNA'sının kovalent olarak kapalı dairesel formunun oluşumunda rol oynayan bakteriyofaj P1'e özgü bir rekombinazdır. Yapısal genin promotörü -35 heksamerinde iki GATC içerir ve bunun transkripsiyonu Dam tarafından baskılanır (Garcia-del Portillo vd. 1999). Bu düzenlemenin biyolojik önemi henüz açıklanabilmiş değildir.

2.6.1 Dam enzimlerinin bakteriyel virülans üzerine etkisi

S. enterica'nın *dam* mutantlarında virülanslık, ilk olarak fare model sistemleri kullanılmak suretiyle araştırılmıştır. Oral ve intraperitoneal uygulamalar sonrasında söz konusu mutantlarda virülanslık, doğal tip suş ile karşılaştırıldığında, sırasıyla 1.000-10.000 kez daha düşük seviyelerde bulunmuştur (Garcia-del Portillo vd. 1999). *dam* mutantlarında virülansın düşmesi; bakteriyel tutunmanın, invazyonun ve hareketliliğin azalması yanında, zarf yapısında meydana gelen dengesizliğin ve safra tuzlarına karşı duyarlılığın gelişimi ile ilgili bulunmuştur (Heusipp vd. 2007). *dam* mutantındaki bu fizyolojik farklılıklar, muhtemelen safra duyarlılığı haricinde, yukarıda tartışıldığı gibi gen ekspresyonunun farklanmasından kaynaklanmaktadır. Bu faktörlerin kombinasyonu, özellikle zarf kararsızlığı, muhtemelen *dam* mutantı ile enfekte olmuş hayvanlarda yüksek düzeyde bağışıklık tepkisinden sorumludur. *S. enterica dam* mutantlarının safra duyarlılığı, büyük olasılıkla çift sarmallı DNA kırılmalarının oluşmasına tepki olarak yanlış eşleşme onarım sistemi tarafından öldürülmelerinden kaynaklanmaktadır (Pietro vd. 2006). Dam enziminin aşırı üretimi de *S. enterica*'da gen ifadesinin değişmesine yol açmaktadır. Bu etki, DNA'nın süper sarmalını değiştirerek veya hedef dışı metilasyon yoluyla global transkripsiyonu değiştiren *seqA* fenokopilerinin üretilmesi sonucu meydana gelebilir. Bir *S. enterica seqA* mutantının, oral uygulama yoluyla yürütülen hayvan denemelerinde azalmış virülans gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum söz konusu mutantın safra tuzlarına artan duyarlılığı ile açıklanmıştır (Pietro vd. 2007). Dam; *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Klebsiella pneumoniae*, enterohemorajik *E. coli* O157 gibi bazı patojenik bakterilerde virülansın önemli bir bileşenidir. Bu durum ayrıca *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* ve *Aeromonas hydrophila* gibi patojenlerde de doğrulanmıştır (Marinus vd. 2009).

Metilasyonun virölanslık üzerindeki etkileri, bu organizmalarda *dam* geni mutantları oluşturarak veya Dam enziminin aşırı üretimine yol açacak düzenlemeler yapılmak suretiyle incelenmiştir. Örneğin; *Yersinia enterocolitica*'nın tip III sekresyon sistemi üzerinde *dam*-aracılı bir düzenleyici etkinin Clp'ye bağlı proteoliz yoluyla ortaya çıktığı saptanmıştır (Falker vd. 2006). Tip III sekresyon sistemleri patojenik Gram-negatif bakterilerde yaygındır. Yukarıda ifade edilen bakterilere ek olarak, *dam* geninin, su ürünleri yetiştiriciliği için önemli bir balık patojeni olan *Edwardsiella ictaluri*'nin ve bir dış patojeni olan *Streptococcus mutans*'ın patogenezinde de önemli olduğu tespit edilmiştir. *Streptococcus mutans*'ın *dam* mutantında genel virölanslığın önemli ölçüde zayıfladığı veya karyojenik potansiyele sahip genlerin ifadesinin değiştiği saptanmıştır. Gram-negatif bakterilerin Tip VI sekresyon sistemleri (T6SS), bakteriyel öldürme ve / veya farklı konakçı hücrelere karşı virölanslı sorumludur. Hem *fur* (ferrik demir alımı için global transkripsiyonel baskılayıcı) hem de *dam*, enteroagregatif *E. coli*'de epigenetik anahtar olarak *sci1* (T6SS) gen kümesini düzenler (Sun vd. 2010, Banas vd. 2011). *dam*'dan etkilenen bir başka virölans ile ilişkili fenotip, *S. enterica*'da *dam* geni mutasyonundan, pSLT virölans plazmidini ile F ve F benzeri plazmidlerin konjugal transferinin etkilendiğinin belirlenmesi ile ortaya çıkarılmıştır. Virölans plazmid, retiküloendotelial sistemde proliferasyon için gerekli olan 7.8 kb *spv* bölgesini ve enfeksiyon sürecinin diğer aşamalarında rol oynayan diğer birkaç geni taşır. Kendiliğinden aktarılabilen plazmidin hücredeki varlığı, kendisini taşıyan bakterilere genişletilmiş bir konakçı aralığı yeteneği kazandırmaktadır. F ve F benzeri plazmidlerdeki konjugal transfer, *tra* (transfer) operonunun artan ekspresyonu nedeniyle hem *S. enterica* ve hem de *E. coli*'nin *dam* mutantlarında baskılanmaktadır. Artmış transkripsiyona, düzenleyici genler *traJ* ve *finP* üzerindeki etkiler aracılık eder. Dam metilasyonunun bu genler üzerinde ters etkileri söz konusudur. Örneğin; *traJ*'nin transkripsiyonu *dam* mutantında artarken, *traJ* ekspresyonunu antagonize eden küçük bir RNA olan *finP*'nin transkripsiyonu azalır. Bu etkiler arasındaki etkileşim, *tra* operon ifadesinin düzeyini belirler. *traJ* geninin ekspresyonu, *pap* geni gibi *dam* metilasyonundan etkilenir. Promotor bölgesindeki iki GATC'den birine Lrp bağlanması, *traJ* ekspresyonunun seviyesini kontrol eder ve hemimetillenmiş durumda kodlayıcı olmayan sarmala bağlanma, kodlama sarmalından daha yüksek oranda gerçekleşir. Bu durum; Tn10 transpozisyonunda olduğu gibi, *traJ* ekspresyonunun da replikasyonla

ilişkili olduğunu ve yavru plazmidlerden sadece birinin, hemimetilasyon statüleri gereği, transfer için aktive edileceğini göstermektedir (Camacho vd. 2005, Brunet vd. 2011).

2.6.2 Dam metilasyonunun *Salmonella*'nın virülanslığındaki rolü

Son yıllarda gerçekleştirilen genetik taramaların, transkriptomik ve proteomik analizlerin, hücre kültürü ve fare enfeksiyon modellerinde organ analizi çalışmalarının bir sonucu olarak, *Salmonella dam* geni mutantlarının fenotipik etkileri detayları ile aydınlatılmaya başlamıştır. Söz konusu mutantlarda bugüne kadar *dam* geni bozulması ile doğrudan ilişkili şu fenotipler belirlenmiştir; 1. *Salmonella dam* mutantlarında, doğal suşlara oranla, bağırsak epitelile etkileşime girme kapasitesinde ciddi bir azalma saptanmıştır. Buna bağlı olarak da epitel hücre istilası yeteneği düşmüştür (Garcia-del Portillo vd. 1999). Bu kusurun ana nedeni, *S. enterica* patojenite adası I'deki (SPI-1) genlerin baskılanması olarak tespit edilmiştir. *dam* mutantlarındaki verimsiz SPI-1 ifadesi, SPI-1 ana transkripsiyon aktivatörü HilD'nin seviyesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, *hilD* geninin *dam* bağımlı düzenlemesinin posttranskripsiyonel süreçte gerçekleştiğine dair kanıtlar da elde edilmiştir. 2. *Salmonella dam* mutantlarında hareketlilikte tipik olarak saptanan inhibisyon, konak hücre işgalinin zayıflatılmasının ana nedeni gibi görünmektedir. Transkriptom analizleri, *dam* mutantlarında flagellar genlerin ifadesinin farklı yönlerde etkilendiğini kanıtlamıştır. Bu durum, *dam* mutantlarında flagellar genlerin regülasyonunun modellenmesini zorlaştırmaktadır. 3. Dam metilasyonunun gerçekleşmemesi, dış zar veziküllerinin salınması ve proteinlerin sızması ile karakterize zarf istikrarsızlığına neden olmaktadır. Serbest veziküllerde Tol ve PAL zarf proteinlerinin peptidoglikana bağlanmasının bozulması sonucu protein sızıntısının meydana geldiğine dair bazı kanıtlar elde edilmiş olmasına rağmen, zarf kırılabilirliğinin artmasının bu duruma yol açtığına dair bulgular da saptanmıştır. Bu doğrultuda yürütülen ileri analizlerde, *dam* mutantlarındaki zarf kararsızlığına katkıda bulunan bir faktörün, Braun lipoproteinini kodlayan *lppB* geninin zayıflatılmış transkripsiyonu olabileceği tespit edilmiştir (Balbontin vd. 2006). 4. Laboratuvar koşullarında ifade edilmeyen *std* fimbriyal operonu, *dam* mutantlarında derepresyona uğramakta ve StdA fimbriyal proteini üretilmektedir. *dam* mutantlarının hücre ekstrelerinde tespit edilen en bol proteinlerden birinin Std proteini olduğu ileri

sürülmüştür. Std fimbriyanın *dam* mutantlarındaki bu ektopik üretim, *S. Enterica*'da virülanslığın zayıflaması ile sonuçlandığı düşünülmektedir (Pietro vd. 2007, Chessa vd. 2008). HdfR proteini *dam* ve *seqA* mutantlarında *std* ekspresyonunun aktivatörü olarak tanımlanmıştır. 5. *Salmonella dam* mutantları, büyük bir olasılıkla zarf kırılabilirliğinin oluşmasından dolayı, safra tuzlarının deterjan aktivitesine çok duyarlı hale geçmektedir. Bu durum da söz konusu mutantların konakçılarında sistemik kalıcılığını dramatik bir şekilde düşürmektedir. Ek olarak, replikasyon orijini uyumsuzluk onarımı için zincir tecridi, *dam* mutantlarını safra tuzlarının DNA'ya zarar veren aktivitesine karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Prieto vd. 2004). Konak enfeksiyonu esnasında safra tuzlarının neden olduğu DNA hasarı, *Salmonella* DNA onarım fonksiyonlarının geniş repertuarını harekete geçirmektedir. Safra tuzları ile bağlantılı DNA lezyonlarıyla başa çıkmak için Dam metil transferaz enziminin; yanlış eşleşme onarımının yanı sıra, baz eksizyon onarımını, SOS translezyon sentezini ve RecB aracılı rekombinasyonel onarımını da aktive ettiği saptanmıştır (Prieto vd. 2007). Safra tuzları zayıf mutajenler olmasına rağmen, yüksek safra konsantrasyonları, kalıcı ve kronik enfeksiyonlara yol açan *Salmonella* populasyonlarında genetik polimorfizmi artırma etkinliğine sahiptir (Low ve Casadesus 2008). Enterohemorajik *E. coli* OH157: O7'de kolonizasyon ve patogeneze sırasında kritik bir adım, aktin filamanlarının birikmesi ve yönlendirilmesidir. Bu sayede patojenin hücre içine girişine olanak tanıyan yönlendirilmiş fagositoz tetiklenir. Söz konusu sürecin de yine Dam metilasyonunun Tip III salgı sistemini etkilemesi yolu ile regüle edildiğine dair bulgular elde edilmiştir (Hayward vd. 2006).

Salmonella'da Dam metilasyon paternleri ile ilişkili fenotipler içerisinde en az çalışılan biyofilm yapılarıdır. Bu doğrultuda yürütülen çalışmalarda metilasyonun *Salmonella*'da ana biyofilm regülatörleri üzerindeki etkileri kısmen araştırılmış ve bazı serovaryetelerde, özellikle *csgD* promotorlarında metillenen hedef serilerin bu global regülatörün transkripsiyon düzeyini etkileyerek biyofilm oluşumunun durmasına yol açtığı belirlenmiştir (Aya Castaneda vd. 2015). Benzer çalışmalar SeqA proteini ile doğal ve mutant suşlarda yürütüldüğünde ise, *seqA* geninin *Salmonella*'da biyofilm oluşumu üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir (Abdelwaheb vd. 2015). Konu üzerinde yürütülen diğer çalışmalarda *Salmonella*'da ünite zar yapılarında bulunan lipidlerin Dam metilaz enzimlerinin ve SeqA proteininin varlığına bağlı olarak önemli oranda değişme gösterdiği

ve bu değişmelerin biyofilm oluşumunu istatistiki açıdan anlamlı düzeylerde etkilediği ileri sürülmüştür (Aloui vd. 2010, Abdelwaheb vd. 2015). *dam* ve *seqA* genlerinin *Salmonella* biyofilmleri ile ilişkisinin; doğal suşlar, onların *dam* ve *seqA* mutantları ve mutant genler bakımından komplementasyonu yapılmış konstraktlarında detaylı bir şekilde döküme edildiği tek çalışmada, kullanılan farklı serovaryetelerin tamamında biyofilm oluşumunun *dam* ve *seqA* genlerinin doğrudan regülasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Uğur vd. 2018).

2.7 RNA-Seq Analizleri

Geçtiğimiz 10 yıl içerisinde sürekli olarak gelişme gösteren RNA-Seq analizi ile ilgili teknikler, moleküler biyolojide genomik fonksiyona bakış açısını yeniden düzenleyen bir araç haline gelmiştir (Stark vd. 2019). Genelde diferansiyel gen ekspresyonunun (DGE) analizi için kullanılan RNA-sekansı standart bir laboratuvar çalışmasının ilk aşamasını oluşurmaktadır. Bunu; mRNA zenginleştirmesi, ribozomal RNA'nın uzaklaştırılması ve cDNA sentezi yapılmak suretiyle cDNA kütüphaneleri oluşturulması takip etmektedir (Stark vd. 2019). RNA dizi analizleri; mRNA işlenmesi (splicing) kapsamının ortaya çıkarılması, kod yapmayan RNA'lar ve güçlendirici (enhancer) RNA'lar tarafından gen ifadesinin regülasyonu gibi konularla ilgili çalışmalara ivme kazandırmıştır. Günümüzde, standart RNA sekans uygulamasından, neredeyse 100 farklı yöntem türetilmiş durumdadır ve bu alandaki çarpıcı gelişmeler, Illumina kısa sekans okuma cihazlarında gerçekleştirilmiştir (Illumina 2014). Ancak uzun okumalı RNA-seq ve doğrudan RNA sekans (dRNA-seq) tekniklerinde sağlanan son gelişmeler, yöntemin ileriye taşınmasına önemli katkılar sunmuştur (Byrne vd. 2017, Smith 2017, Garalde vd. 2018). Perkins ve arkadaşları (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Salmonella enterica* serovar. Typhi ve Typhimurium *ompR* reglonunun konak kolonizasyonunda yer alan genleri belirlemek için RNA-seq ve ChIP-seq yöntemlerini kullanmışlardır. Bu alışmada *S. Typhi* BRD948'in *ompR* reglonunda mevcut 208 gen mikroarray yöntemiyle belirlenirken, 305 gen ise RNA-seq analizleriyle tespit edilmiştir. *S. Typhimurium* zerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, bu cins bakterilerin hayatta kalmak ve makrofajlarda çoğalmak için kullandığı genetik programlama ile ilgili ayrıntılar, enfeksiyon sırasında hücre içi patojenlerin gen ekspresyonunu incelemenin zorluğu

nedeniyle belirsiz kalmıştır. Srikumar ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan çalışmada; transkriptom analizleri sonucu makrofajların enfeksiyonu sırasında *Salmonella*'nın transkripsiyonel mimarisi ve gen aktivitesi belirlenmiştir. Sonuç olarak *Salmonella* patojenite adası 14 (SPI14)'ün majör polisistronik transkriptinin, makrofaj içi ekspresyonunu kontrol eden STM0854'ün transkripsiyonel başlama bölgesi (TSS) dahil olmak üzere 45 yeni TSS tanımlanmıştır (Srikumar vd. 2015). Bir başka çalışmada, normal ve bağışıklığı yetersiz olan farelerde, *S. Typhimurium* sistemik enfeksiyonun doğası transkriptom analizleri ile incelenmiştir. Hem patojenin hem de konakçının transkriptomunun ve sistemin, bir bütün olarak değerlendirilebilmesi için metabolik yol ve proteomunun birlikte ele alındığı çalışmada; farelerden geri alınan *S. Typhimurium* suşlarına ait transkriptomik verilerin in-vitro olarak üretilen *S. Typhimurium* ile karşılaştırılması sonucu, sistemik enfeksiyonların doğasının belirlenmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Oshota vd. 2017). *S. Typhimurium* 14028 suşunun, *S. Typhimurium* LT2 ile transkriptomik olarak karşılaştırıldığı farklı bir çalışmada *dam* gen ekspresyonundaki farklı seviyelerin bakteriyel virülans gen ekspresyonu, motilitesi, flagellar sentezi, safra direnci ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre 14028 suşunda *dam* geninin aşırı ekspresyonunda bireysel hareket ve topluluk hareketi büyük oranda engellenirken, LT2 suşunda bir değişim belirlenmemiştir. Transkriptomik analizler sonucunda gen ekspresyonlarının farklı düzenlendiği saptanırken, ayrıca DNA metil transferaz enziminin diğer genler üzerindeki etkisi ve regülasyonu 14028 ve LT2 doğal suşlarının *dam* mutant suşlarla karşılaştırılması sonucunda belirli bir düzeyde ifade edilmiştir (Badie vd. 2007). Özetle transkriptomik analizler *Salmonella*'da gen ifadesinin düzenlenmesi ve çevresel yanıtların geliştirilmesine ilişkin bilinmeyenlerin aydınlatılmasında temel araçlardan biri haline gelmiştir



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri suşları ve gelişme koşulları

dam geni mutantı ve doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu laboratuvarımızdaki kültür koleksiyonumuzdan alındı. Suşlar, Luria Bertani Broth (LB) besi ortamında 37 °C’de 200 rpm çalkalama hızında 18 saat süre ile üretildi. *dam* geni bakımından mutant suşumuz kloramfenikol gen kaseti içerdiği için üreme ortamlarına kloramfenikol antibiyotiği (20 µg mL⁻¹) ilave edildi. Biyofilm denemesinde kullanılan bakteri örnekleri ise, tuz içermeyen LB Broth (LB^{-NaCl}) besi ortamında, 37 °C ve 20 °C’de statik koşullarda üretildi. Çalışma süresi boyunca tüm kültürler steril mikrosantrifüj tüplerine % 15 oranında gliserol eklenerek -20 °C ve 80 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2 Besiyerleri ve çözeltiler

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

İçerik g/L

Trypton	10
Maya Ekstratı	5
Sodyum Klorid	10
Agar	15

Kalkoflor (40µg/mL) İçeren Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl’siz)

İçerik g/L

Trypton	10
Maya Ekstratı	5
Kalkoflor	0,04
Agar	15

Luria Bertani (LB) Broth (NaCl'siz)

İçerik g/L

Trypton	10
Maya Ekstratı	5

Kongo Red'li LB Agar (Selülaaz Aktivitesi) g/L

İçerik g/L

Trypton	10
Maya Ekstratı	5
Sodyum Klorid	10
Karboksimetil selüloz	% 5
Agar	15

3.1.3 Çözeltiler

PBS (Fosfat Salın Tamponu) g/L

NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

%33'lük Glasiyel Asidik Asit Solüsyonu

Glasiyel Asedik Asit	33 mL
dH ₂ O	67 mL

% 95'lik Metanol

Metanol	95 mL
dH ₂ O	5 mL

Kristal viyole

Kristal viyole 1 g
dH₂O 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

Proteinaz-K Stok Çözeltisi (mg/mL)

Proteinaz-K 20 mg
dH₂O 1 mL

Alfa-amilaz Stok Çözeltisi mg/mL

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

Nisin Stok Çözeltisi mg/mL

Nisin 20 mg

0,1 N HCl 1 mL

Siprofloksasin Stok Çözeltisi mg/mL

Siprofloksasin 25 mg

0,1 M HCl 1 mL

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

CTAB 15 mg

dH₂O 100 mL

EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit) Stok Çözeltisi 0,05 M

EDTA 18,612 mg

dH₂O 100 mL

SDS (Sodyum Dodezil Sülfat) Stok Çözeltisi mg/mL

SDS 100 mg

dH₂O 1 mL

Tween-80 Stok Solüsyonu

Tween-80 1,09 g

dH₂O 1 mL

3.2 Yöntem

3.2.1 *Salmonella* suşlarının polistiren yüzeylerde biyofilm üretim özelliklerinin belirlenmesi

Salmonella suşlarının polistiren üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Vestby ve arkadaşları (2009) ve Stepanovic ve arkadaşları (2000) tarafından önerilen yöntemler modifiye edildi. Bu amaçla, NaCl içermeyen 5 mL'lik LB sıvı besiyerlerinde 37°C'de, çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dk) bir gece boyunca (18 saat) geliştirilen aktif kültürlerden, 30'ar µL alınarak 100 µL NaCl'siz LB besiyeri ihtiva eden kuyulara inoküle

edildi. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitre plakalar, 24, 48, 72 saat süresince ve 20 °C’de, polistiren yüzeylere tutunma ve mikrokoloni oluşumunun teşviki için, statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde, kuyular 2 defa steril fosfat tuzlu tamponla (PBS) yıkandıktan ve plakalar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, % 95 konsantrasyonunda metanol uygulanarak, 10 dakika süresince fikse edildi. Bu işlemin ardından, 130 µL (% 0,1 hacim/gram) kristal viyole çözeltisi biyofilm geliştirilen kuyulara aktarıldı. Boya inkübasyonu için plakalar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra plakalar, steril distile su ile 2 kez yıkandı. Biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi için kuyulara 130 µL (% 33 hacim/hacim) glasiyel asetik asit aktarıldı ve plakalar 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde çözünen kristal viyole miktarı, OD₅₉₅ nm’ de ELISA okuyucusunda (Thermo Scientific Multiskan Go, USA) ölçüldü. Bu deneme, tüm suşlar için sekiz paralel ve iki tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Biyofilm ölçümlerinin sonucu her sekiz paralelden alınan OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca NaCl’siz LB sıvı besiyeri içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamasının çıkarılmasıyla hesaplandı.

