

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SALMONELLA TYPHIMURIUM'DA CsrA REGÜLASYONUNUN AI-2 SENTEZİNE
VE HÜCRE İÇİNE ALIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Nasrine Bekhedda

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Nefise Akçelik

Haziran

2022

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Nasrine Bekhedda

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Nefise Akçelik danışmanlığında Nasrine Bekhedda tarafından hazırlanan bu çalışma 06/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hami ALPAS

İmza:

Üye: Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

İmza:

Üye: Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Salmonella Typhimurium'da CsrA Regülasyonunun AI-2 Sentezine ve Hücre İçine Alımına Etkisinin Belirlenmesi

Nasrine Bekhedda

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nefise Akçelik

Salmonella Typhimurium (S. Typhimurium), her yıl çok sayıda gıda kaynaklı salgınlardan sorumlu olan ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bir patojendir. Biyofilm; biyotik veya abiyotik bir yüzeye tutunmuş ve hücre dışı polimerik matriks içerisine gömülü olan hücre popülasyonudur. Biyofilm yapısı, antibiyotikler de dahil olmak üzere çeşitli stres koşullarına karşı bakterilerin yüksek derecede direnç göstermesini sağlar. Bu nedenle biyofilm oluşumu, patojenlerin bir virülans özelliği olarak kabul edilir ve günümüzde bu yapılarla mücadele etmek için etkili stratejiler geliştirmek önemli bir araştırma konusudur. Biyofilm oluşumunun son basamağı olan dispersiyon aşamasında biyofilm yapısından dağılan hücreler, antimikrobiyal ajanlara karşı daha duyarlıdır. Bu nedenle dispersiyon mekanizmalarının anlaşılması, biyofilm eradikasyonu için potansiyel bir strateji olarak kabul edilir. Global karbon düzenleyici protein CsrA, siklik di-GMP seviyesini kontrol eder ve flagella biyosentezini aktive ederek S. Typhimurium'un biyofilm dispersiyonunu pozitif olarak düzenler. Ayrıca LuxS tarafından sentezlenen ve hücre içine Lsr taşıyıcısı tarafından taşınan evrensel Quorum Sensing (QS) sinyal molekülü otoindüktör-2 (AI-2), S. Typhimurium biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. S. Typhimurium'da glukozun, hem CsrA hem de AI-2 seviyelerini etkilediği ve biyofilm oluşumunu engellediği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, S. Typhimurium'da CsrA regülasyonunun AI-2 sentezi ve hücre içine alımı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Aynı zamanda bu etkiler, biyofilm dağılımını indükleyen optimum glukoz konsantrasyonunda değerlendirildi. AI-2 aktivitesi üzerindeki CsrA etkisi, *Vibrio harveyi* BB170 raportör suşu kullanılarak incelendi ve CsrA'nın hücre dışı AI-2 birikimi üzerinde olumlu bir etkisi olduğu gözlemlendi. Biyofilm dağılımını indüklemek için optimum glukoz konsantrasyonu, kristal viyole boyamasına dayanan yöntem ile belirlendi ve test edilen koşullarda, 12 saatlik inkübasyonun ardından % 0,5 glukoz konsantrasyonunun en yüksek biyofilm dağılımını (% 38,33) indüklediği belirlendi. Sonuçlar, beklenmeyen bir şekilde, *csrA* mutasyonunun S. Typhimurium biyofilm oluşumu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. qRT-PZR denemeleri ile hem *csrA* mutasyonunun hem de aşırı ekspresyonunun AI-2'nin sentezi ve taşınmasında görevli *luxS*, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerini pozitif olarak düzenlediği belirlendi. Ek olarak, glukozun, araştırılan genlerin ekspresyonu üzerinde de olumlu bir etkiye sahip olduğu tespit edildi. Bu çalışmada ilk kez glukozu bağlı olarak, CsrA ve AI-2'yi kapsayan bir regülasyon modeli önerildi. Bu model, glukozun *csrA* ekspresyonunu aktive ettiğini ve *csrA*'nın AI-2 sentezini pozitif olarak düzenlediğini ve AI-2'nin hücre içine alımını negatif olarak düzenlediğini öne sürmektedir. S. Typhimurium biyofilmlerini yok etmek için yeni stratejiler geliştirmeye yardımcı olması amacıyla önerilen bu model, biyofilm dağılımının düzenleyici yolları hakkında yeni fikirler sunmaktadır.

2022, 125 sayfa

Anahtar kelimeler: *Salmonella*, biyofilm dağılımı, CsrA, AI-2, glukoz.