3.2.2 Glukoz’un biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi

Polistiren yüzeyde biyofilm oluşum deneyleri (3.2.1.’de kullanılan yöntemle) kurulurken daha önce hazırlanmış % 1, % 2 ve % 3 oranlarında glukoz içeren LB^{-NaCl}, 96’lık mikrotitre plakalarda bulunan kuyuların her birine 100 µL hacimlerde aktarıldı. Öncesinde spektrofotometrede OD₅₉₅ 0,2 ye ayarlanmış 30 µL (18 saat 37 °C de çalkalamalı inkübatörde aktifleştirilmiş) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* geni bakımından mutant 14028 suş kültürleri kuyulara inoküle edildi. Pozitif kontrol olarak *S. Typhimurium* doğal ve Δdam suşlar glukoz eklenmemiş LB^{-NaCl} besiyerinde geliştirildi. İnokülasyondan sonra mikrotitre plakalar 20 °C’de 28 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Çalışılan 96 kuyulu plak düzeni oluşturulurken her zaman dilimi ve her örnek için 2 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde deneme deseni oluşturuldu. Biyofilm yapılarının kantitatif tayinleri yöntem 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

3.2.3 Safra tuzlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi

Polistiren yüzeyde biyofilm oluşum deneyleri (2.5.'de kullanılan yöntemle) kurulurken daha önce hazırlanmış % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5, % 0,6, % 0,7, % 0,8, % 0,9 oranlarında safra tuzu içeren LB^{-NaCl}, 96'lık mikrotitre plakalarda bulunan kuyuların her birine 100 µL miktarlarında aktarıldı. Bu işlem öncesinde, spektrofotometrede OD₅₉₅ 0,2 ye ayarlanmış 18 saat 37 °C de çalkalamalı inkübatörde aktive edilmiş *S. Typhimurium* doğal suş ve *dam* geni bakımından mutant suş kültürlerinden 30 µL kuyulara inoküle edildi. Pozitif kontrol olarak *S. Typhimurium* doğal tip ve onun Δdam suşları glukoz eklenmemiş LB^{-NaCl} besiyerinde geliştirildi. Hazırlanan plakalar 20 °C 28 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Çalışılan 96 kuyulu plak düzeni oluşturulurken her zaman dilimi ve her örnek için 2 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde deneme deseni oluşturuldu. Biyofilm yapılarının kantitatif tayinleri yöntem 3.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

3.2.4 Biyosüpfaktanlar ve biyoenzimlerin biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi

S. Typhimurium suşları (doğal tip ve Δdam) 5 mL'lik NaCl içermeyen LB besi ortamlarında % 1 oranında inokülasyon yapılarak 37°C de 18 saat 200 rpm çalkalamalı inkübatörde geliştirildi. İnkübasyon sonrası aktif kültürler, son konsantrasyonu OD₅₉₅=0,2 ABS olacak şekilde dilüe edildi. Biyofilm miktarının hesaplanması için 96 kuyulu mikrotitrasyon plaklarına 100 µL LB^{-NaCl} eklendi ve üzerine plak düzenine göre sırasıyla 30 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan biyoenzim veya biyosüpfaktan aktarıldı. Ardından bu kuyulara, dilüe edilen suş kültürlerinden 30 µl ilave edildi. Kontrol kuyularına ise, sadece besiyeri konuldu. Bakteri ve kullanılan ajanları içeren mikrotitrasyon plakları 24, 48, 78 saat süresince 20 °C'de statik koşullarda inkübe edildi. Çalışılan 96 kuyulu plak düzeni oluşturulurken her zaman dilimi ve her örnek için 2 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde deneme deseni oluşturuldu. İnkübasyon süresi bitiminde, öncelikle kuyularda bulunan süpernatant uzaklaştırıldı, besiyeri ve planktonik hücrelerinden tamamen arındırmak için kuyular 3 defa içerisinde bulunan total süspansiyon miktarı kadar (160 µL) PBS ile yıkandı ve 5 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Biyofilm yapılarının kantitatif tayinleri yöntem 3.2.1'de anlatıldığı şekilde

gerçekleştirildi. Kullanılan biyoenzim ve biyosüpfaktanların konsantrasyonları ve kombinasyonları aşağıdaki çizelgede (Çizelge 3.2) olduğu şekilde hazırlandı.

Çizelge 3.2 Denemelerde kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları

Biyosüpfaktanlar	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	Ciprofilaxacin (0,25 µg/µl- 0,5 µg/µl- 5 µg/µl)
	Proteinaz-K (0,2 mg/mL- 0,4 mg/mL- 4 mg/mL)
	Alfa-amilaz (0,5 mg/mL- 1 mg/mL- 5 mg/mL)
	Nisin (1 mg/mL- 5 mg/mL- 10 mg/mL)

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+ cip 5 µg/mL	B
Nisin 1 mg/mL + EDTA 10 mM + CIP5 µg/mL	C

3.2.5 Transkriptomik analiz için gerçekleştirilen biyofilm denemeleri

Biyofilm üretimi için; 37°C’ de 18 saat tuzsuz Luria Bertani Broth (LB^{-NaCl}) ortamında statik koşullarda üretilen suş kültürlerinden 400’er µL alınarak 4600 µL steril LB^{-NaCl} içeren 90 mm’lik petri plaklarına inoküle edildi (Uğur vd., 2018). Daha önce yapılan çalışmalarda maksimum biyofilm düzeyine ulaşması için belirlenen sıcaklık ve sürede, yani 20 °C’ de 72 saat boyunca bu ortamlar inkübasyona tabi tutuldu. *dam* geni bakımından mutant olan *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilm üretim denemelerinde biyofilm kapasitelerinin önemli ölçüde azaldığı, daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olduğundan (Uğur vd. 2018), mutant suşun oluşturduğu biyofilm yapılarından izole

edilecek RNA'nın yeterli olması için en az 3 kuyudan alınan biyofilm örnekleri birleştirilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Biyofilm denemelerinde 20°C' de 72 saat süren inkübasyon tamamlandıktan sonra, Petri plaklarında bulunan içerik tutunan hücrelerin kopmamasına dikkat edilerek uzaklaştırıldı ve zayıf tutunan hücrelerin çıkarılması için soğutulmuş fosfatla tamponlanmış su (PBS) ile 3 kez yıkandı (bu aşamalarda oluşan biyofilm tabakasının kurumamasına dikkat edildi.). RNA izolasyonu basamağı öncesinde biyofilm hücrelerinin toplanması amacı ile her bir Petri plağına 4 mL steril LB broth aktarıldı ve hücre kazıyıcı (cell scraper) yardımı ile Petri plaklarının tabanında ve çevresinde oluşan hücreler toplandı. Toplanan hücreler steril tüplere aktarılacak 4000xg' de (+4 °C' de) 10 dk boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen hücre çökeltisi RNA izolasyonunda kullanıldı.

3.2.6 Biyofilm yapılarından total RNA izolasyonu

Bir önceki aşamada anlatıldığı şekilde (3.2.5) biyofilm örneklerinden elde edilen hücre çökeltisi 0,2 mL PBS ile çözüldü. İzolasyon işlemi Favorgen firması tarafından optimize edilmiş Favorprep isimli kit ile yapıldı. 1×10^9 yoğunluktaki hücre kültürleri 2 mL'lik vidalı mikrosantrifüj tüplerine alındıktan sonra, 18000xg'de +4 °C sıcaklıkta 2 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatant uzaklaştırıldı. Tüplerde santrifüj sonrası elde edilen hücre çökeltisi üzerine, bakterilerin hücre duvarını parçalaması için kit protokolüne göre hazırlanmış 0,1 mL lizozim solüsyonu ilave edilip, 37 °C'lik ısı plakasında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu ortama; kitin içinde bulunan FARB tamponundan 0,35 mL ve proteinlerin lize edilmesi için β -Merkaptoetanol solüsyonundan 0,0035 mL muamele edildi. Bu karışımlar üzerine 250 mg asitle yıkanmış 500~700 μ m çapında cam boncuklar aktarılacak 5 dakika karıştırıldı. Bu ortamlar 18000xg'de 2 dakika oda koşullarında santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra, süpernatant farklı steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Süpernatantın üzerine, süpernatant hacmi kadar % 70'lik ribonükleazsız etanol eklenerek karıştırıldı ve karışım mikro kolon tüpünün membran filtresinin merkezine aktarılıp 18000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra, 0,06 mL ribonükleazsız DNase 1 solüsyonu, membranda tutunmuş olan DNA

materyalini uzaklaştırmak için mikro kolon tüpünün membranı üzerine aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Mikro kolon tüpüne kitin içerisinde bulunan yıkama tamponundan (WB1) 0,5 mL eklenerek, 18000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra, kitin içerisinde bulunan ikinci yıkama tamponundan (WB2) 0,75 mL mikro kolon tüpüne aktarıldı ve tekrar 1 dakika 18000xg'de santrifüj işlemi yapıldı (2 kez). Son aşamada kolon 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı, kolon membranına 0,04~0,1 ml steril dH₂O eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. 18000xg'de 1 dakika santrifüj işlemi ile elde edilen ve Nanodrop'ta saflığı ölçülen RNA örnekleri - 80°C'de saklandı.

3.2.7 Biyofilm yapılarından miRNA izolasyonu

Biyofilm yapılarından miRNA izolasyonu işlemi için, Favorgen firmasının FavorPrep miRNA İzolasyon Kiti kullanıldı. İzolasyon işlemi, kit protokolünde 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 *dam* 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. Bu süre bitiminde ortama 20 µL 2M NaOAc (pH=5.2) eklendi. Sonrasında 180 µL doymuş fenol ve 40 µL kloroform solüsyonu ilave edilerek ortam karıştırıldı. Bu şekilde hazırlanan preparatlar 3 dk 12000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, oluşan üst faz temiz mikro santrifüj tüpüne alındı. Söz konusu ortama, bir önceki aşamada alınan üst fazın % 35'i oranında etanol eklenerek tüp içerikleri karıştırıldı. Elde edilen süspansiyon steril toplama tüpüne yerleştirilen RNA kolonuna aktarılıp 1 dk inkübe edildi. Bu süre bitiminde 30 saniye 12000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süzüntü üzerine % 70 oranında etanol eklendi. Toplama tüpündeki karışım farklı steril bir RNA kolonuna aktarılıp 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminde ortam 30 saniye süresince 12000 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutuldu. Bu aşamada kolon zarına bağlanan miRNA'nın geri kazanılması için yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Kit içeriğinde bulunan “Wash Buffer” 200 µL olacak şekilde RNA kolonu üzerinden eklendi ve 1 dakika süresince oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı. Yıkama işlemi yapılan ortam 1 dakika 12000 rpm’de santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra, RNA kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Kolonun tam merkezine 50 µL “Release Buffer” eklenerek 3 dk inkubasyona bırakıldı. miRNA’yı geri kazanmak için 12000 rpm’de 3 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Saflaştırılmış miRNA ihtiyaca göre standart etanol çöktürme 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 örnekleri 80°C’de saklandı.

3.2.8 rRNA Uzaklaştırılması Basamağı

Denemeler sonucunda elde ettiğimiz total RNA örnekleri RiboMinus Transcriptome Isolation Kit, Bacteria (Thermo Fisher Scientific, Cat No:K155004, USA) kullanılarak büyük rRNA (18S ve 23S) moleküllerinden arındırıldı.

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 PCR 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 içerisinde 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 ile *dam* 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.

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

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 haritası ve hiyerarşik kümelendiğinde; Kırmızı daha düşük bir mRNA ifade seviyesini ve yeşil ise, daha yüksek bir mRNA ifade seviyesini ifade etmektedir.

3.2.13 Bakterilerin yüzme ve yayma hareketinin belirlenmesi

Bu denemede *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)14028 doğal suşu ve onun Δdam mutantında, flagella ile gerçekleştirilen “swimming” ve “swarming” hareketleri belirlenmiştir. “Swimming” motilite akışkan ve sıvı ortamlarda bireylerin flagella hareketi (rotasyonu) yardımıyla yaptıkları yer değiştirmedir. “Swarming” motilite ise yine flagella desteği ile çok hücreli harekettir.

“Swimming” motilite, 28 ° C'de 5 saat ve 37 ° C'de 4 saat inkübe edilen % 0,3 oranında agar içeren LB agar plakalarında, 37 ° C'de bir gecelik LB plaka kültüründen tek bir koloni ile aşılama sonrası gözlemlendi. “Swarming” motilite, 37 ° C'de bir gece LB plaka kültüründen tek bir koloni ile aşılama sonrası 28 ve 37 ° C'de % 0,5 glikoz ile takviye edilmiş % 0,5 LB agar plakalarında analiz edildi. Aşılama noktasından hareketlilik bölgesinin kenarına kadar olan yarıçap 4 saat inkübasyondan sonra ölçüldü. Tüm deneyler iki paralel ve 4 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi (Ahmad vd. 2016).

3.2.14 Selülaz aktivitesi

Selülaz aktivitesinin değerlendirilmesinde agar kuyu difüzyon testi uygulandı. Mutant ve doğal tip kültürler % 5 oranında karboksimetil selüloz içeren ve NaCl içermeyen LB sıvı besiyerinde 18 saat çalkalamalı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS içerisinde OD₆₀₀=5 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 selülaz etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirildi (Ahmad vd. 2016).

3.2.15 Kalkoflor Bağlanma Deneyi

Çalışılan suşlar, selüloz indikatörü olan kalkofloru içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl'siz LB agar besiyerlerinde üretildi. Bu ortamlar 20 °C'de 8 gün süresince inkübasyona bırakıldı ve suşlar bir hücre dışı matriks bileşeni olan selülozu üretilip üretilmediklerine göre 366 nm UV ışık altında değerlendirmeye tabi tutulup fotoğraflandı (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).

3.2.16 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 7.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Şekillerde gösterilen veriler, 3-8 farklı deneyin tekrarlanan örneklerinden elde edilen ortalama $\pm$ standart hatadır (SEM). İstatistiksel analiz, Bonferroni'nin post-hoc testi ile iki kuyruklu Student t testi veya tek yönlü ANOVA ile gerçekleştirildi. P <0,05 değerleri anlamlı kabul edildi.

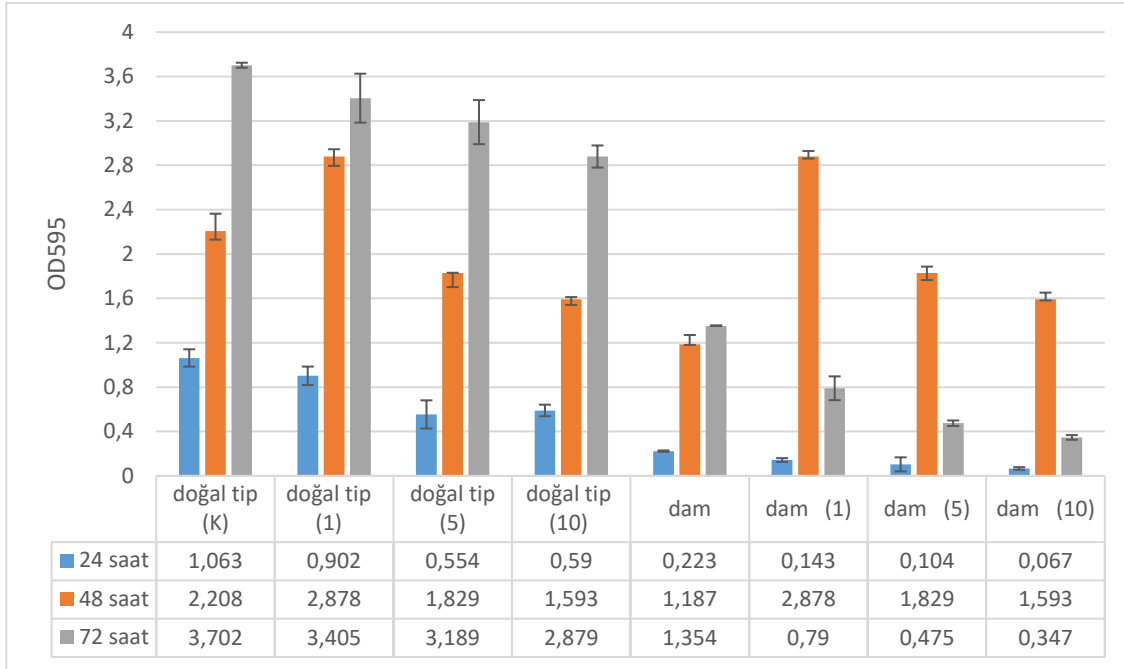


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Nisin'in, Biyoenzimlerin ve Biyosüpfaktanların Polistiren Yüzeyde Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri

4.1.1 Nisin

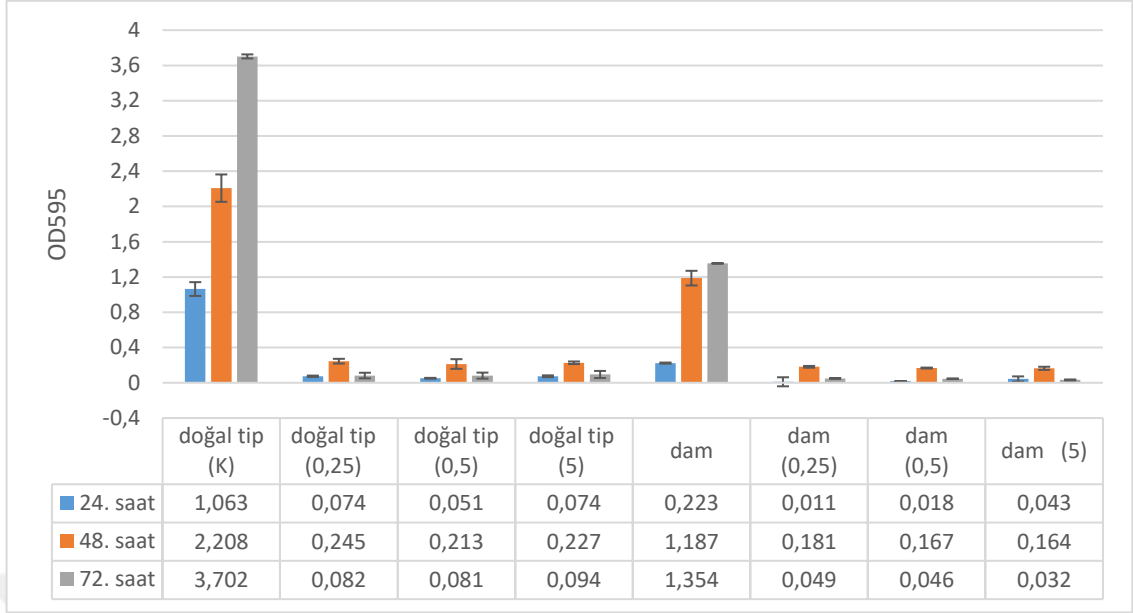
Nisin'in biyofilm yapısı üzerine etkisini incelemek amacıyla suşların, 1 mg/mL - 5 mg/mL - 10 mg/mL konsantrasyonlarında nisin varlığında, denenen suşların biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typimurium* doğal tip (wt) suşunun biyofilm üretim kapasitesi; 1 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında nisin içeren ortamda 24. saatte sırasıyla; % 15,15, % 47,89 ve % 44,5 oranında, 48. saatte ise 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 ve % 27,86 oranında düştü. Doğal suшта biyofilm üretimi kapasitesi 72. saatte sırasıyla; % 8,03, % 13,86 ve % 22,24 oranlarında düşüş gösterdi. *dam* mutant suşun 24 saatte ürettiği biyofilm kapasitesi incelendiğinde, 1 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 35,87 oranında azalma, 5 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 53,36 oranında azalma, 10 mg/mL nisin eklenen örneklerde biyofim miktarında % 69,96 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarlarında, 1 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 142,46 oranında artış, 5 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 54,09 oranında artış, 10 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 34,02 oranında artış saptandı. 72. saatte üretilen biyofilm kapasitelerinde ise, 1 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 41,66 oranında azalma, 5 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 64,9 oranında azalma ve 10 mg/mL nisin eklenen örneklerde % 74,37 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.1).



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

4.1.2 Sipprofloksasin (CIP)

S. Typhimurium doğal tip (wt) suşunun biyofilm üretim kapasitesi 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 5 µg/mL konsantrasyonlarında sipprofloksasin 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. *dam* mutant suşunda 24 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 0,25 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 95,07 oranında azalma, 0,5 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 91,93 oranında azalma, 5 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 80,72 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarında, 0,25 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 84,75 oranında azalma, 0,5 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 85,93 oranında azalma, 5 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 86,18 oranında azalma saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı dikkate alındığında, 0,25 µg/mL sipprofloksasin eklenmiş örneklerde % 96,38 oranında azalma, 0,5 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 96,6 oranında azalma ve 5 µg/mL sipprofloksasin eklenen örneklerde % 97,64 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.2).

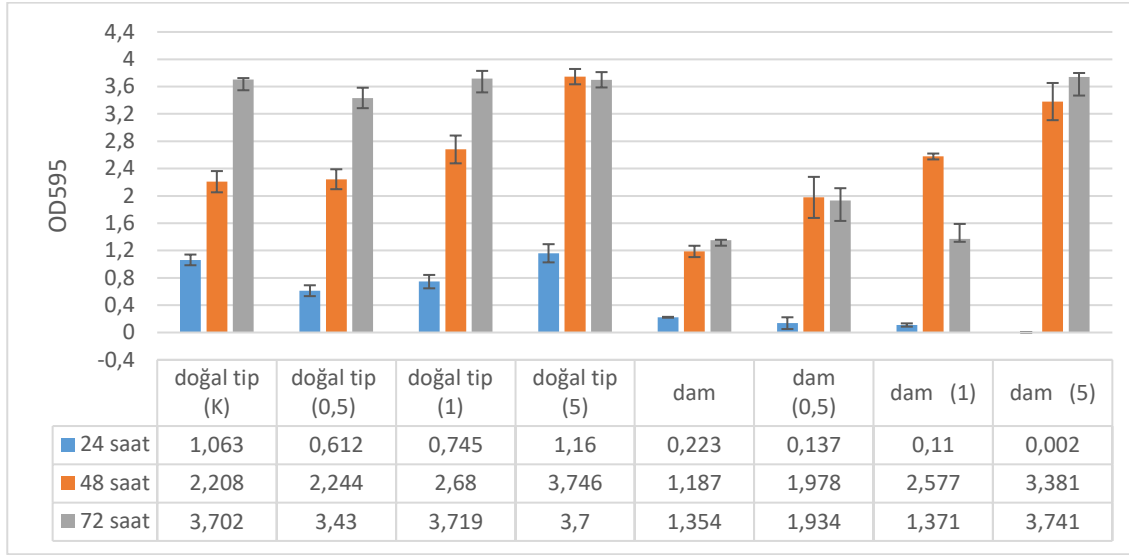


Şekil 4.2 Siproflaksasin'in (0,25 µg/µL, 0,5 µg/µL ve 5 µg/µL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

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 konsantrasyonlarda hazırlanan α -amilaz çözeltisi, biyofilm üretme ortamlarına ilave edildi. *S. Typimurium* doğal tip (wt) suşunun biyofilm üretim kapasitesinde; 24. Saatte, 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında α -amilaz içeren ortamda sırasıyla; % 42,43 ve % 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 konsantrasyonlarında α -amilaz varlığında sırasıyla; % 1,63 % 21,37 ve % 69,67 oranında artış meydana geldi. 72. Saatte 0,5 mg/mL konsantrasyonunda α -amilaz içeren ortamda biyofilm üretimi % 7,35 oranlarında azalma gösterirken, 1 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarında anlamlı bir farklanma saptanmadı. *S. Typimurium dam* mutant suşunda 24 saatte üretilen biyofilm kapasitesinde, 0,5 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 38,57 oranında azalma, 1 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 50,67 oranında azalma, 5 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 99,1 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm kapasiteleri incelendiğinde, 0,5 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 66,64 oranında artış, 1 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 117,1 oranında artış, 5 mg/mL α -amilaz

eklenen örneklerde % 184,84 oranında artış saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm kapasitesi incelendiğinde, 0,5 mg/mL oranında α -amilaz eklenen örneklerde % 42,84 oranında artış, 1 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 1,26 oranında artış ve 5 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde % 176,3 oranında artış gözlemlendi (Şekil 4.3).

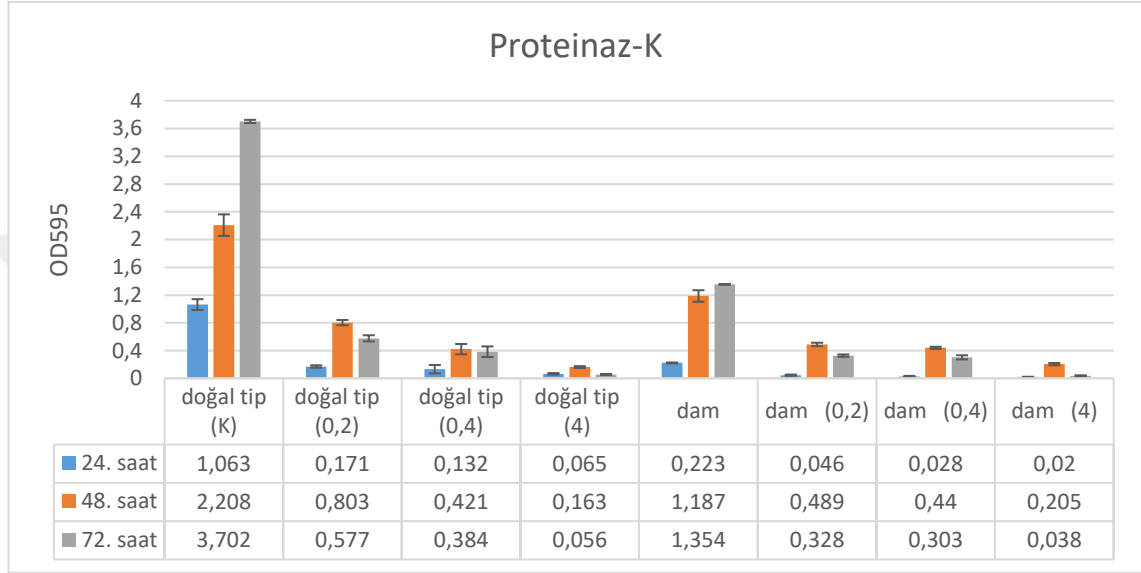


Şekil 4.3 Alfa amilaz'ın (0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 5 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.4 Proteinaz-K

Proteinaz K'nın biyofilm hücreleri 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* 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. Proteinaz-K eklenen *dam* mutant suşunda 24. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde 0,2 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 79,37 oranında azalma, 0,4 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 87,44 oranında azalma, 4 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 91,03 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 0,2 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 58,8 oranında azalma, 0,4 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 62,93 oranında azalma,

4 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 82,73 oranında azalma saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 0,2 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 75,78 oranında azalma, 0,4 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 77,62 oranında azalma ve 4 mg/mL proteinaz-K eklenen örneklerde % 97,2 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.4).

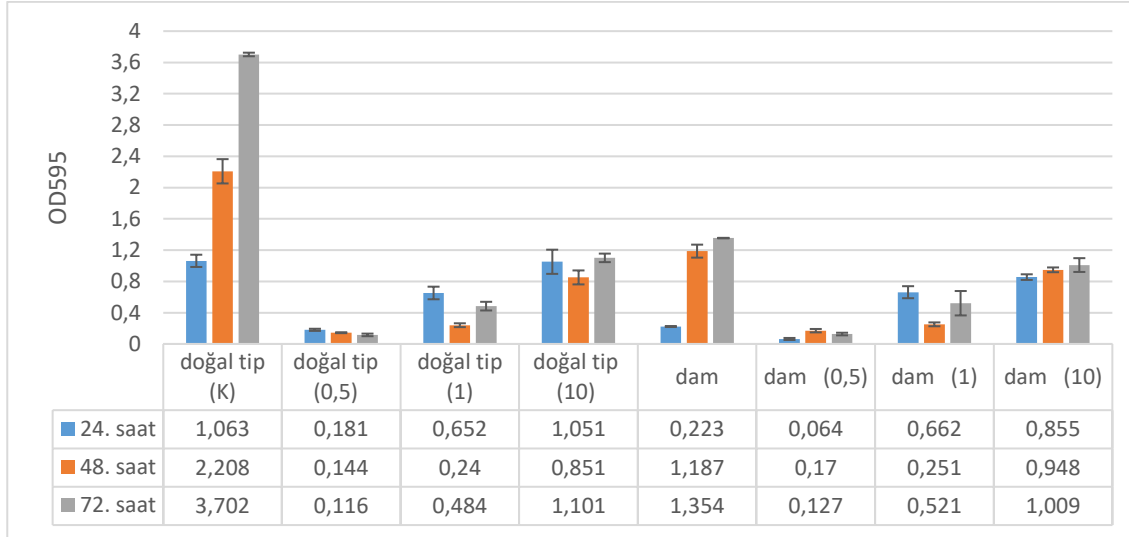


Şekil 4.4 Proteinaz-K'nın (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL ve 4 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.5 CTAB

CTAB'ın biyofilm hücreleri 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* 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 dam* mutant suşunda 24. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 0,5 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 71,3 oranında azalma, 1 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 196,861 oranında artış ve 10 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 283,41 oranında artış belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 0,5 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 85,68 oranında azalma, 1

mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 78,85 oranında azalma ve 10 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 20,13 oranında azalma saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde ise, 0,5 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 90,62 oranında azalma, 1 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 61,52 oranında azalma ve 10 mg/mL CTAB eklenen örneklerde % 25,48 oranında azalma tespit edildi (Şekil 4.5).

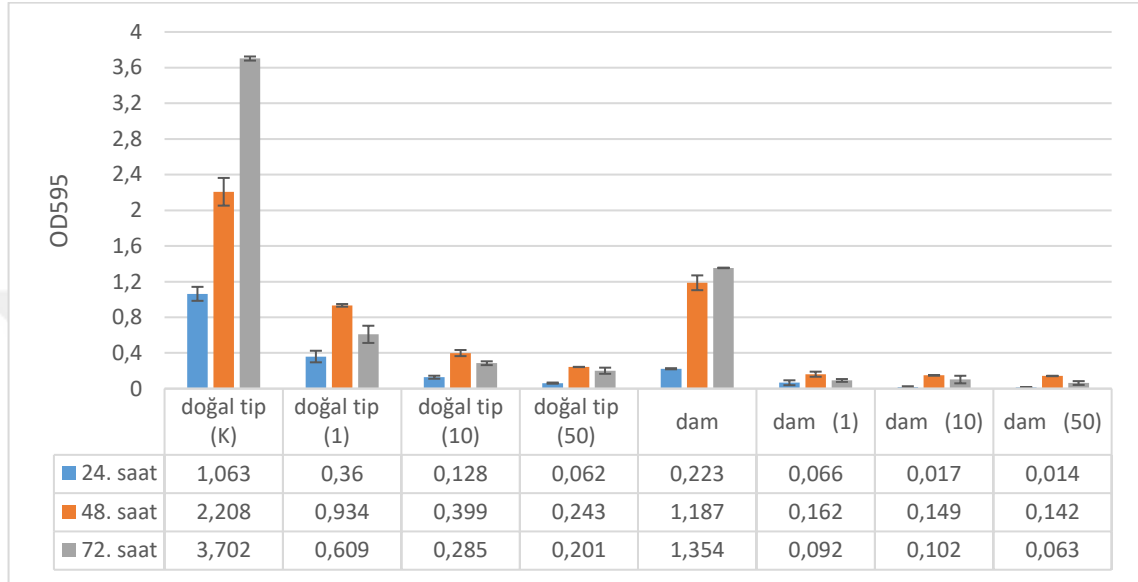


Şekil 4.5 CTAB'ın (0,5 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu *dam* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.6 EDTA

EDTA'nın biyofilm hücreleri üzerine etkisini incelemek amacıyla 1mM, 10mM ve 50mM konsantrasyonlarında EDTA varlığında, denemede kullanılan suşların biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typimurium* doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi 1mM, 10 mM ve 50 mM konsantrasyonlarında EDTA içeren ortamda 24. saatte sırasıyla % 66,13, % 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. Typimurium dam* mutant suşunda 24. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 1 mM EDTA eklenen örneklerde % 70,4 oranında azalma, 10 mM EDTA eklenen örneklerde % 92,38 oranında azalma, 50 mM EDTA eklenen örneklerde % 93,7 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 1 mM EDTA eklenen örneklerde % 86,35 oranında azalma, 10 mM EDTA eklenen örneklerde % 87,45 oranında azalma ve 50 mM EDTA eklenen örneklerde % 88,04 oranında azalma

saptandı. 72. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 1 mM EDTA eklenmiş örneklerde % 93,21 oranında azalma, 10 mM EDTA eklenen örneklerde % 92,47 oranında azalma, 50 mM EDTA eklenen örneklerde ise % 95,35 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.6).

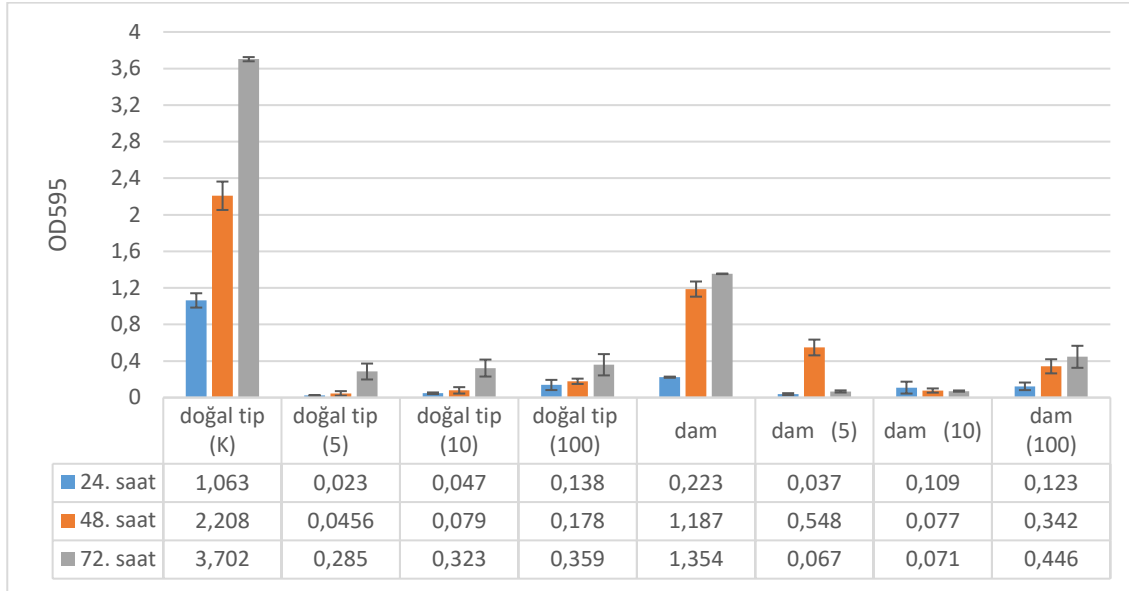


Şekil 4.6 EDTA'nın (1mM, 10mM ve 50mM) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.7 SDS

SDS'in biyofilm yapıları üzerine etkisini incelemek amacıyla 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında SDS varlığında, denemede kullanılan suşların biyofilm üretme kapasiteleri belirlendi. *S. Typimurium* 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. Typimurium dam* mutant suşunda 24. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 5 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 83,41 oranında azalma, 10 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 51,12 oranında azalma, 50 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 44,84 oranında azalma saptandı. 48. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde 5 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 53,83 oranında azalma, 10 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 93,51 oranında azalma, 50 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 71,19

oranında azalma tespit edildi. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde ise, 5 mg/mL SDS eklenmiş örneklerde % 95,05 oranında azalma, 10 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 94,76 oranında azalma, ve 50 mg/mL SDS eklenen örneklerde % 67,06 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.7).

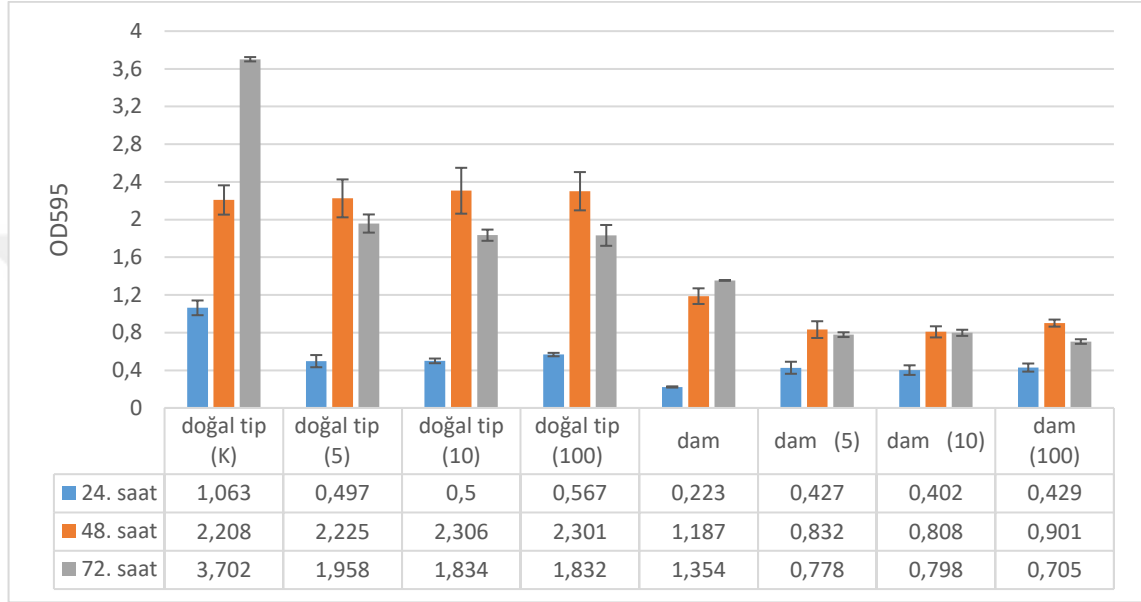


Şekil 4.7 SDS'in 5 mg/mL (10 mg/mL ve 100 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* mutantında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.8 Tween-80

Tween-80'in biyofilm hücreleri 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* 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 dam* mutant suşunda 24. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 5 mg/mL Tween-80 eklenen örneklerde % 91,48 oranında artış, 10 mg/mL Tween-80 eklenen örneklerde % 80,27 oranında artış ve 100 mg/mL Tween-80 eklenen örneklerde % 92,38 oranında artış belirlendi. 48. saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 5 mg/mL Tween-80 eklenen örneklerde % 29,91 oranında azalma, 10 mg/mL Tween-80 eklenen örneklerde % 31,93 oranında azalma, 100 mg/mL

Tween-80 eklenen örneklerde % 24,09 oranında azalma saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, 5 mg/mL Tween-80 eklenen örneklerde % 42,54 oranında azalma, 10 mg/mL oranında Tween-80 eklenen örneklerde % 41,06 oranında azalma ve 100 mg/mL oranında Tween-80 eklenen örneklerde % 47,93 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.8).



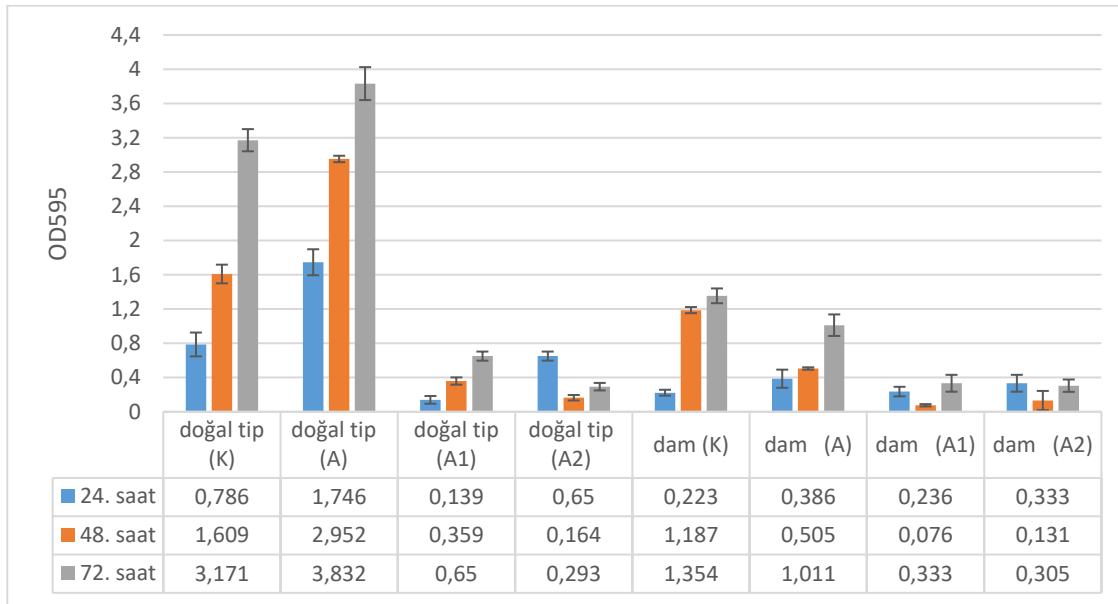
Şekil 4.8 Tween-80'in (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 100 mg/mL) *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *dam* mutantlarında biyofilm oluşumu üzerine etkisi

4.1.9 Nisin ve diğer antimikrobiyal ajanlarla yürütülen kombinasyon denemeleri

Bu amaçla, tek başına antibiyofilm aktivitesi yüksek bulunan antimikrobiyal ajanların nisin farklı konsantrasyonlarda kombinasyonları oluşturularak kullanıldı.

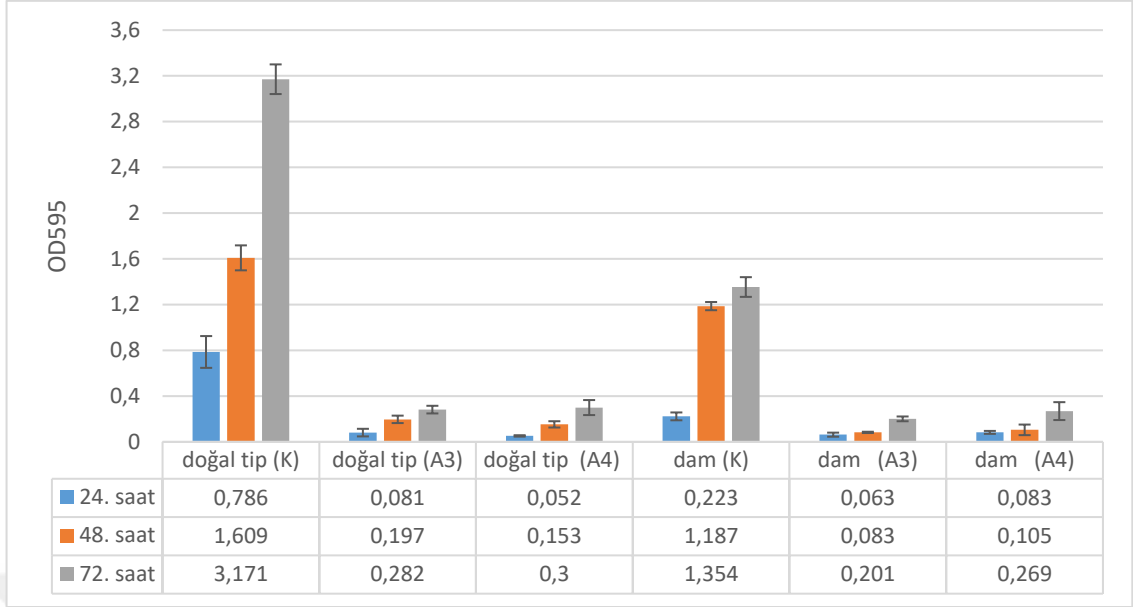
10 mg/mL nisin 1 mM EDTA ile kombinasyonu (A kombinasyonu) *S. Typhimurium* doğal tipte biyofilm üretimini tetiklemiştir. A kombinasyonunda, *S. Typhimurium* doğal tip (wt) suşunun biyofilm üretim kapasitesi 24, 48 ve 72 saatlerde sırasıyla % 122,13, % 83,46 ve % 20,84 oranında artış gösterdi. *dam* geni bakımından mutant suşta 24 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, nisin 10 mg/mL+ EDTA 1 mM (A) eklenen örneklerde % 73,1 oranında artış, nisin 10 mg/mL + edta 10 mM (A1) eklenen örneklerde % 5,83 oranında artış, nisin 10 mg/mL + edta 50 mM (A2) eklenen örneklerde % 49,33

oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, nisin 10 mg/mL+ EDTA 1 mM (A) eklenen örneklerde % 57,46 oranında azalma, nisin 10 mg/mL + EDTA 10 mM (A1) eklenen örneklerde % 93,6 oranında azalma, nisin 10 mg/mL + EDTA 50 mM (A2) eklenen örneklerde % 88,96 oranında azalma, nisin 1 mg/mL+ EDTA 50 mM (A3) eklenen örneklerde % 93,01 oranında azalma saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, nisin 10 mg/mL+ EDTA 1 mM (A) eklenmiş örneklerde % 25,33 oranında azalma, nisin 10 mg/mL + EDTA 10 mM (A1) eklenen örneklerde % 75,41 oranında azalma, nisin 10 mg/mL + EDTA 50 mM (A2) eklenen örneklerde % 77,47 oranında azalma belirlendi (Şekil 4.9).



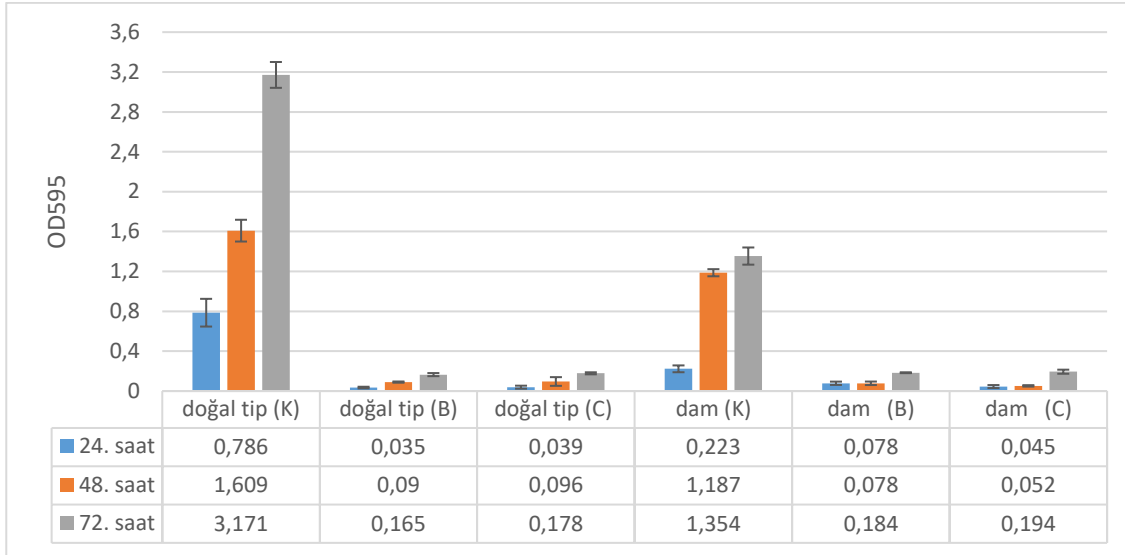
Şekil 4.9 A, A1 ve A2 kombinasyonlarında hazırlanan preparatların (Çizelge 3.3) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve *dam* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

A3 kombinasyonunda, *S. Typhimurium* 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 dam* mutantında 24 saatte nisin 1 mg/mL+ EDTA 50 mM (A3) eklenen örneklerde, biyofilm üretimi % 71,75 oranında, 48 saate % 93,01 oranında ve 72 saatte % 85,16 azaldı. A4 kombinasyonunda ise 24, 48 ve 72. saatler için biyofilm üretiminde, sırasıyla % 62,78, % 91,15 ve % 80,13 oranlarında azalma belirlendi (Şekil 4.10).



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

10 mg/mL+ CİP 5 µg/mL Nisin (B) ve 1 mg/mL + EDTA 10 mM + CİP 5 µg/mL (C) konsantrasyonlarında hazırlanan ikili ve üçlü kombinasyonların *Salmonella* suşları üzerindeki inhibisyon etkinliği araştırıldığında; B kombinasyonunda, *S. Typhimurium* 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 dam* mutant suşunda 24 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde, nisin 10 mg/mL+ cip 5 µg/mL (B) eklenen örneklerde % 65,02 oranında azalma, nisin 1 mg/mL + EDTA 10 mM + 5 CİP 5 µg/mL (C) eklenen örneklerde % 79,82 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde B kombinasyonu eklenen örneklerde % 93,43 oranında azalma, C kombinasyonu eklenen örneklerde % 95,62 oranında azalma saptandı. 72 saatte üretilen biyofilm miktarı incelendiğinde ise, nisin B kombinasyonu eklenen örneklerde % 86,41 oranında azalma ve C kombinasyonu eklenen örneklerde ise % 85,67 oranında azalma gözlemlendi (Şekil 4.11).

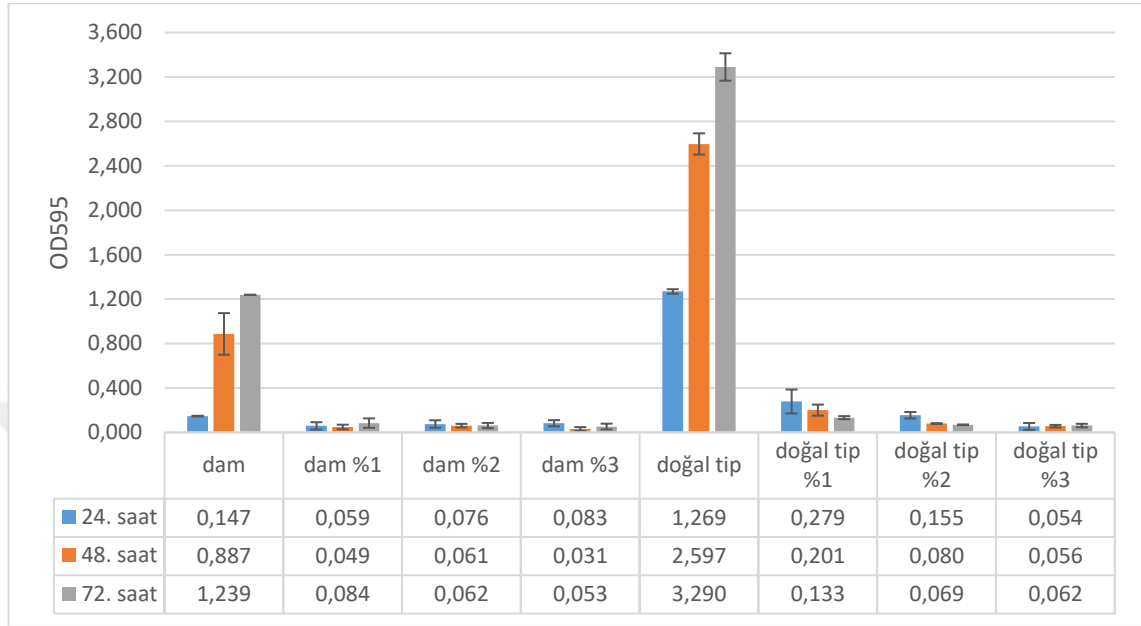


Şekil 4.11 B ve C kombinasyonlarında (Çizelge 3.3) hazırlanan preparatların *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve *dam* mutantlarının biyofilm oluşumuna etkisi

4.2 Glukozun Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Bu denemelerde, *S. Typhimurium* doğal tip ile *dam* geni bakımından mutant suşlara % 1, % 2 ve % 3 oranlarında glukoz varlığında biyofilm üretim kapasiteleri belirlendi. Besi ortamında glukoz bulunmayan pozitif kontrollere (doğal tip suş ve onun *dam* mutanı) kıyasla, glukozlu ortamda biyofilm oluşumu istatistiki açıdan anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) düşme gösterdi. *S. Typhimurium* doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesinde, % 1, % 2 ve % 3 oranında glukoz varlığında 24. saatte sırasıyla % 65,65, % 73,78 ve % 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 dam* geni bakımından mutant suşun biyofilm üretiminde 24. saatte % 1 glukoz eklenen örneklerde % 59,86 oranında azalma, % 2 glukoz eklenen örneklerde % 48,3 oranında azalma, % 3 glukoz eklenen örneklerde % 43,54 oranında azalma belirlendi. 48 saatte üretilen biyofilm miktarında % 1 glukoz eklenen örneklerde % 94,5 oranında azalma, % 2 glukoz eklenen örneklerde % 92,12 oranında azalma ve % 3 glukoz eklenen örneklerde % 96,51 oranında azalma saptandı. 72. Saatte pozitif kontrole göre, % 1 glukoz eklenen örneklerde % 96 oranında azalma, % 2 glukoz eklenen örneklerde % 97,9 oranında azalma ve % 3 glukoz eklenmiş örneklerde % 98,1 oranında azalma tespit edildi. Aynı şekilde optimum biyofilm üretim süresi olan 72. saatte *dam* mutant suşunda pozitif kontrole göre, % 1 glukoz eklenen örneklerde biyofilm üretiminde % 93,2 azalma, % 2 glukoz eklenen

örneklerde % 95 azalma ve % 3 glukoz eklenen örneklerde ise % 95,1 azalma tanımlandı (Şekil 4.12).



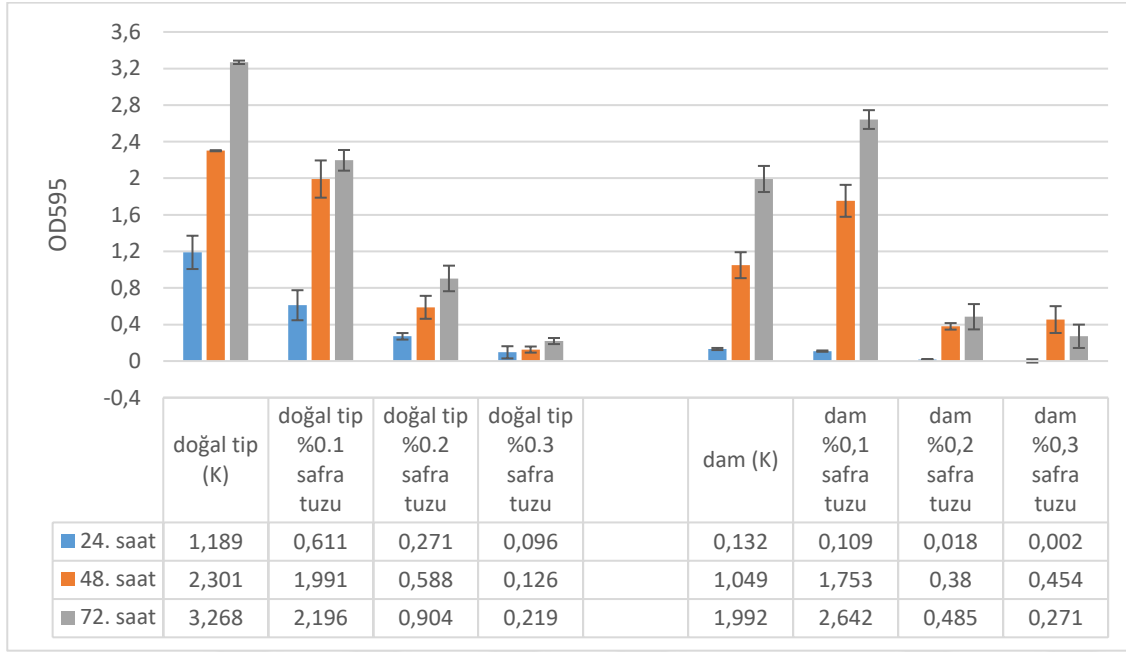
Şekil 4.12 Glukoz'un (% 1, % 2, % 3) *S. Typhimurium* Doğal Tip ve *dam* Mutant Suşunun biyofilm oluşumuna etkisi

4.3 Safra Tuzlarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

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

S. Typhimurium 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. Besiyesine % 0,1 oranında safra tuzu eklenerek üretilen *dam* mutant suşunda 24. saatte biyofilm üretiminde, kontrole göre % 17,48 oranında azalma belirlendi. Bu düşüş % 0,2 safra tuzu ilavesinde % 86,37 ve % 0,3 safra tuzu ilavesinde % 98,49 oranında tespit edildi. 48. saatte üretilen biyofilm kapasitelerinde, % 0,1, % 0,2 ve % 0,3 oranında safra tuzu ilavesi sonucu sırasıyla, %

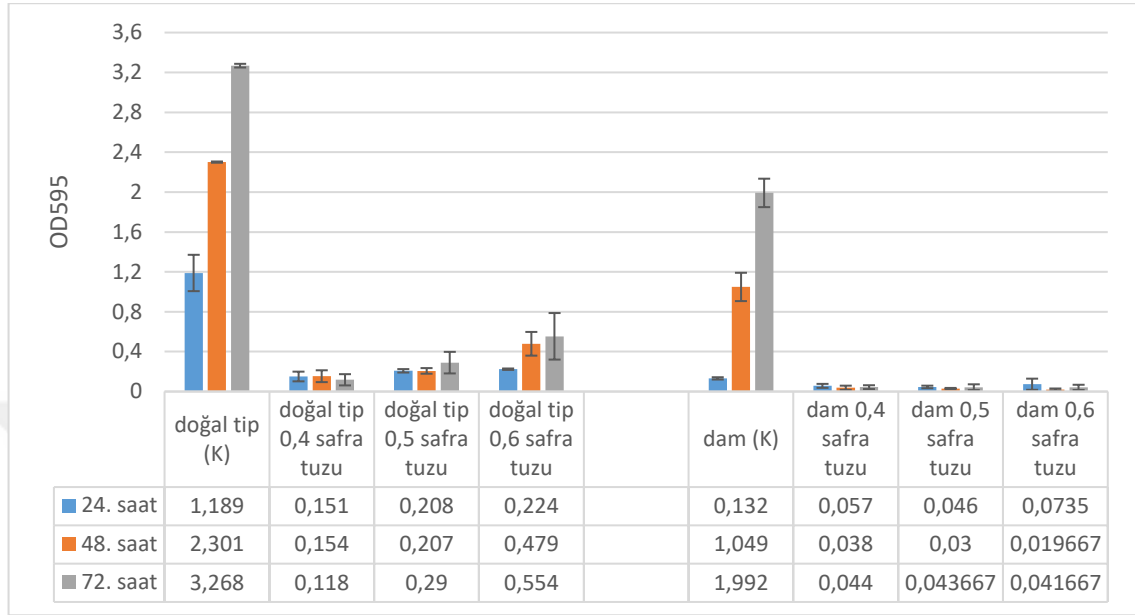
67,11, % 73,78 ve % 56,73 oranında azalma tespit edildi. 72. saatte pozitif kontrole göre % 0,1, % 0,2 ve % 0,3 safra tuzu eklenmiş ortamlarda *dam* mutant suşunun biyofilm üretiminde sırasıyla % 32,6 oranında artış, % 75,65 oranında azalma ve % 86,4 oranında azalma tespit edildi (Şekil 4.13).



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

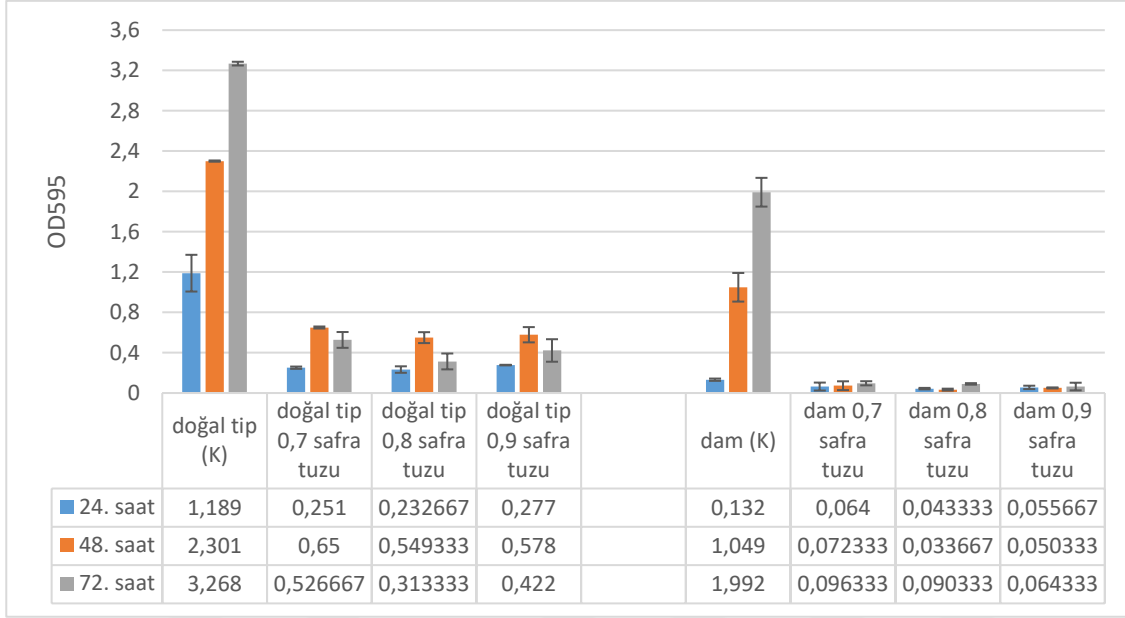
S. Typhimurium doğal tip (wt) suşunun biyofilm üretim kapasitesi % 0,4, % 0,5 ve % 0,6 oranlarında safra tuzu içeren ortamlarda, 24. saatte sırasıyla % 87,31, % 82,51 ve % 81,17 oranında, 48. saatte sırasıyla % 93,31, % 91,01 ve % 79,19 oranında, 72. saatte sırasıyla % 96,39, % 91,13 ve % 83,05 oranında düşüş gösterdi. *S. Typhimurium dam* mutant suşunda, 24. saatte üretilen biyofilm kapasitesi incelendiğinde, % 0,4 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 56,82 oranında azalma, % 0,5 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 65,16 oranında azalma, % 0,6 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 44,32 oranında azalma saptandı. 48. saatte % 0,4 oranında safra tuzu eklenen örneklerde biyofilm miktarı % 96,38 oranında, % 0,5 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 97,15 oranında ve % 0,6 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 98,13 oranında azaldı. 72 saatte biyofilm miktarlarında, % 0,4 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 97,8 oranında, % 0,5 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 97,82 oranında azalma ve %

0,6 oranında safra tuzu eklenen örneklerde ise % 97,92 oranında azalma belirlendi (Şekil 4.14).



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

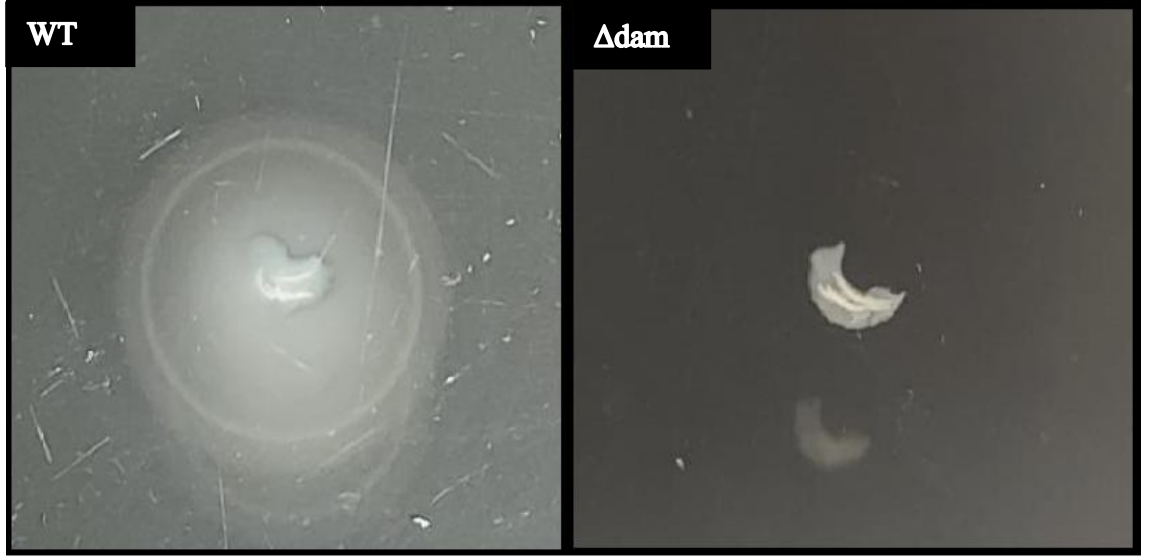
S. Typhimurium 14028 doğal tip suşunun biyofilm üretim kapasitesi, % 0,7, % 0,8 ve % 0,9 oranlarında safra tuzu içeren ortamda 24. saatte sırasıyla, % 78,89, % 80,66 ve % 76,71 oranında, 48. saatte sırasıyla % 71,76, % 76,15 ve % 74,89 oranında, 72. saatte sırasıyla % 83,91, % 90,43 ve % 87,09 oranında düşüş gösterdi. *S. Typhimurium dam* mutant suşunda ise 24. saatte üretilen biyofilm kapasitesi incelendiğinde % 0,7 safra tuzu eklenen örneklerde % 51,52 oranında azalma, % 0,8 safra tuzu eklenen örneklerde % 67,43 oranında azalma, % 0,9 safra tuzu eklenen örneklerde % 57,81 oranında azalma saptandı. 48. saatte biyofilm kapasiteleri % 0,7 safra tuzu eklenen örneklerde % 93,11 oranında, % 0,8 safra tuzu eklenen örneklerde % 96,79 oranında ve % 0,9 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 95,21 oranında azaldı. 72 saatte ise bu oranlar; % 0,7 safra tuzu eklenen örneklerde % 95 oranında, % 0,8 safra tuzu eklenen örneklerde % 95,5 oranında ve % 0,9 oranında safra tuzu eklenen örneklerde % 96,99 oranında azalmalar, şeklinde gerçekleşti (Şekil 4.15).



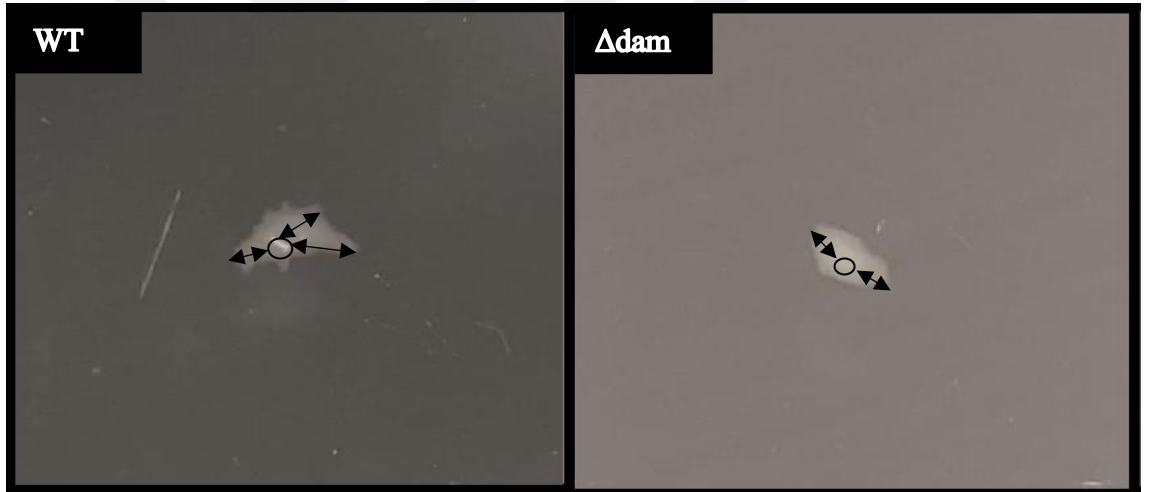
Şekil 4.15 Safra tuzlarının (% 0,7, % 0,8 ve % 0,9) *S. Typhimurium* 14028 doğal tip ve *dam* mutantının biyofilm oluşumuna etkisi

4.4 *S. Typhimurium* Doğal Tip ve *dam* Geni Bakımından Mutant Suşların Bakteriyel ‘Swimming’ ve ‘Swarming’ Hareketlerinin Karşılaştırılması

Flagellaya bağlı ‘Swarming’ ve ‘Swimming’ hareketliliğin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneme, agar plakalarındaki inokülasyon bölgesinden yüzme (swimming) ve toplu göç (swarming) bölgesinin kenarına kadar oluşan hareketin yarıçapı ölçülerek değerlendirildi. *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunda gözlemlenen yüzme (swimming) hareketi Δdam mutant suşunda ortadan kalkarken, “swarming” hareket de yaklaşık % 50 oranında azaldı (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



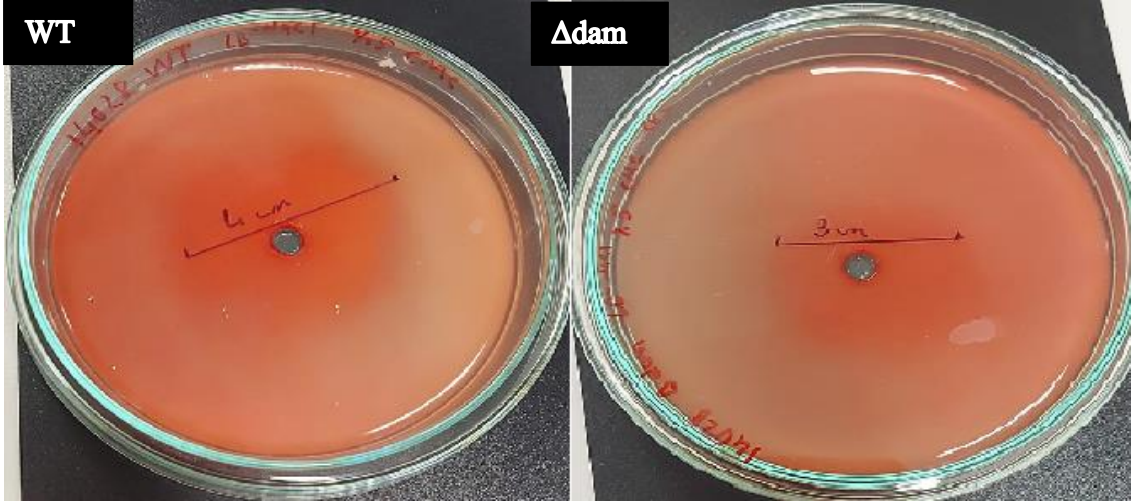
Şekil 4.16 *S. Typhimurium* doğal tip ve *dam* geni bakımından mutant suşların “swimming” hareketi



Şekil 4.17 *S. Typhimurium* doğal tip ve *dam* geni bakımından mutant suşlarda “Swarming” hareketi

4.5 Selülaz Aktivitesi Belirleme Deneyi

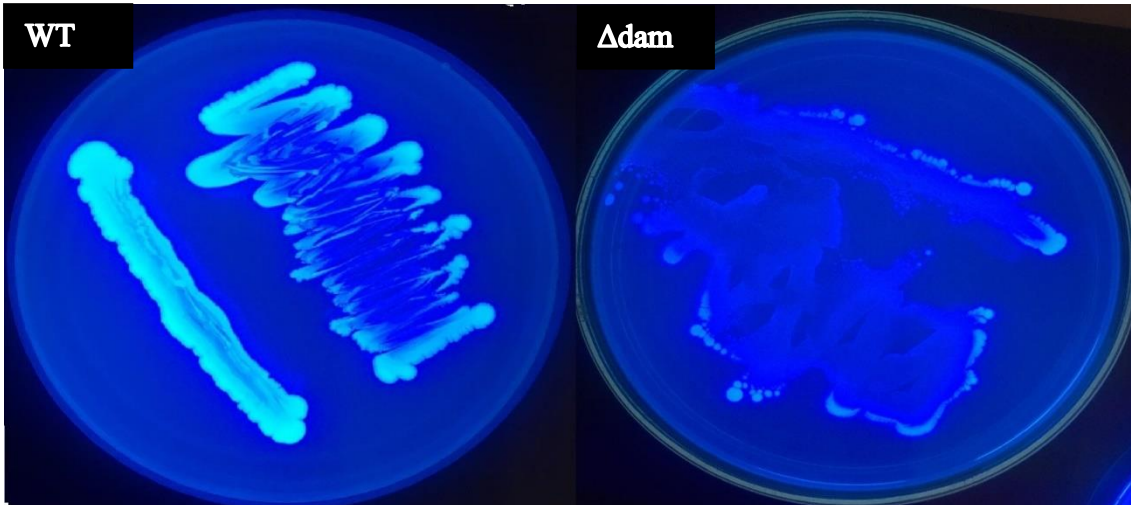
S. Typhimurium 14028 doğal suşunda 4 cm çapında gözlemlenen selülaz aktivitesinden kaynaklanan zon, *dam* geni mutantında suşta 3 cm çapında tespit edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *S. Typhimurium* doğal tip ve *dam* geni bakımından mutant şuşlarda selüloz aktivitesi zonları

4.6 Kalkoflor bağlanma deneyi

Salmonella şuşlarının selüloz üretiminin belirlenmesi amacı ile kalkoflor bağlanma denemesi gerçekleştirildi. 366 nm UV ışık altında incelenen petri plaklarında üreyen doğal tip *S. Typhimurium* doğal şuşu selüloz üretimlerinden dolayı kuvvetli florasan ışığa verirken, *dam* mutant şuşunda bu ışımda, doğal şuşa oranla çok yüksek oranda düşüş belirlendi (Şekil 4.19).



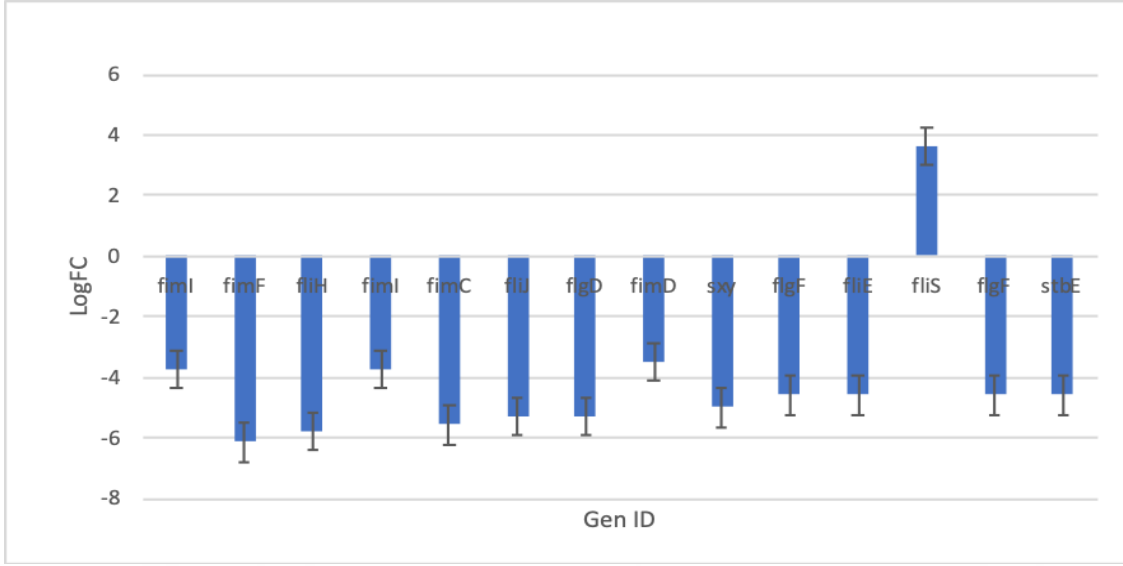
Şekil 4.19 *S. Typhimurium* doğal tip ve *dam* geni bakımından mutant şuşların kalkoflor bağlanma testi bulguları

4.7 S. Typhimurium Doğal Suş ve Onun *dam* Mutantında Farklı İfade Edilen Genler

dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen hareket ve fimbriyal yapılar ile ilişkili genler incelendiğinde; *fliS* hariç fimbriyaların yapısal ya da regülatör genleri olduğu tespit edilen 13 genin transkripsiyon oranlarının düştüğü tespit edildi (Çizelge 4.1, Şekil 4.20).

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

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW16636	<i>fimI</i>	Major pilin proteini	-3,7375
CBW16640	<i>fimF</i>	FimZ 5' bölgedeki teorik fimbriyal protein	-6,1337
CBW17995	<i>fliH</i>	Flagellar montaj proteini FliH	-5,7762
CBW16636	<i>fimI</i>	Major pilin proteini	-3,7375
CBW16637	<i>fimC</i>	Fimbriyal şaperon protein	-5,5584
CBW17997	<i>fliJ</i>	Flagellar biyosentez proteini	-5,3024
CBW17209	<i>flgD</i>	Flagellar kanca oluşumu proteini FlgD	-5,3018
CBW16638	<i>fimD</i>	Dış zar kullanıcı proteini FimD öncüsü	-3,4851
CBW17108	<i>sxy</i>	Gen indüksiyonu için gerekli protein	-4,9887
CBW17211	<i>flgF</i>	Teorik flagellar bazal cisim çubuk proteini FlgF (proksimal çubuk proteini)	-4,5891
CBW17992	<i>fliE</i>	Flagellar kanca-bazal vücut kompleksi proteini FliE	-4,5891
CBW17985	<i>fliS</i>	Flagellar protein FliS	3,6338
CBW17211	<i>flgF</i>	Teorik flagellar bazal cisim çubuk proteini FlgF (proksimal çubuk proteini)	-4,5891
CBW16431	<i>stbE</i>	Fimbriyal şaperon protein	-4,5873



Şekil 4.20 Hareket ile ilişkili proteinleri ve fimbriyal proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

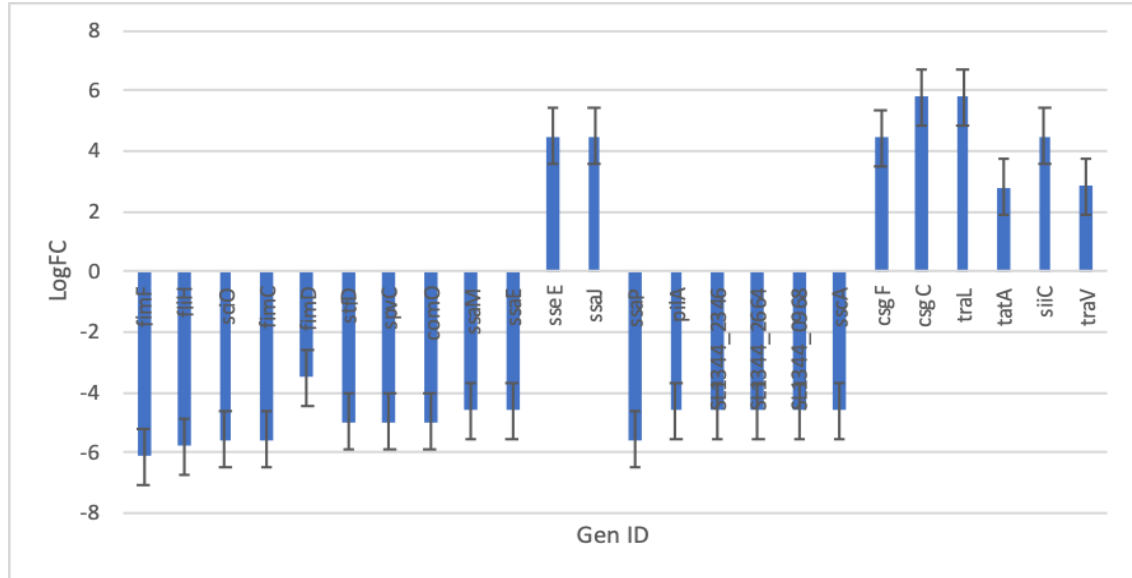
dam mutantında salgı sistemi ile ilgili genlerin transkripsiyon profilleri *S. Typhimurium* 14028 doğal tip suşu ile karşılaştırıldığında; fimbriyal salgı proteinlerini (salgı proteinleri ve şaperonlar), tip VI salgı sistemi elemanlarını, tipIII salgı sisteminin bazı elemanlarını (yapısal elemanlar ve şaperonlar), kompetans özelliği kontrol eden bazı proteinleri, kodlayan 16 genin transkripsiyon oranının düştüğü; tip III salgı sisteminin iki yapısal elemanı yanında, curli fimbriya üretimi ile ilgili yapısal elemanlar ve şaperonlar, konjugatif transfer elemanları, sec bağımlı bir protein ve tip I salgı sistemi proteini gibi 8 protein geninin transkripsiyon oranının ise arttığı saptandı (Çizelge 4.2, Çizelge 4.2.1 ve Şekil 4.21).

Çizelge 4.2 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen salgı sistemi ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW16640	<i>fimF</i>	FimZ 5' bölgedeki varsayımsal protein	-6,1337
CBW17995	<i>fliH</i>	Flagellar montaj proteini FliH	-5,7762
CBW16377	<i>sciO</i>	Tip VI salgı sistemi taban plakası	-5,5589
CBW16637	<i>fimC</i>	Fimbriyal şaperon protein	-5,5584
CBW16638	<i>fimD</i>	Dış zar kullanıcı proteini FimD öncüsü	-3,4851
CBW16300	<i>stfD</i>	Periplazmik fimbriyal şaperon stfD	-4,9887

Çizelge 4.2 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen salgı sistemi ile ilişkili genler (devam)

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CCF76774	<i>spvC</i>	<i>Salmonella</i> plazmit virulans geni	-4,9879
CBW19076	<i>comO</i>	Kompetans gen	-4,9879
CBW17443	<i>ssaM</i>	Tip III salgı sistemi aparatı	-4,59
CBW17426	<i>ssaE</i>	Tip III salgı sistemi proteini	-4,5891
CBW17432	<i>sseE</i>	Tip III salgı sistemi proteini	4,4814
CBW17439	<i>ssaJ</i>	Tip III salgı sistem aparatı	4,4814
CBW17447	<i>ssaP</i>	Tip III salgı sistem aparatı	-5,5578
CBW16247	<i>pilA</i>	DNA bağlanması ve taşınması	-4,5891
CBW18448	<i>SL13442346</i>	Teorik tip I salgı proteini	-4,5891
CBW18766	<i>SL13442664</i>	Teorik tip I salgı proteini	-4,5891
CBW17065	<i>SL13440968</i>	Tip III salgılama sistemi şaperon proteini	-4,5882
CBW17429	<i>sscA</i>	Tip III salgılama sistemi şaperon proteini	-4,5882
CBW17173	<i>csgF</i>	Curli üretim montajı / taşıma bileşeni	4,4381
CBW17178	<i>csgC</i>	Curli üretim proteini	5,7732
CCF76737	<i>traL</i>	Konjugatif transfer montaj proteini	5,7693
CBW20018	<i>tatA</i>	Sec-bağımsız protein, translokaz	2,8067
CBW20282	<i>siiC</i>	Teorik tip I salgılama proteini	4,4884
CCF76731	<i>traV</i>	Konjugatif transfer montaj proteini (plazmid)	2,836



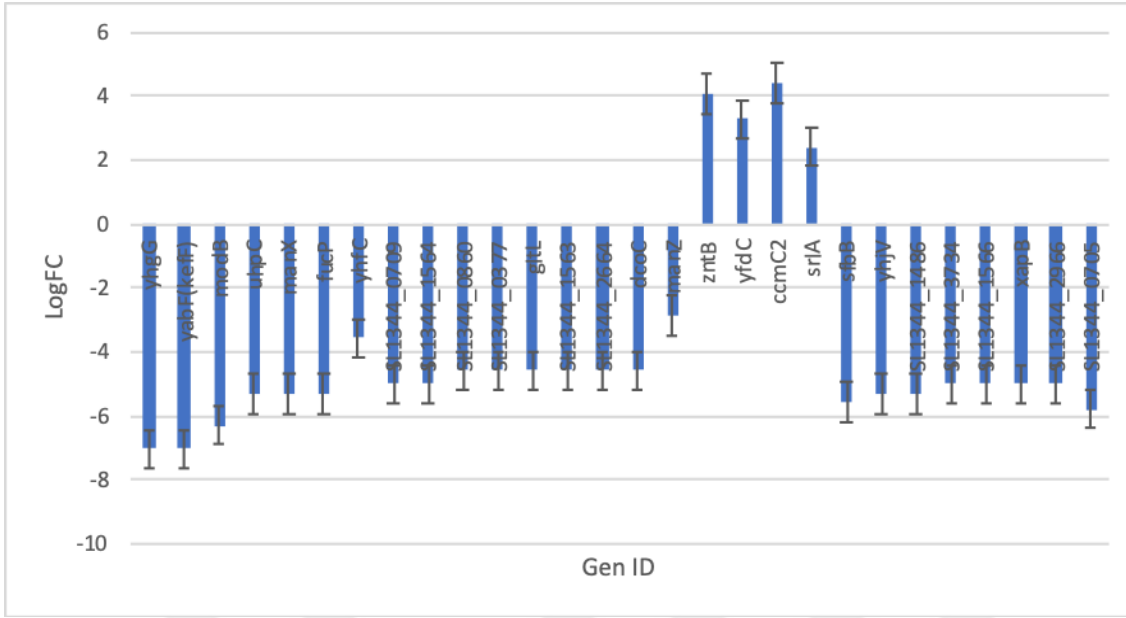
Şekil 4.21 Salgı sistem proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Doğal suşun ve onun *dam* geni mutantının taşıyıcı sistem genleri bakımından transkripsiyon profilleri yorumlandığında, 24 genin transkripsiyon oranında düşme, sadece 4 genin transkripsiyon oranında ise artış belirlendi. Transkripsiyon oranı baskılanan genlerin potasyum pompası olarak görev yapan prtoteinleri, transkripsiyonel regülatörleri, karbon kaynaklarına özgü permeazları, ABC, PTS ve MFS taşıma sistemlerine özgü proteinleri, amino asit bağlanma proteinlerini ve bazı zar proteinlerini kodladığı saptandı. Transkripsiyon oranı artan 4 genin ise, çinko, protohem ve glukozitol/sorbitol taşınımı ile ilişkili olduğu tanımlandı (Çizelge 4.3, Şekil 4.22).



Çizelge 4.3 *dam* geni bakımından mutant sušta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen taşıyıcı sistem ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW16664	<i>manX</i>	Mannoza özgü permeaz	-5,3011
CBW19849	<i>fucP</i>	L-fukoz: H + simporter permeaz	-5,3005
CBW19535	<i>yhfC</i>	Protein TsgA	-3,5768
CBW16807	<i>SL1344_0709</i>	Korunmuş teorik sitoplazmik protein	-4,9901
CBW17659	<i>SL1344_1564</i>	ABC amino asit transporter permeaz	-4,99
CBW16956	<i>SL1344_0860</i>	PTS şeker taşıyıcı alt birimi IIC	-4,59
CBW16477	<i>SL1344_0377</i>	MFS taşıyıcı	-4,59
CBW16750	<i>gltL</i>	Glutamat / aspartat taşıma ATP bağlayıcı protein	-4,5891
CBW17658	<i>SL1344_1563</i>	Teorik amino asit bağlayıcı protein	-4,5891
CBW18766	<i>SL1344_2664</i>	Teorik bakteriyofaj proteini	-4,5891
CBW16841	<i>dcoC</i>	Oksaloasetat dekarboksilaz gama zinciri	-4,5873
CBW16662	<i>manZ</i>	Mannoza özgü permeaz	-2,8729
CBW17682	<i>zntB</i>	Çinko taşıma proteini ZntB	4,0491
CBW18464	<i>yfdC</i>	Teorik zar proteini	3,2733
CBW18324	<i>ccmC2</i>	Protohem taşıyıcı protein	4,3928
CBW18910	<i>srlA</i>	Gluzitol/sorbitol PTS IIBC bileşeni	2,385
CBW16604	<i>sfbB</i>	Metiyonin ithal ATP bağlayıcı protein MetN	-5,5589
CBW19685	<i>yhjV</i>	Teorik amino asit permeazı	-5,3018
CBW17581	<i>SL1344_1486</i>	Teorik Na + / H + antiporter	-5,3018
CBW19826	<i>SL1344_3734</i>	Teorik PTS sistem proteini	-4,9894
CBW17661	<i>SL1344_1566</i>	Amino asit ABC taşıyıcı permeaz	-4,9887
CBW18486	<i>xapB</i>	Nükleozit permeaz	-4,9887
CBW19065	<i>SL1344_2966</i>	Teorik zar proteini	-4,9879
CBW16803	<i>SL1344_0705</i>	ABC taşıyıcı alan ATP-bağlanma proteini	-5,7762
CBW19569	<i>yhgG</i>	Teorik Fe-S-bağımlı transkripsiyonel baskılayıcı	-7,0413
CBW16188	<i>yabF(kefF)</i>	Potasyum dışarı akış sistemi yardımcı proteini	-7,0406
CBW16857	<i>modB</i>	Molibden transport sistem permeaz	-6,2831
CBW19845	<i>uhpC</i>	Regülatör protein	-5,3018

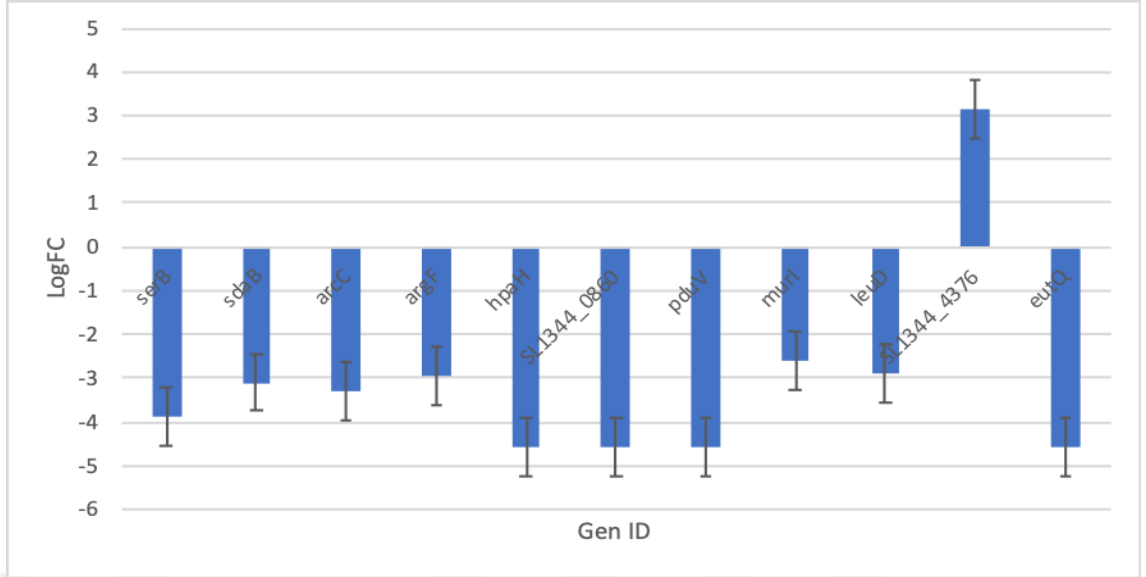


Şekil 4.22 Taşıyıcı sistem ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa orala *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Amino asit metabolizmasına dahil olan ve *dam* geni bakımından mutant suş ile bu mutantın doğal tipi arasında transkripsiyon etkinliği bakımından farklılık gösteren 11 gen içerisinde sadece amonyak liyaz geninin transkripsiyon oranında düşme belirlendi (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.23).

Çizelge 4.4 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen amino asit metabolizması ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW20594	<i>serB</i>	Teorik fosfoserin fosfataz	-3,8649
CBW19050	<i>sdaB</i>	L-serin dehidrataz 2 (L-serin deaminaz 2)	-3,0962
CBW20484	<i>arcC</i>	Karbamat kinaz	-3,315
CBW20483	<i>argF</i>	Ornitin karbamoiltransferaz	-2,9751
CBW17140	<i>hpaH</i>	2-okso-hepta-3-en-1,7-dioik asit hidrataz	-4,59
CBW16956	<i>SL1344 0860</i>	PTS şeker taşıyıcı alt birimi IIC	-4,59
CBW18128	<i>pduV</i>	Teorik propandiol kullanım proteini	-4,5882
CBW20168	<i>murI</i>	Glutamat rasemaz	-2,6187
CBW16213	<i>leuD</i>	3-izopropilmalat dehidrataz küçük alt birim mannoza özgü permeaz	-2,8729
CBW20464	<i>SL1344 4376</i>	DgaE ailesi piridoksal fosfata bağımlı amonyak liyaz	3,1264
CBW18533	<i>eutQ</i>	Etanolamin kullanımı asetat kinaz	-4,5891



Şekil 4.23 Amino asit metabolizması ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

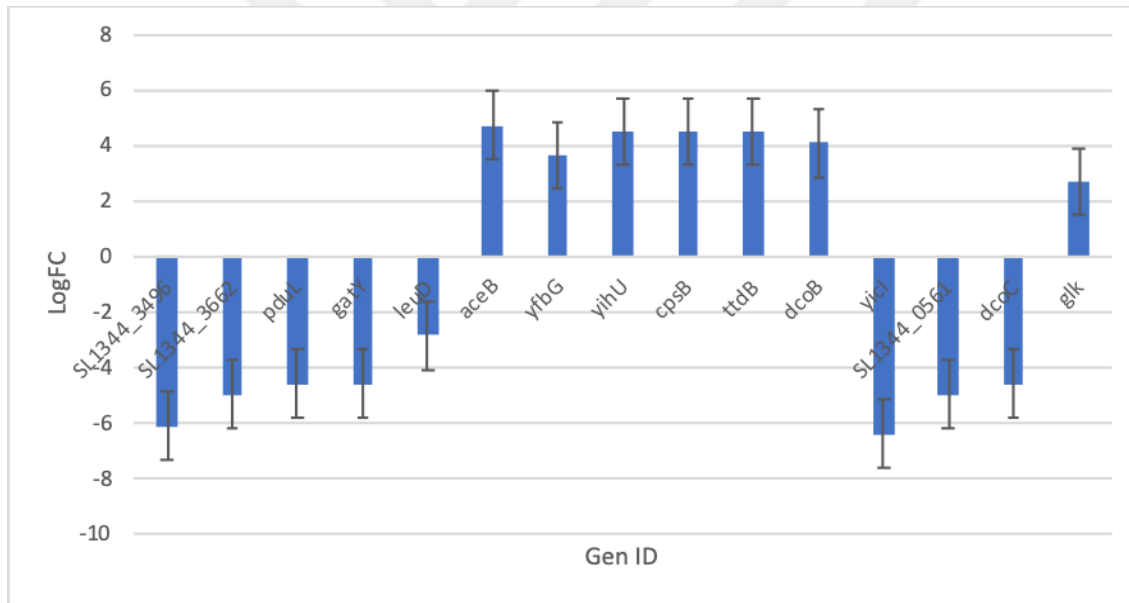
Karbonhidrat metabolizmasında işlev görmelerine göre tanımlanan ve gruplandırılan 15 genden 8 adetinin (Gliserol dehidrogenaz, propionil transferaz, D-tagatoz-1,6-bifosfat aldolaz alt birimi, alfa-ksilozidaz, mannoz permeaz ve okzalasetat dekarboksilaz gama zinciri gibi proteinleri kodlamaktadırlar) *dam* mutantındaki transkriptlerinde azalma; 7 adetinin ise (malat sentaz, polimiksin direnç proteini, 3-sülfolaktaldehit redüktaz, Mannoza 1 fosfat guanililtransferaz, Tartrat dehidrataz ve mannoza 1 fosfat guanililtransferaz proteinlerini kodlamaktadır) *dam* mutantındaki transkriptlerinde artış tespit edildi (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.24).

Çizelge 4.5 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen karbonhidrat metabolizması ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW19590	SL1344 3496	Gliserol dehidrojenaz	-6,1341
CBW19755	SL1344 3662	Teorik rasemaz	-4,9872
CBW18119	<i>pduL</i>	Fosfat propanoil transferaz	-4,5891
CBW19322	<i>gatY</i>	D-tagatoz-1,6-bifosfat aldolaz alt birimi GatY	-4,5882
CBW16213	<i>leuD</i>	3-izopropilmalat dehidrataz küçük alt birimi, mannoza özgü permeaz	-2,8729

Çizelge 4.5 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen karbonhidrat metabolizması ile ilişkili genler (devam)

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW20206	<i>aceB</i>	Malat sentaz A	4,7126
CBW18370	<i>yfbG</i>	İki işlevli polimiksin direnç proteini ArnA	3,6412
CBW20059	<i>yihU</i>	3-sülfolaktaldehit redüktaz	4,4953
CBW18178	<i>cpsB</i>	Mannoz 1 fosfat guanililtransferaz	4,4953
CBW19422	<i>ttdB</i>	Tartrat dehidrataz	4,4884
CBW16843	<i>dcoB</i>	Okzaloasetat dekarboksilaz beta zinciri	4,0885
CBW19809	<i>yicI</i>	Alfa-ksilozidaz	-6,4184
CBW16661	<i>SL1344_0561</i>	Teorik GTP Bağlayıcı protein	-4,9879
CBW16841	<i>dcoC</i>	Okzaloasetat dekarboksilaz gama zinciri	-4,5873
CBW18473	<i>glk</i>	Glukokinaz	2,6697



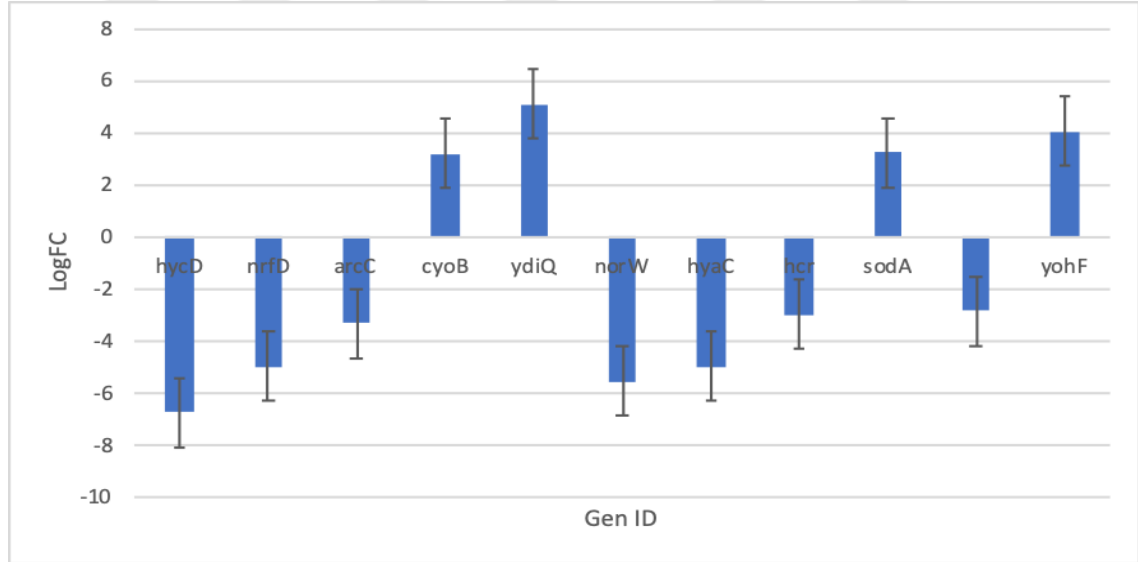
Şekil 4.24 Karbonhidrat metabolizması ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Salmonella'da enerji metabolizması ile ilişkili genler içerisinde değerlendirilen 11 gen için doğal suş ve *dam* mutantında farklı transkripsiyon seviyeleri belirlendi. Bunlardan; sitokrom bo(3) ubikinol oksidaz alt birimi I, teorik ETS flavoprotein alt birimi Sitokrom bo(3) ubikinol oksidaz alt birimi I, manganez süperoksit dismutaz ve teorik bir oksidoredüktaz geninin *dam* mutantında transkripsiyon oranının arttığı; format hidrojenilaz ve nitrit redüktaz alt birimleri, karbamat kinaz, nitrik oksit redüktaz, Ni / Fe-

hidrojenaz b-tipi sitokrom alt birimi, FAD kofaktörleri ve çinko bağlayıcısı dehidrojenaz genlerinin transkripsiyon oranının ise düştüğü saptandı (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.25).

Çizelge 4.6 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen enerji metabolizması ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW18928	<i>hycD</i>	Format hidrojenilaz alt birimi 4	-6,7629
CBW20303	<i>nrfD</i>	Nitrit redüktaz kompleksinin alt birimi sitokrom c	-4,9887
CBW20484	<i>arcC</i>	Karbamat kinaz	-3,315
CBW16537	<i>cyoB</i>	Sitokrom bo(3) ubikinol oksidaz alt birimi I	3,1968
CBW17385	<i>ydiQ</i>	Teorik ETS flavoprotein alt birimi Sitokrom bo(3) ubikinol oksidaz alt birimi I	5,06
CBW18919	<i>norW</i>	Nitrik oksit redüktaz FIRd-NAD (+) redüktaz	-5,5589
CBW17811	<i>hyaC</i>	Ni / Fe-hidrojenaz b-tipi sitokrom alt birimi	-4,9894
CBW16971	<i>hcr</i>	Hibrit küme proteini oksidoredüktaz-FAD ve [2FE-2S] kofaktörleri	-2,9908
CBW20093	<i>sodA</i>	Manganez superoksit dismutaz	3,23
CBW19157	<i>SL1344_3058</i>	Çinko bağlayıcı dehidrojenaz	-2,8713
CBW18245	<i>yohF</i>	Teorik oksidoredüktaz	4,0292



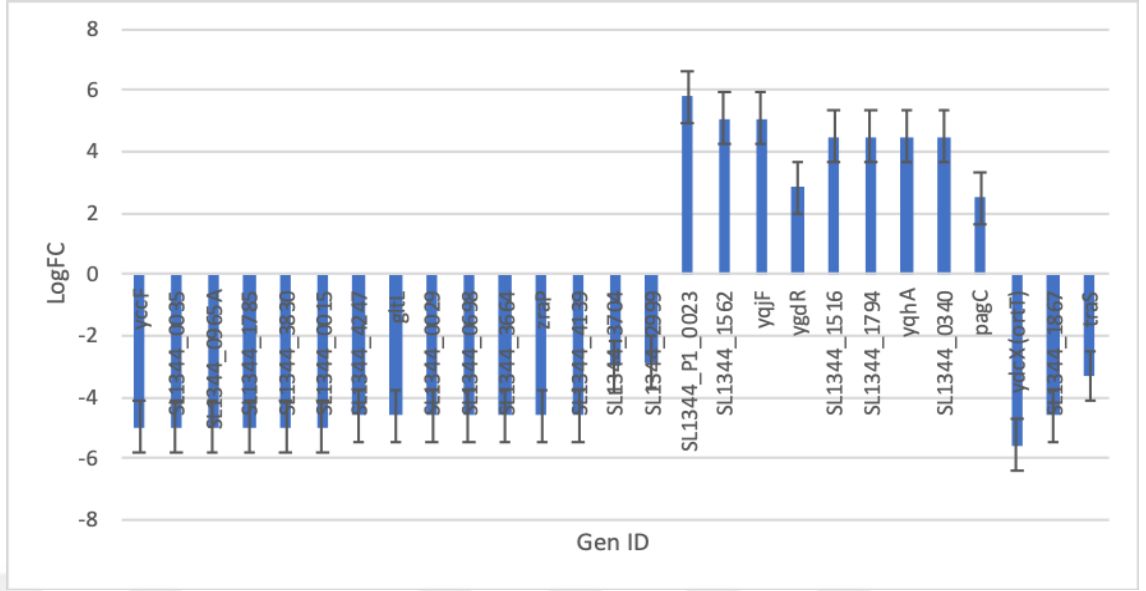
Şekil 4.25 Enerji metabolizması ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Salmonella'da membran spesifik yapısal ve fonksiyonel proteinleri kodlayan genlerin *dam* geni mutantı ile onun türetildiği doğal suş arasında transkripsiyon oranları bakımından artış gösteren 9 gen içerisinde fonksiyonu detaylı bir şekilde tanımlanan

konjugatif transfer proteini ve dış zar istila proteini genleri dikkat çekici bulundu. Teorik lipoproteinler ve alan proteinlerini kodlayan bu sınıftaki diğer genlerin üzerinde ise, yeterli araştıma bulunmamaktadır. *dam* mutantında transkripsiyon oranı düşen genler üzerinde yürütülen biyoinformatik analizler sonucu, bunların; bakteriyofaj holinleri, salgı proteinleri, glutamat/aspartate taşıyıcıları, çinko direnci, ATP bağlayıcıları gibi proteinleri kodladıkları belirlendi (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.26).

Çizelge 4.7 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe mebran proteinlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW17110	<i>yccF</i>	İç zar proteini YccF	-4,9901
CBW16136	<i>SL1344_0035</i>	Teorik salgı proteini	-4,9894
CBW17062	<i>SL1344_0965A</i>	Gifsy-2 bakteriyofaj holin	-4,9894
CBW17879	<i>SL1344_1785</i>	DUF1398 alan içeren protein	-4,9894
CBW19921	<i>SL1344_3830</i>	Teorik zar proteini	-4,9894
CBW16116	<i>SL1344_0015</i>	Teorik bakteriyofaj proteini	-4,9879
CBW20333	<i>SL1344_4247</i>	Karakterize edilmemiş protein YjiK	-4,59
CBW16750	<i>gltL</i>	Glutamat / aspartat taşıma ATP bağlayıcı protein GltL	-4,5891
CBW16130	<i>SL1344_0029</i>	Teorik zar proteini	-4,5882
CBW16797	<i>SL1344_0698</i>	Teorik protein	-4,5882
CBW19757	<i>SL1344_3664</i>	Teorik glukarat taşıyıcı	-4,5882
CBW20199	<i>zraP</i>	Çinko direnci ile ilişkili protein	-4,5882
CBW20227	<i>SL1344_4139</i>	Teorik membran proteini	-4,5882
CBW19798	<i>SL1344_3704</i>	Teorik membran proteini	-2,9867
CBW19098	<i>SL1344_2999</i>	Korunmuş teorik protein	-2,8716
CCF76729	<i>SL1344_P1_0023</i>	Konjugatif transfer proteini	5,7654
CBW17657	<i>SL1344_1562</i>	DUF1294 alan içeren protein	5,06
CBW19302	<i>yqjF</i>	DoxX ailesi proteini	5,0545
CBW19084	<i>ygdR</i>	Teorik lipoprotein	2,8419
CBW17610	<i>SL1344_1516</i>	Teorik lipoprotein	4,4884
CBW17888	<i>SL1344_1794</i>	Teorik iç membran protein	4,4884
CBW19226	<i>yqhA</i>	UPF0114 proteini YqhA	4,4884
CBW16440	<i>SL1344_0340</i>	Teorik protein	4,4814
CBW17279	<i>pagC</i>	Dış zar istilasını proteini (PagC)	2,5013
CBW17621	<i>ydcX (ortT)</i>	Teorik iç zar proteini	-5,5578
CBW17961	<i>SL1344_1867</i>	Teorik lipoprotein	-4,5891
CCF76715	<i>traS</i>	Konjugatif transfer, dış yüzey proteini (plazmid)	-3,3155

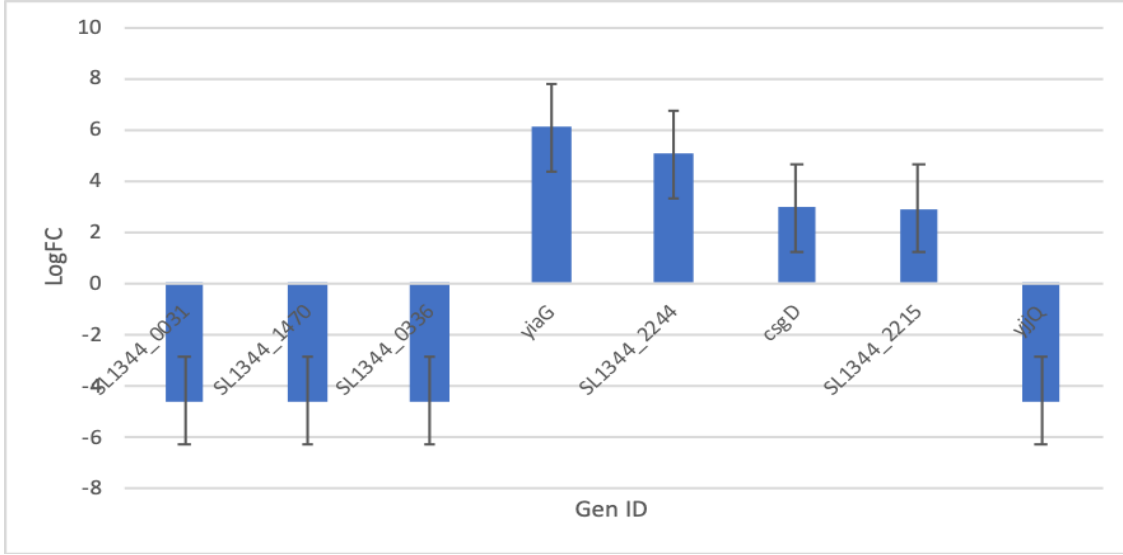


Şekil 4.26 Membran proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşta oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Doğal suş ve onun *dam* mutantı arasında transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin transkripsiyon oranlarında farklanma 8 farklı gen için tanımlandı. Bunların iki adedinin (teorik faktörler) *dam* mutantındaki transkripsiyon oranlarında artış, 4 adet teorik regülatör geni yanında, *csg* (ince agregatif fimbriya) operonu regülatörünü ve Q Antiterminatör proteininin kodlayan genler için azalma belirlendi (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.27).

Çizelge 4.8 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW16132	SL1344_0031	Teorik transkripsiyonel düzenleyici (lysR ailesi)	-4,5882
CBW17565	SL1344_1470	Teorik regülatör protein	-4,5882
CBW16436	SL1344_0336	Teorik transmembran regülatörü	-4,5873
CBW19707	<i>yiaG</i>	Teorik HTH tip transkripsiyonel regülatör	6,0793
CBW18346	SL1344_2244	Teorik transkripsiyonel regülatör	5,0435
CBW17175	<i>csgD</i>	<i>csg</i> operonu transkripsiyonel regülatör proteini	2,9315
CBW18311	SL1344_2215	Antiterminasyon proteini Q	2,9083
CBW20567	<i>yjjQ</i>	Korunmuş varsayımsal düzenleyici protein	-4,5891

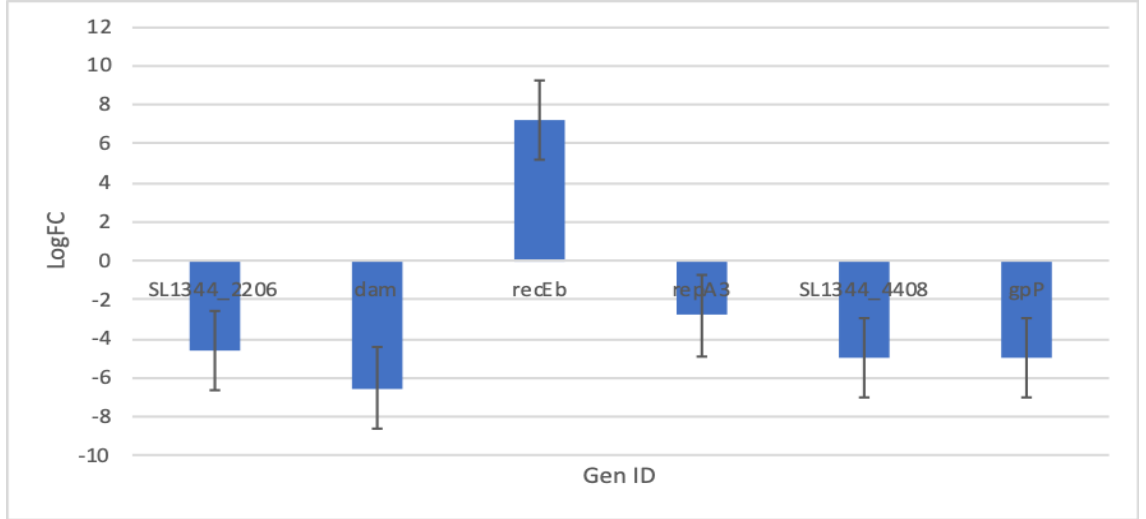


Şekil 4.27 Transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen DNA onarımı ve replikasyon ile ilişkili genler değerlendirildiğinde; sadece ekzodeoksiribonükleaz VIII geninin transkripsiyonunun *dam* mutantında arttığı, bunun yanında DNA polimeraz V alt birimini, Dam metilaz enzimini, plazmid replikasyon proteinini, DnaC proteinini (Helikaz bileşeni) ve faj replikasyon proteinini kodlayan genlerin transkripsiyon oranlarının ise önemli ölçüde düştüğü tespit edildi (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.28).

Çizelge 4.9 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen DNA onarımı ve replikasyon ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW18302	SL1344_2206	DNA polimeraz V alt birimi	-4,5873
CBW19546	<i>dam</i>	Deoksi adenosin metil transferaz	-6,5433
CBW18698	<i>recEb</i>	Ekzodeoksiribonukleaz VIII	7,2084
CCF76806	<i>repA3</i>	Replikasyon proteini (plazmid)	-2,8113
CBW17049	SL1344_4408	DNA replikasyon proteini DnaC	-4,9887
CBW18691	<i>gpP</i>	Faj replikasyon proteini	-4,9879

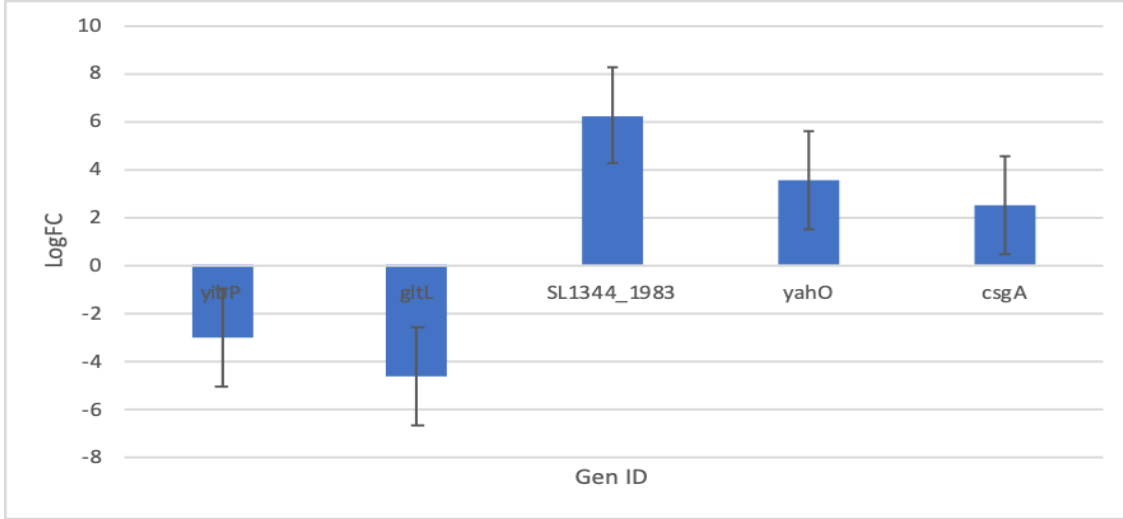


Şekil 4.28 DNA onarımı ve replikasyon mekanizması ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Diğer hücresel işlevleri yanında sinyal transdüksiyonunda aldıkları görev bakımından da sınıflandırılan genler içerisinde, murein hidrolaz aktivatörü, glutamat/aspartat taşımada ATP bağlayıcı proteini, bir alan proteini ve kıvrımlı fimbriya (ince agregatif fimbriya) sentez öncüsünü kodlayan genlerin *dam* mutantında transkripsiyon oranının düştüğü, sadece bir teorik proteini kodlayan genin transkripsiyon oranının ise yükseldiği belirlendi (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.29).

Çizelge 4.10 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW19764	<i>yibP</i>	Murein hidrolaz aktivatörü EnvC	-2,9678
CBW16750	<i>gltL</i>	Glutamat / aspartat taşımada ATP bağlayıcı protein	-4,5891
CBW18080	<i>SL1344 1983</i>	Teorik salgı proteini	6,2476
CBW16461	<i>yahO</i>	DUF1471 alan içeren protein	3,5173
CBW17177	<i>csgA</i>	Kıvrımlı fimbriya alt birim öncüsü	2,461

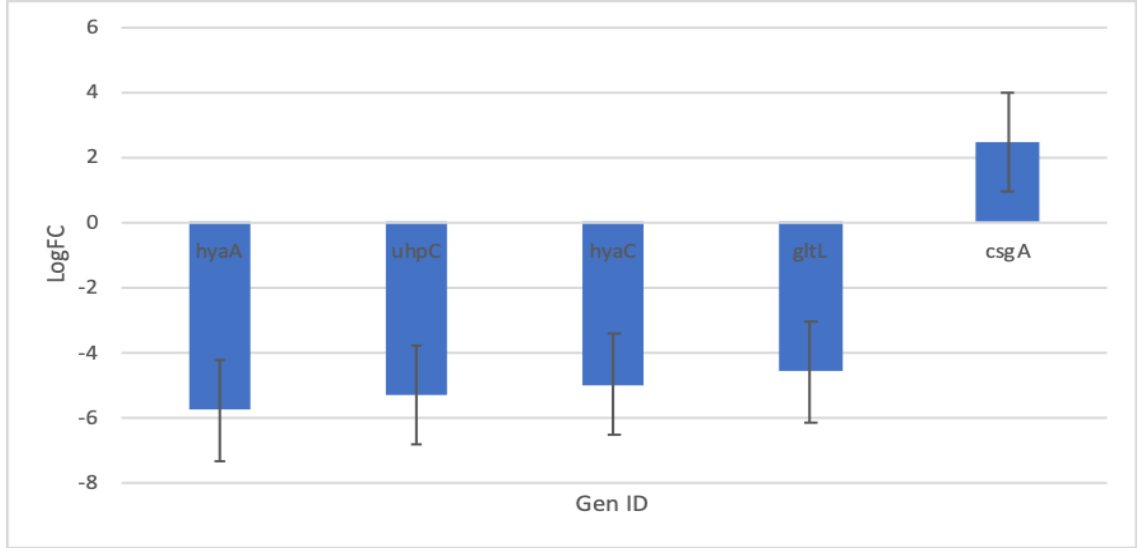


Şekil 4.29 Sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

dam mutantı ile doğal suş arasında farklı transkribe edilen iki bileşenli regülatör sistem elemanları içerisinde Ni/Fe hidrojenaz, fonksiyonu tanımlanmamış bir regülatör ve glutamat/aspartat taşıma ATP bağlayıcı proteininin kodlayan 4 genin *dam* mutantında transkripsiyon oranlarının düştüğü; yalnız kıvrımlı fimbriya öncüsünü kodlayan genin transkripsiyon oranının arttığı saptandı (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.30).

Çizelge 4.11 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen iki bileşenli sistem ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW17809	<i>hyaA</i>	NiFe hidrojenaz	-5,7752
CBW19845	<i>uhpC</i>	Regülatör protein	-5,3018
CBW17811	<i>hyaC</i>	Ni / Fe-hidrojenaz b-tipi sitokrom alt birimi	-4,9894
CBW16750	<i>gltL</i>	Glutamat / aspartat taşıma ATP bağlayıcı protein GltL	-4,5891
CBW17177	<i>csgA</i>	Major curli alt birim öncüsü	2,461

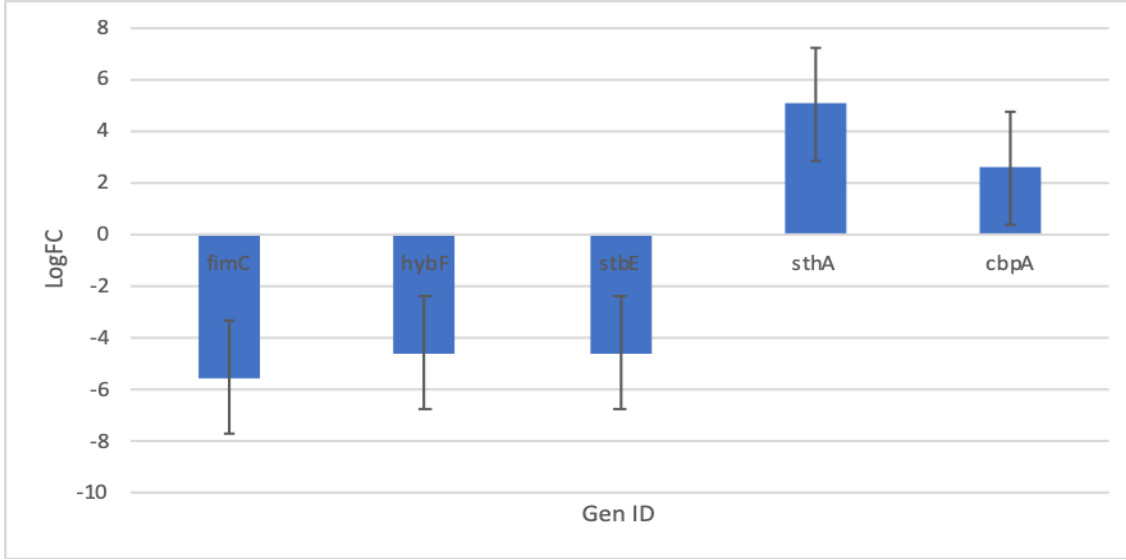


Şekil 4.30 İki bileşenli sistem ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Şaperonlar ve protein katlanma katalizörleri bakımından *dam* mutant ve doğal suş arasındaki farklılıklar toplam 5 gen için tanımlandı. Bunlardan *fimC* (fimbriyal şaperon), *hybF* (hidrojenaz olgunlaşma faktörü) ve *stbE* (bir diğer fimbriyal şaperon) genlerinin transkripsiyon oranı düşerken, başka bir fimbriya şaperonu (*sthA*) ile kıvrımlı fimbriya bağlayıcı protein geninin (*cbpA*) transkripsiyon oranı arttı (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.31).

Çizelge 4.12 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen şaperonlar ve katlanma katalizörleri ile ilişkili genler

Gen Kimliği	Gen Adı	Gen Tanımı	LogFC
CBW16637	<i>fimC</i>	fimbriyal şaperon proteini	-5,5584
CBW19217	<i>hybF</i>	Hidrojenaz olgunlaşma faktörü	-4,5891
CBW16431	<i>stbE</i>	fimbriyal şaperon proteini	-4,5873
CBW20610	<i>sthA</i>	Fimbriyal montaj şaperonu	5,049
CBW17147	<i>cbpA</i>	kıvrımlı DNA bağlayıcı protein	2,5762



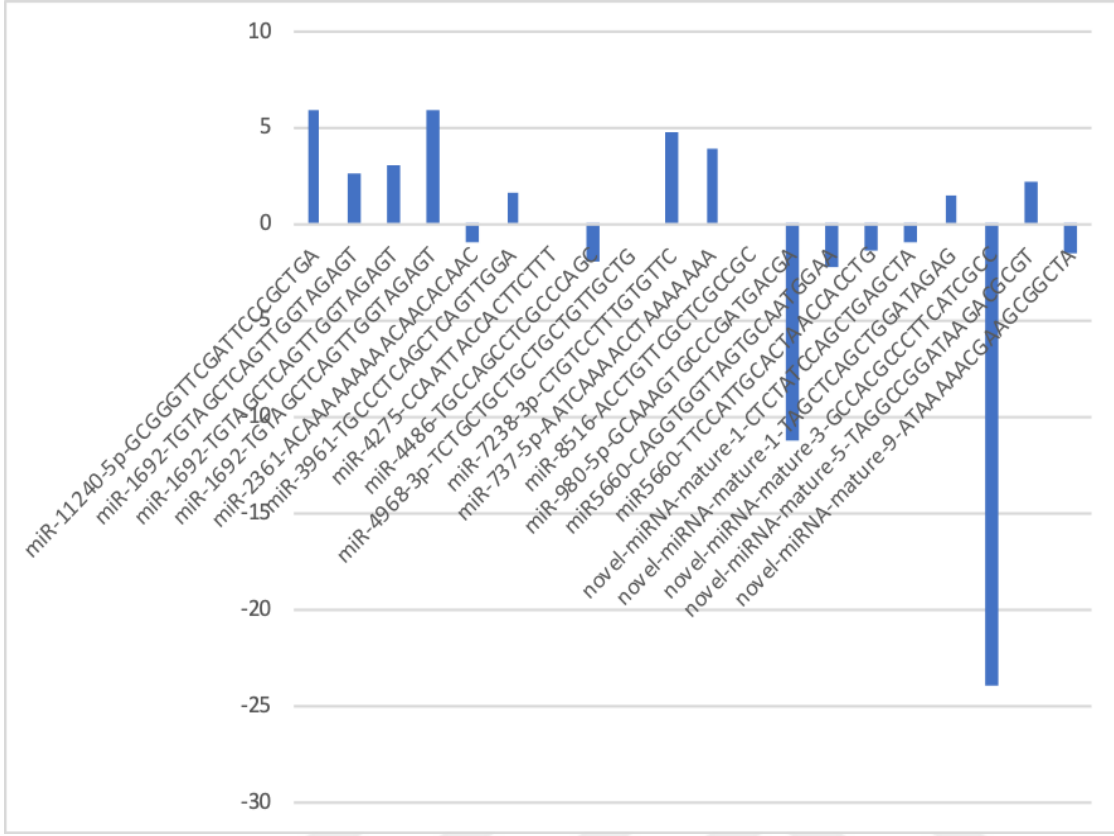
Şekil 4.31 Şaperonlar ve katlanma katalizörleri ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

Doğal suş ve onun *dam* miRNA ifade farklılıkları incelendiğinde; Histidin tRNA, glisin tRNA, treonin tRNA yanında dimetil adenosin transferaz metil sitrat sintaz, çevrimsel piranoptein monofosfat sintaz, L9 ribozomal protein, Ubikinol oksidaz, kinon oksidoredüktaz, transpeptidaz, nukleotidil transferaz, etanolamin ve amino-oksonat sentezi, GDP mannoz hidrolizi Demir (III)-hidroksamat alımı proteinlerinin şifresini taşıyan mRNA moleküllerini hedef alan miRNA genlerinin transkripsiyon oranlarında *dam* mutant suşunda doğal suşa oranla artma; maltodekstrin glukozidaz, ATPaz, flagellar yapı proteini ve Fe/S grup biyojenezi proteinlerinin şifresini taşıyan mRNA moleküllerini hedef alan miRNA genlerinin transkripsiyon oranlarında ise azalma belirlendi (Çizelge 4.13, Şekil 4.32)

Çizelge 4.13 *dam* geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen mikro RNA'ları (miRNA) kodlayan genler

miRNA Dizisi	Log FC	Hedef Gen Sembol	Tanım
GCGGGTTCGATTCCCGCTGA	5,838	<i>glyT</i>	Gly tRNA
TGTAGCTCAGTTGGTAGAGT	2,576	<i>hisR</i>	His tRNA
TGTAGCTCAGTTGGTAGAGT	2,956	<i>thrW</i>	Treonin tRNA
TGTAGCTCAGTTGGTAGAGT	5,838	<i>thrT</i>	Treonin tRNA
ACAAAAAAAAACAACACAAC	-1,011		
TGCCCTCAGCTCAGTTGGA	1,541		
CCAATTACCACTTCTTT	1,451	<i>ksgA, prpC, moaC</i>	Dimetil adenosin transferaz, 2-metil sitrat sintaz, siklik piranoptein monofosfat sintaz
TGCCAGCCTCGCCCAGC	-1,931	<i>malZ, kdpA, flgC</i>	Maltodekstrin glukozidaz, ATPaz, flagellar yapı proteinini
TCTGCTGCTGCTGCTGTTGCTG	1,315	<i>rpII</i>	50S ribozomal protein L9
CTGTCCTTTGTGTTT	4,648	<i>cyoA, nuoK, ggt,</i>	Ubikinol oksidaz, kinon oksidoredüktaz, transpeptidaz
AATCAAAACCTAAAAAAA	3,797	<i>SL13442696</i>	
ACCTGTTTCGCTCGCCGC	2,216	<i>pnp</i>	Nukleotidil transferaz
GCAAAGTGCCCGATGACGA	-11,201	<i>yhgI, yjbJ</i>	Demir sülfür grup biyogenezisi
CAGGTGGTTAGTGCAATGGAA	-2,31		
TTCCATTGCACTAACCACCTG	-1,401		
CTCTATCCAGCTGAGCTA (Y)	-1,012		
TAGCTCAGCTGGATAGAG (Y)	1,499	<i>eutG, nuoG, bioF, gmm</i>	Etonolamin ve amino-oksonat sentezi, GDP mannoz hidrolizi
GCCACGCCCTTCATCGCC (Y)	-23,969	<i>fhuB</i>	Demir (III)-hidroksamat alımı
TAGGCCGGATAAGACGCGT (Y)	2,119		
ATAAAAACGAAGCGGCTA (Y)	-1,607		

Y*: Bu çalışmada tanımlanan , yeni miRNA'lar



Şekil 4.32 miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonunun doğal suşa oranla *dam* mutantındaki değişim miktarları (Log2)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ile onun *dam* geni bakımından mutant suşunun ürettiği biyofilm formları kullanılarak yürütülen karşılaştırmalı RNA seq analizleri sonucunda; *dam* geninin söz konusu organizmada merkezi metabolizmaya dahil çok sayıda genin yanında, stres yanıtı ile ilişkili genlerin regülasyonuna doğrudan, ya da miRNA sentezini regüle etmek suretiyle dolaylı bir şekilde katıldığı tespit edilmiştir. *S. Typhimurium*'da replikasyon sürecinde DNA tecridi aşamasında *seqA* geni ile koordineli bir şekilde çalışan *dam* geninin, bakteri metabolizmasının ve fizyolojisinin global regülatörü olduğu ilk kez bu çalışma ile detaylandırılmıştır. Biyofilm formlarının yapısal elemanları yanında, fonksiyonu ile ilgili çok sayıda genin *dam* geninin fonksiyonuna bağlı değişimi, söz konusu genin *Salmonella*'da *seqA* geni ile birlikte biyofilm oluşumunun temel (ana) regülatörleri olduğuna işaret etmektedir. Yukarıda da ifade edildiği üzere, merkezi metabolizmada yer alan birçok genin regülasyonuna katıldıklarının da belirlenmesi, biyofilm yapılarına geçişteki büyük metabolik ve fizyolojik değişikliklerin bu genlerin regülasyonu yolu ile sağlandığının kanıtlarıdır.

dam geni bakımından mutant suşta, doğal suş ile kıyaslandığında farklı transkribe edilen fimbriyal ve flagellar yapı ile ilişkili genlerde, transkripsiyon oranlarında düşme meydana gelmiştir. Yalnız bir flagellar yapı proteinini kodlayan *fliS* geninde transkripsiyon oranının artması, söz konusu gen ürünü mRNA'nın post transkripsiyonel regülasyonun kontrolü altında olduğuna işaret etmektedir. Bu veriler *dam* mutantında hareket yeteneğinin (swimming ve swarming) ciddi bir oranda düşmesi ile de fizyolojik olarak kanıtlanmıştır. Tüm bu bulgular *dam* geninin öncelikle flagellar ve fimbriyal yapıların regülasyonunu gerçekleştirerek biyofilm oluşumunun ilk aşamasına (yüzeye tutunma) müdahale ettiğinin moleküler destekleridir.

dam geni bakımından mutant suşta doğal suştan farklı olarak transkribe edilen genetik bilgi işleme proteinlerini kodlayan genler arasında transkripsiyonel regülatör genler de bulunmaktadır. Bunlar arasında fonksiyonel tanısı yapılmış olan iki gen, pozitif yönde regüle edilen kıvrımlı fimbriya regülatörü (*csgD*) ve transkripsiyonel antiterminasyon

proteini Q'dur. *dam* mutantında kıvrımlı fimbriyanın regülatörünün (*csgD*) transkripsiyon oranının artmasına rağmen bu regülatörün pozitif regüle ettiği selüloz ve kıvrımlı fimbriya sentezinin (Ziehm vd., 2013) düşmesi, söz konusu transkriptlerin bu mutantta post transkripsiyonel ya da translasyonel düzeyde negatif regülasyona tabi tutulduğunu göstermektedir. Antiterminatör Q geni transkripsiyon oranındaki artış ise, özellikle merkezi metabolizma genlerinin transkripsiyon faktörlerinin söz konusu mutasyona adaptasyonun gerekliliği olarak, sıkı bir şekilde düzenlenmeye tabi tutulduğu yönünde değerlendirilmiştir. Zira bu antiterminatörün hedef serileri merkezi metabolizma genleri sigma faktörü dizilerinde tanımlanmıştır (Ring vd. 1996). DNA tamiri üzerinde etkin genlerden, *dam* mutantında transkripsiyon oranı artan yegâne gen, DNA hasarı tamiri fonksiyonunu gösteren ekzodeoksiribonükleaz VIII olmuştur. Bu durum *dam* geni yokluğunda DNA hasarının yüksek düzeye ulaştığının işaretidir. Diğer yandan DNA polimeraz alt birimlerinde ve DnaC gibi replikasyon için zorunlu diğer protein genlerinin transkripsiyon oranlarındaki azalma, muhtemelen Dam metilasyonunun yokluğunda DNA replikasyon zamanının bozulmasından (Heithoff vd. 1999) kaynaklanmaktadır.

dam mutantında transkripsiyonu negatif yönde regüle edilen taşıyıcı sistem genlerinin; potasyum pompası olarak görev yapan proteinleri, bazı transkripsiyonel regülatörleri, farklı karbon kaynaklarına özgü permeazları, ABC, PTS ve MFS taşıma sistemlerine özgü proteinleri, bazı amino asit bağlanma proteinlerini ve bazı zar proteinlerini kodladığının belirlenmesi, *dam* geninin taşıma sistemi genlerinin transkripsiyonu üzerinde, genel anlamı ile pozitif bir regülatör olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Transkripsiyon oranı artan 4 genin ise çinko, protohem ve glukozitol/sorbitol taşınımı ile ilişkili olduğunun veri tabanı analizleri sonucu belirlenmesi, bu mutantta fosfotransferaz sistemlerinin indüksiyonu yolu ile glukozun kullanımının, biyolojik sistemlerde en yoğun bulunan ikinci element olan ve birçok proteinin biyolojik fonksiyonunu düzenleyen çinko alımının ve elektron transport sisteminin (Boyd vd. 2000, Worlock ve Smith 2002) optimize edilmesinin, söz konusu mutasyonun olası letal etkisinden korunmada evrimsel bir adaptasyon olduğuna işaret etmektedir.

Salgı sistem proteinleri ve membran proteinleri bakımından değerlendirildiğinde, *dam* mutantında esas olarak *Salmonella* patojenitesinde kritik rollere sahip olan Tip I, Tip III

ve Tip IV salgı sisteminin fonksiyonel elemanlarını kodlayan genler yanında, özellikle Tip I fimbriyal şaperonları kodlayan genlerin de baskılandığının belirlenmesi (Biao vd. 2020) bu mutantta da biyofilm üretiminin ve virülansın düşmesinin (Uğur vd. 2018) ana nedeni olarak değerlendirilmiştir. Diğer yandan aynı mutantta Tip I ve Tip III sistemine ait bazı proteinlerin genlerinde transkripsiyon oranının artması, söz konusu genlerin salgı sistemi dışında ikincil bazı hücresel fonksiyonlara sahip oldukların düşündürmektedir. Transkripsiyon oranı artan en ilginç gen grubu curli (kırımlı) fimbriya üretiminde rol alan 2 gendir. Curli fimbriya *Salmonella* suşlarında güçlü biyofilm yapısının iki ana elemanından (diğeri selüloz) biridir (Shu vd., 2018). Muhtemelen *dam* mutantında bu sayede, stres koşullarına iyi bir adaptasyon sağlayan biyofilm yapısı kısmen korunmaktadır. *dam* mutantında membran ilişkili proteinlerden özellikle lipoproteinlerin büyük çoğunluğundaki azalma bu mutantta membran kırılabilirliğinin arttığının kanıtıdır. *dam* mutantlarında membran lipidlerinin üretiminin global bir azalma gösterdiği ve bu durumun membran kırılabilirliğini teşvik ettiği daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Aloui vd. 2010). Transkripsiyon oranı *dam* geni yokluğunda artan en ilginç membran ilişkili gen ise, *seqA* mutantında da olduğu gibi, tam virülanslık ve fagositik hücreler içinde yaşamda kalma için zorunlu olan istila proteinini kodlayan *pagN* (Heithoff vd. 1999) geni olmuştur. Söz konusu mutantta konak hücre istilasının önemli ölçüde düşmesine rağmen (Uğur vd. 2018) bu genin transkripsiyonundaki artış, gen ürününün fizyolojik adaptasyonda ikincil bir rolü olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu tespitin kesinlik kazanması için fonksiyonel testlere gereksinim vardır.

Salmonella'da sinyal transdüksiyonunda rol alan ve özellikle fimbriyal, flagellar ve kemotaksi ile ilgili fonksiyonlarda rol alan genlerde belirlenen negatif transkripsiyonel regülasyon; *dam* mutantında, kırımlı fimbriya alt birim öncüsü yapısal ve bağlayıcı genlerinde saptanan transkript oranı artışı (iki bileşenli sistemler ve fimbriyal yapılar ile ilişkili yapısal ve şaperon proteinleri genleri), yine bu çalışmada belirlenen *csgD* geni transkripsiyon oranının artışı ile paralellik taşımaktadır. *dam* mutantında kırımlı fimbriya bağlayıcı ve montaj protein genleri dışında herhangi bir fimbriyal olgunlaşma faktörü ya da şaperonun yapısal geni transkriptleri artmamıştır. Bu durum söz konusu mutantta kırımlı fimbriya sentezine katılan bazı proteinlerin *dam* mutasyonundan kaynaklanan adaptasyonda, biyofilm oluşumundan başka ikincil bir fonksiyona sahip

olduğunun bir diğer delilidir. Diğer yandan murein hidrolaz aktivatör geninin transkripsiyon oranındaki artış, söz konusu mutantta peptidoglikan sentezinin otolize bağlı regülasyonunun karakteristiğidir (Biswas vd. 2006). *dam* mutantında Ni/Fe hidrojenaz ve glutamat/aspartat taşıyıcısı gibi ikili regülatör sistemler ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyon oranlarındaki düşme, söz konusu genin bu metabolik sistemlerin pozitif regülatörü olduğunun kanıtlarıdır.

Karbonhidrat metabolizmasında görev alan genlerin transkripsiyon oranlarının *dam* mutantındaki farklanmaları; D tagatoz, ksiloz ve Gliserol gibi kompleks karbon kaynaklarının kullanımının kısıtlandığına işaret etmektedir. Zira bu mutantta söz konusu genlerin transkripsiyonu negatif yönde regüle edilmiştir. Diğer yandan aynı mutantta özellikle yeni nesil antibiyotik grubunun en önemli üyelerinden polimiksine (Li vd. 2019) direnci sağlayan protein geninin ve “O” antijeni sentezinde görev alan *cps* geninin (Stevenson vd. 1991) ve sodyum iyon pompası olarak görev yapan okzalasetat dekarboksilaz geninin (Woehlke vd. 1992) transkripsiyon oranının artması, *dam* geninin *Salmonella*’nın çevresel ve konakçı adaptasyonunda anahtar bir regülatör olduğunu tanımlamaktadır. Her iki mutantta da karbonhidrat metabolizmasında doğal suşa oranla meydana gelen kritik değişimlerin bu mutantların tipik bir fizyolojik karakteristiği olan biyofilm oluşumunun ciddi oranda düşmesinin bir diğer nedenidir.

dam mutantında enerji metabolizmasında görev alan genlerin transkripsiyon oranlarındaki değişimler, bu mutantta aerotaksin meydana geldiğini kanıtlamaktadır. Zira *S. Typhimurium*’da özellikle nitrat ve fumarat redüktaz enzimlerinin inhibisyonunun, metabolizmayı elektron transport zincirinin bazı elemanlarına gereksinim duyan özel bir oksidatif fosforilasyon yolu ile enerji eldesine yönlendirdiği belirlenmiştir (Laszlo ve Taylor 1981). Bu tespitin en önemli dayanaklarından biri de *Salmonella*’da oksidatif stres direncinin en önemli elemanı olan süperoksit dismutaz ve çinko bağlayıcı protein genlerinin (Nairn vd. 2016, Wang vd. 2018) transkripsiyon oranında belirlenen artıştır.

dam mutantında amino asit metabolizması ile ilişkili olan ve doğal suştan farklı ifade edildiği belirlenen genlerin, biri hariç (amonyak liyaz) tamamında transkripsiyon oranının

düşmesi, bu mutantta ciddi bir metabolik stres oluştuğunun ve bu strese karşı çevresel kaynaklara yönelmenin gerçekleştiğinin kanıtıdır. 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.

dam mutantında doğal suştan farklı transkribe edilen 20 miRNA geninden 4 adeti *Salmonella* için yeni miRNA kayıtlarıdır. Bunlardan *fhuB* genini (demir/hidroksamat alımında görev yapan proteini kodlamaktadır) hedefleyen miRNA ve demir biyojenezinden sorumlu genin mRNA'sının transkripsiyon oranlarındaki maksimum düşme, *dam* geninin *Salmonella*'nın konakçı sistem adaptasyonunda ne derece önemli bir rol üstlendiğinin açık işaretidir. *fhuB* geni mRNA'sını hedefleyen yeni bir miRNA'nın bu çalışma içinde tanımlanması, söz konusu özelliğin regülasyon modunu açıklamaktadır. 4 farklı amino tRNA genini hedefleyen miRNA'ların transkripsiyonunun artışı, söz konusu mutantta amino asit sentezinin bloke edilmesi suretiyle metabolik kısıtlamanın gerçekleştirdiğini göstermektedir. Amino asit biyosentez genlerinin transkripsiyon oranlarında da bu durumun tespit edilmesi, miRNA bulgularının doğruluğunu tanımlayan bir başka husustur. Diğer metabolik genleri de hedefleyen miRNA'lar göz önünde bulundurulduğunda, *S. Typhimurium dam* mutantlarında patojenite ve virülanslıkta önemli birçok genin post transkripsiyonel regülasyonun kontrolü altında olduğunu söylemek mümkündür.

Denemede kullanılan doğal ve *dam* mutant suşlarının antibiyofilm ajanlarına karşı davranışları belirlendiği çalışmalar kapsamında, nisin ile yürütülen denemelerde; 10 mg/mL nisinin kullanımı sonucu, doğal suşta ve onun *dam* mutantında 72. saatte maksimum biyofilm 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 5 mg/mL α -amilaz eklenen örneklerde söz konusu mutantın ürettiği biyofilm miktarında % 176,3 oranında artış belirlenmiştir. Proteinaz K siprofloksasin gibi, *S. Typhimurim* doğal suşu ve *dam* mutantında denenen konsantrasyonların tümünde ve tüm deneme sürelerinde

yüksek bir antibiyofilm etkinliği göstermiştir. Söz konusu etkinlik 72. saatte en yüksek seviyelere ulaşmıştır. CTAB doğal sušta, denenen tüm konsantrasyonlarda yüksek bir antibiyofilm aktivitesine sahipken, mutant sušta bu aktiviteyi sürdürememiştir. 72. saatte *dam* geni bakımından mutant sušta 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 arzetmedi. Nisin 1 mg/mL + EDTA 10 mM + CIP5 µg/mL 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 çalışma 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. Dam proteini üretimi engellenmiş mutantta biyofilm etkinliğinin yüksek derecede düşmesinin moleküler mekanizmalarla kanıtlanması, biyofilm yapıları ile mücadelede Dam inhibitörünün 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 inhibisyon 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. 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.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında *dam* suşunda 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 ekzozimler yanında DNA stabilitesi ile ilişkili genlerin transkripsiyonel ya da posttranskripsiyonel regülasyonunun değişimi olduğu belirlenmiştir. *dam* geni; çoğu *Salmonella* 'nın merkezi metabolizmasında işlev gören bu genlerin pozitif ya da negatif regülatörü olarak işlev görmektedir. Bu durum *dam* genin 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. Dam inhibitörünün 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 kullanılma 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.
- Ahmer, B. M., van Reeuwijk, J., Watson, P. R., Wallis, T. S., Heffron, F. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 31, 971–982.
- Allers, T., Leach, D. R. 1995. DNA palindromes adopt a methylation resistant conformation that is consistent with DNA cruciform or hairpin formation in vivo. *J. Mol. Biol.*, 252:70–85.
- Allison, D.G. 2003. The biofilm matrix. *Biofouling*, 19(2), 139-150.
- Aloui, A., Mihoub, M., Sethom, M. M. 2010. Effects of *dam* and/or *seqA* mutations on the fatty acid and phospholipid membrane composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 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, 6446–6452.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A. I., Burnham, K. D., Maurer, R. 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol. Microbiol.*, 35, 635–646.
- Aya Castaneda, M. R., Sarnacki, S. H., Noto, L. M., López Guerra, A. G., Giacomodonato, M. N., Cerquetti, M. C. 2015. Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 16(193), 15–22.
- Babitzke, P., Romeo, T. 2007. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10, 156–163.
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., and Miller, S. I. 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, 122, 461-472.
- Badie G., Heithoff D.M., Sinsheimer R. L., Mahan M.J. 2007. Altered Levels of *Salmonella* DNA Adenine Methylase Are Associated with Defects in Gene Expression, Motility, Flagellar Synthesis, and Bile Resistance in the Pathogenic Strain 14028 but Not in the Laboratory Strain LT2. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1556-1564

- Balbontin, 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, 8160–8168.
- Banas, J. A., Biswas, S., Zhu, M. 2011. Effects of DNA methylation on expression of virulence genes in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 7236–7242.
- Barak, J.D. and Liang, A.S. 2008. Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants. *PLoS ONE*, 3(2).
- Barnhart, M. M., Chapman, M. R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu Rev. Microbiol.*, 60, 131–147
- Barras, F., Magnan, M., Marinus, M. G. 1991. Evidence against a role for adenine methylation in the tryptophan biosynthetic pathway in *Escherichia coli* and for a growth phase-dependent induction of the *trp* promoter. *Current Microbiology.*, 23, 21–25.
- Bearson, B. L., Wilson, L., and Foster, J. W. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella* Typhimurium against inorganic acid stress. *J. Bacteriol.*, 180, 2409–2417.
- Beloin, C., Roux, A., ve Ghigo, J. M. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 249–289.
- Berger, C. N., Shaw, R. K., Brown, D. J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G. ve Frankel, G. 2009. Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *ISME*, 3(2), 261–5
- Bergerat, A., Guschlbauer, W. ve Fazakerley G. V. 1991. Allosteric and catalytic binding of S-adenosylmethionine to *Escherichia coli* DNA adenine methyltransferase monitored by ³H NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6394–6397.
- 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.
- Biswas, R, Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Götz, F. 2006 “Activity of the major staphylococcal autolysin Atl”, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 259, 260–268.
- 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.
- Boyd, D. A., Thevenot, T., Gumbmann, M., Honeyman, A. L., Hamilton, I. R. 2000. “Identification of the Operon for the Sorbitol (Glucitol) Phosphoenol pyruvate:

Sugar Phosphotransferase System in *Streptococcus mutans*”, *Infection and Immunity*. 68, 925-930.

Brenner, F. W. 1998. Modified Kauffmann-White scheme. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

Brezellec, P., Hoebeke, M., Hiet, M. S., Pasek, S., Ferat, J. L. 2006. DomainSieve: a protein domain-based screen that led to the identification of *dam*-associated genes with potential link to DNA maintenance. *Bioinformatics*. 22:1935–1941.

Brooks, J. D., Flint, S. H. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2163–2176.

Brunet, Y. R., Bernard, C. S., Gavioli, M., Lloubes, R., Cascales, E. 2011. An epigenetic switch involving overlapping *fur* and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster. *PLoS Genet.*, 7:e1002205.

Byrne, A. et al. 2017. Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells. *Nat. Commun.* 8,16027.

Calmann, M. A., Marinus, M. G. 2003. Regulated expression of the *Escherichia coli dam* gene. *J. Bacteriol.*, 185, 5012–5014.

Camacho, E. M., Serna, A., Madrid, C., Marques, S., Fernandez, R., de la, C. F., Juarez, A., Casadesus, J. 2005. Regulation of *finP* transcription by DNA adenine methylation in the virulence plasmid of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.*, 187,5691–5699.

Campbell, T. L., Ederer, C. S., Allali-Hassani, A. ve Brown, E. D.. 2007. Isolation of the *rstA* gene as a multicopy suppressor of YjeE, an essential ATPase of unknown function in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 189, 3318-3321.

Casadesus, J., Low, D. A. 2013. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 13929–13935.

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

Chahar, S., Elsayy, H., Ragozin, S., Jeltsch, A. 2010. Changing the DNA recognition specificity of the EcoDam DNA-(adenine-N6)-methyltransferase by directed evolution. *J. Mol. Biol.* 395, 79–88.

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.

- Chatti, A., Maalej, L., BelHadj, B. A., Kloula, S., Landoulsi, A. 2015. Fatty acids composition and biofilm production of attenuated *Salmonella* Typhimurium *dam* and *seqA* mutants after exposure to UV-C. *Curr. Microbiol.*, 71, 741–745
- Chessa, D., Dorsey, C. W, Winter, M., Baümeler, A. J. 2008. “Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics”, *The Journal of Biological Chemistry*, 28, 283(13), 8118-24.
- Chia, N., Woese, C. R., Goldenfeld, N. 2008. A collective mechanism for phase variation in biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105, 14597–14602.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety* vol. 2, 22-32
- Crawford, R. W., Reeve, K. E. and Gunn, J. S. 2010. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 2981–2990.
- Coffin S. R., Reich N. O. 2008. Modulation of *Escherichia coli* DNA methyltransferase activity by biologically derived GATC-flanking sequences. *J. Biol. Chem.*, 283, 20106–20116.
- Dubnau, D., Losick, R. 2006. Bistability in bacteria. *Molecular Microbiology*, 61, 564-572.
- Donlan R. M., 2002 Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.*, 8(9), 881-890.
- Falker, S., Schmidt, M. A., Heusipp, G. 2006. Altered Ca(2+) regulation of Yop secretion in *Yersinia enterocolitica* after DNA adenine methyltransferase overproduction is mediated by Clp-dependent degradation of LcrG. *J. Bacteriol.*, 188, 7072–7081.
- Fröhlich, K. S., ve Vogel, J. 2009. Activation of gene expression by small RNA. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 674–682.
- Garalde, D. R. et al. 2018. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat. Methods*, 15, 201–206
- Garcia-del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., Casadesus, J. DNA adenine methylase mutants of *Salmonella* Typhimurium show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 11578-11583.
- Gerstel, U., & Römling, U. 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Research in Microbiology*, 154, 659–667.
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C. ve Azadi, P. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, 188, 7722–7730.

- Goodier, R. I., Ahmer, B. M. 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J. Bacteriol.*, 183, 2249–2258.
- Groisman, E. A. 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.*, 183, 1835–1842.
- Groisman, E. A., Choi, E. N., Shin, D. W. 2009. Activated by Different Signals, the PhoP/PhoQ Two-Component System Differentially Regulates Metal Uptake. *Journal of Bacteriology.*, Vol.191, No.23 7174–7181
- Handford, J. I., Ize, B., Buchanan, G., Butland, G. P., Greenblatt, J., Emili, A. ve Palmer, T. 2009. Conserved network of proteins essential for bacterial viability. *J. Bacteriol.*, 191, 4732–4749.
- Hattman, S., Sun, W. 1997. *Escherichia coli* OxyR modulation of bacteriophage Mu mom expression in *dam*⁺ cells can be attributed to its ability to bind hemimethylated Pmom promoter DNA. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4385–4388.
- Hayward, R. D., Leong, J. M., Koronakis, V., Campellone, K. G. 2006. Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 358–370
- 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.
- Herman, G. E. ve Modrich, P. 1981. *Escherichia coli* K-12 clones that overproduce dam methylase are hypermutable. *Journal of Bacteriology*, 145, 644–646.
- Heusipp, G., Falker, S., Schmidt, M. A. 2007. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297, 1–7.
- Hohmann, E. L. 2001. Non-typhoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 263–269.
- Illumina. For all you seq. Illumina <https://emea.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/library-prep-methods.html> (2014)
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., Pinna, E. D., Nair, S., et al. 2014. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.*, 165, 526–530.
- Jeon, J., Kim, H., Yun, J., Ryu, S., Groisman, E. A., ve Shin, D. 2008. RstA-promoted expression of the ferrous iron transporter FeoB under iron-replete conditions enhances Fur activity in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.*, 190, 7326–7334.
- Jiu, Y., Meng, X., Hong, X., Huang, Q., Wang, C., Chen, Z., et al. 2020. Prevalence and characterization of *Salmonella* in three typical commercial pig abattoirs in Wuhan, China. *Foodborne Pathog. Dis.*, 10, 620–627.

- Johnston, C., Pegues, D. A., Hueck, C. J., Lee, A., Miller, S. I. 1996. Transcriptional activation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol. Microbiol.*, 22, 715–727.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U., & Melefors, O. 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, 70, 236–257.
- 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*, 6, 7610–7615.
- Kaminska, R., van der Woude, M. W. 2010. Establishing and maintaining sequestration of Dam target sites for phase variation of *agn43* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 192, 1937–1945.
- Kato, A., ve Groisman, E. A. 2008. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 631, 7–21.
- Kirk, M., Pires, S., Black, R., Caipo, M., Crump, J., Devleesschauwer, B., et al. 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Med.*, 3, 12(12): e1001921
- 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*, 1, 3(4): a010306
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., Hasnain, S. E., 2017. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 1438–4221
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H., Haas, D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.*, 67, 241–253.
- Laszlo D. J. ve Taylor B. L. 1981. “Aerotaxis in *Salmonella* Typhimurium: role of electron transport”, *The Journal of Bacteriology*, 145(2), 990–1001.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penadés, J.R. and Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1322–1339.

- Ledeboer, N. A., Frye, J.G., McClelland, M. and Jones, B. D. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef and tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, 74(6), 3156–3169
- 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 exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* Sero var Typh. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3214–3226.
- Lee, K. M., Runyon, M., Herrmann, T. J., Phillips, R., Hsieh, J. 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control.*, 47, 264–276.
- Li, Z., Cao, Y., Yi, L., Liu, J. H., Ysang, Q. 2019. “Emergent polymyxin resistance: End of an era?”, *Open Forum Infectious Diseases*, 6, 368-374.
- Lindsay, D., von Holy, A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: What healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64, 313–325.
- Lobner-Olesen, A., Marinus, M. G., Hansen, F. G. 2003. Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4672–4677.
- Low, D. A., Casadesus, J. 2008. Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11, 106-112.
- Malone, T., Blumenthal, R. M., Cheng, X. 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol.*, 253, 618–632.
- Marinus, M. G., Casadesus, J. 2009. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33, 488–503.
- Mezal, E. H., Sabol, A., Khan, M. A., Ali, N., Stefanova, R., Khan, A. A. 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiol.*, 38, 67–74.
- Minagawa, S., Ogasawara H., Kato A., Yamamoto K., Eguchi Y., Oshima T., Mori H., Ishihama A., and Utsumi R. 2003. Identification and molecular characterization of the Mg²⁺ stimulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 185, 3696-3702.
- Monds, R. D., O’Toole, G. A. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17, 73–87.
- 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, 994–1010.

- Nairn, B. L., Lonergan, Z. R., Wang, J., Braymer, J. J., Zhang, Y., Calcutt, M. W., Lisher, J. P., Gilston, B. A., Chazin, W. J., de Crecy-Lagard, V., Giedroc, D. P., Skaar, E. P. 2016. “The response of *Acinetobacter baumannii* to zinc starvation”, *Cell Host Microbe*, 19:826–836.
- Odoch, T., Wasteson, Y., L'Abée-Lund, T., Muwonge, A., Kankya, C., Nyakarahuka, L., Tegule, S., Skjerve, E. 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility and risk factors associated with non-typhoidal *Salmonella* on Ugandan layer hen farms. *BMC Vet. Res.*, 13(1), 365.
- Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K., ve Ishihama A. 2007. Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *J. Bacteriol.*, 189, 4791-4799.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. ve Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 49-79
- Oshima, T., Wada, C., Kawagoe, Y., Ara, T., Maeda, M., Masuda, Y., Hiraga, S., Mori, H., 2002. Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 45, 673–695.
- Oshota, O., Conway, M., Fookes, M., Schreiber, F., Chaudhuri, R. R., Yu, L., Morgan, F., Clare, S., Choudhary, J., Thomson, N. R., Lio, P., Maskell, D. J., Mastroeni, P., & Grant, A. J. 2017. Transcriptome and proteome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium systemic infection of wild type and immune-deficient mice. *PloS one*, 12(8), e0181365.
- Palmer, B. R., Marinus, M. G. 1994. The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli* a review. *Gene.*, 143, 1–12.
- Pang, L., Zhang, Z., Xu, J. 2011. Surveillance of foodborne disease outbreaks in China in 2006-2010. *Chin. J. Food Hyg.*, 23, 560–563.
- Parisi, A., Crump, J., Glass, K., Howden, B., Furuya-Kanamori, L., Vilkins, S., et al. 2018. Health outcomes from multidrug-resistant *Salmonella* infections in high-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Foodborne Pathog. Dis.*, 15, 428–436.
- Perez, J. C., ve Groisman, E. A., 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.*, 63, 283-293.
- Peterson S. N., Reich N. O. 2006. GATC flanking sequences regulate Dam activity: evidence for how Dam specificity may influence pap expression. *J. Mol. Biol.*, 355, 459–472.

- Pieter-Jan, C., Wesley, M., Raymond, V., Sophie, B. 2015. Trends in serotype distribution and antimicrobial susceptibility in *Salmonella enterica* isolates from humans in Belgium, 2009 to 2013. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59, 544–552.
- Poulsen, J. B., 1999. Danish consumers' attitudes towards functional foods. MAPP working paper 62. Aarhus: The Aarhus School of Business.
- Prieto, A. I., Ramos-Morales, F., Casadesus, J. 2006. Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. *Genetics*. 174, 575–584.
- Prieto, A. I., Jakomin, M., Segura, I., Pucciarelli, M. G., Ramos-Morales, F., Garcia-del, P. F., Casadesus, J. 2007. The GATC-binding protein SeqA is required for bile resistance and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 189, 8496–8502.
- Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E., ve Miller, S. I. 2007. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Mol. Cell* 26, 165-174.
- Prouty, A. M., Gunn, J. S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, 71, 7154–7158.
- Ricke, S.C. 2003. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella enteritidis* colonization in molting hens. *Poultry Science*, 82, 1003–1007.
- Ring, B. Z., Yarnell, W. S., Roberts, J. W. 1996. "Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing", *Cell*. 86(3):485-93
- Riva, A., Delorme, M. O., Chevalier, T., Guilhot, N., Henaut, C., Henaut, A. 2004. Characterization of the GATC regulatory network in *E. coli*. *BMC Genomics*, 5, 48-54.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. ve Normark. S. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.*, 180, 722–731.
- Römling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. ve Reinkoster, J. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.*, 36, 10–23.
- Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4,219.
- Seshasayee, A. S. 2007. An assessment of the role of DNA adenine methyltransferase on gene expression regulation in *E. coli*. *PLoS ONE*. 2: e273.
- Shin, D., ve Groisman, E. A. 2005. Signal-dependent binding of the response regulators PhoP and PmrA to their target promoters in vivo. *J. Biol. Chem.*, 280, 4089-4094.

- Shu, Q., Krezel, A. M., Cusumano, Z. T., Pinkner, J. S., Klein, R., Hultgren, S. J., Frieden, C. 2018. "Solution NMR structure of CsgE: Structural insights into a chaperone and regulator protein important for functional amyloid formation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 26: 7130-7135.
- Singleton, P. ve Sainsbury, D. 1996. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. John Wiley and Sons. 2nd Edition.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.*, 53, 1123-1134
- Simpson, K. M. J., Hill-Cawthorne, G. A., Ward, M. P., Mor, S. M. 2018. Diversity of *Salmonella* serotypes from humans, food, domestic animals and wildlife in New South Wales, Australia. *BMC Infect. Dis.* 18, 623.
- Smith, A. M. 2017. Reading canonical and modified nucleotides in 16S ribosomal RNA using nanopore direct RNA sequencing. *PLoS ONE* 14 (5): e0216709
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C. and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3), 793–808.
- Soncini, F. C., Vescovi, E. G., Solomon, F., ve Groisman, E. A. 1996. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella* Typhimurium: identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.*, 178, 5092-5099.
- Srikumar, S., Kröger C., Hébrard M., Colgan A., Owen S.V., Sivasankaran S.K., Cameron A.D.S., Hokamp K., Hinton J.C.D. 2015. RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog.*, 11(11), e1005262.
- Stancheva I., Koller T., Sogo J.M. 1999. Asymmetry of Dam remethylation on the leading and lagging arms of plasmid replicative intermediates. *EMBO J.*, 18, 6542-6551.
- Stark, R., Grzelak, M. ve Hadfield, J. 2019. RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, volume 20, 631–656
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., ve De Keersmaecker, S. J. 2011. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Journal of Food Research*, 45, 502–531.
- 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.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L. and Švabić-Vlahović, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428–432.

- Stevenson, G., Lee, S. J., Romana, L. K., Reeves, P. R. 1991. "Salmonella strain LT2 includes a second mannose pathway: sequence of two genes and relationship to genes in the rfb gene cluster", *Molecular Genetics*, 2, 173-180.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. ve Costerton, J. W. 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209.
- Sun, K., Jiao, X. D., Zhang, M., Sun, L. 2010. DNA adenine methylase is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet. Microbiol.* 141, 149–154.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., et al. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 184, 5130–5140.
- Takaya, A., Yamamoto, T., Tokoyoda, K. 2019. Humoral immunity vs. *Salmonella*. *Front. Immunol.*, 10, 3155.
- Teplitski, M., Goodier, R. I., Ahmer, B. M. 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, 185, 7257-7265.
- Uğur, S., Akçelik, N., Yüksel, F. N., Taşkale Karatuğ, N., Akçelik, M. 2018. Effects of *dam* and *seqA* genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Pathogens and Global Health*, 112, 368–377.
- Vescovi, G., E., Soncini, F. C., Groisman, E. A. 1996. Mg^{2+} as an extracellular signal environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84, 165-174
- Vestby, L. K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L. L. 2009. "Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories", *BMC Veterinary Research*, 5(20), 1-6.
- Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y., et al. 2014. Extracellular DNA inhibits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *S. enterica* Serovar Typhi biofilm development on abiotic surfaces. *Curr. Microbiol.*, 68, 262–268.
- Wang, X., Dubey, A. K., Suzuki, K., Baker, C. S., Babitzke, P., ve Romeo, T. 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 56, 1648-1663.
- Wang, Y., Yi, L., Zhang, J., Wen, W., Zhang, C., Wang, W. 2018. "Functional analysis of superoxide dismutase of *Salmonella* Typhimurium in serum resistance and biofilm formation", *Journal of Applied Microbiology*, 125: 1526-1533.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., et al. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 48, 657–670.

- Weitao, T., Nordström, K., Dasgupta, S. 2000. *Escherichia coli* cell cycle control genes affect chromosome superhelicity. EMBO Rep. 1, 494–499.
- Woehlke, G., Wifling, K., Dimroth, P. 1992. “Sequence of the sodium ion pump oxaloacetate decarboxylase from *Salmonella* Typhimurium”, The Journal of Biological Chemistry, 267, 22798-22803.
- Worlock, A. J., Smith, R. L. 2000. “ZntB is a novel Zn² transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”, The Journal of Bacteriology, 184, 4369-4373.
- Zhang, X. L. ve Yip, C.M. 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhi uses type IV B pili to enter human intestinal epithelial cells. Infections and Immunity, 68, 3067-3073.
- Ziehlm, D., Dreesman, J., Campe, A., Kreienbrock, L., Pulz, M. 2013. “Risk factors associated with sporadic salmonellosis in adults: a case-control study”, Epidemiology and Infection, 141:284-292.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Mol. Microbiol., 39(6), 1452-1463