ABSTRACT

Master Thesis

Determination of The Effect of CsrA Regulation on AI-2 Synthesis and Uptake in *Salmonella* Typhimurium

Nasrine Bekhedda

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Nefise Akçelik

Salmonella Typhimurium (S. Typhimurium) is a biofilm-forming pathogen responsible for many foodborne outbreaks annually. Biofilms are cell populations attached to a surface and encased in a protective extracellular polymeric matrix, which provides these cells high resistance to stress conditions including antibiotics. Therefore, biofilm formation is considered a virulence trait of these pathogens, and developing effective strategies to combat these structures is a vital research topic. Biofilm dispersal, the last step of the biofilm development cycle, was shown to be a potential strategy for biofilm eradication since it releases planktonic cells that can be controlled by conventional treatments. The global carbon regulator protein CsrA is a positive regulator of S. Typhimurium biofilm dispersal by controlling cyclic di-GMP levels and activating flagella biosynthesis. In addition, the universal Quorum Sensing (QS) signal molecule autoinducer-2 (AI-2), which is synthesized by LuxS and transported into the cell by the Lsr transporter, plays an important role in S. Typhimurium biofilm formation. Glucose was found to affect both CsrA and AI-2 levels and to inhibit biofilm formation by S. Typhimurium. This thesis aimed at investigating the effect of CsrA on AI-2 synthesis and uptake into the cell. This effect was then evaluated at the optimum glucose concentration that induces biofilm dispersion. CsrA effect on AI-2 activity was evaluated using the reporter strain *Vibrio harveyi* BB170 and it was found that CsrA has a positive effect on extracellular AI-2 accumulation. The optimum glucose concentration to induce biofilm dispersion was determined by crystal violet assay and in the tested conditions, it was reported that 0.5 % glucose concentration induced the higher biofilm dispersal (38.33 %) after 12 hours of treatment. The results of this study showed that, surprisingly, *csrA* mutation had a negative effect on S. Typhimurium biofilm formation. qRT-PCR experiments showed that both *csrA* mutation and overexpression positively regulated *luxS*, *lsrA*, *lsrK* and *lsrR* genes which are involved in AI-2 synthesis and transport into the cell, respectively. In addition, glucose had also a positive effect on the expression of the studied genes. In this work, a regulation model encompassing glucose, CsrA and AI-2 was suggested for the first time. This model proposed that glucose activates *csrA* expression and *csrA* positively regulates AI-2 synthesis and negatively regulates AI-2 transport into the cell. This model may provide new insights into the regulatory pathways of biofilm dispersal, helping in developing novel strategies to eradicate S. Typhimurium biofilms.

2022, 125 pages

Keywords: *Salmonella*, biofilm dispersal, CsrA, AI-2, glucose.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bana araştırma grubunda çalışma fırsatı veren, yüksek lisans hayatımın her aşamasında yanımda olan, tez çalışmalarım sırasında yaşadığım stresi atlatmamda bana yardımcı olan, yönlendirmeleri ve katkıları ile zaman kendimi geliştirmeye teşvik eden ve bana gösterdiği sevgi ve anlayış için tez danışmanım Doç. Dr. Nefise Akçelik'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince birçok açıdan desteğini gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Akçelik'e ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı üyelerine teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21L0415003 kodlu proje ile desteklenmiştir. Desteğinden dolayı BAP'a teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi'nde Türkiye bursiyeri olarak bana eğitim görme fırsatı verdiği için Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Benimle birlikte hem mutlu hem de stresli anıları paylaşan, beni hep motive eden, her zaman her konuda yardım eden ve öğrendiği teknikleri bana öğreten değerli laboratuvar arkadaşım Melih Aşan'a teşekkür ederim. Fikirleriyle bana her zaman yardımcı olan ve tecrübelerini benimle paylaşan harika bir arkadaş olduğu için Sümeyye Altunok'a teşekkür ederim.

Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Türkiye'nin bana kazandırdığı değerli gurbet arkadaşlarım Jawad, Assala, Rouba, Wafa, Amani, Houda, Halima, Lama ve Radia'ya tüm yardımları için teşekkür ederim.

Beni yetiştirip bu günlere getiren ve hayatım boyunca her zaman destekleyen sevgili annem Souad Belabed ve babam Farid Bekhedda'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ONAY	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TESEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ.....	xi
CİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. SALMONELLA CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.1.1. SALMONELLA PATOGENEZ MODELİ ve VİRÜLANS FAKTÖRLERİ ...	5
2.2. BAKTERİYEL BİYOFİMLER.....	7
2.2.1. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI	9
2.3. SALMONELLA BİYOFİMLERİ	11
2.3.1. SALMONELLA BİYOFİLMİNİN Csr SİSTEMİ TARAFINDAN DÜZENLENMESİ	14
2.3.2. SALMONELLA BİYOFİLMİNİN QS TARAFINDAN DÜZENLENMESİ	16
2.4. BİYOFİLM YAPILARININ KONTROLÜ	18

2.4.1.	BİYOFİLM KONTROL STRATEJİSİ OLARAK BİYOFİLM DİSPERSYONU.....	20
2.4.2.	<i>SALMONELLA</i> BİYOFİLM DİSPERSİYONUNDA KULLANILAN STRATEJİLER.....	22
3.	<u>GEREKÇE VE AMAC</u>	24
4.	<u>MATERYAL VE YÖNTEM</u>	26
4.1.	MATERYAL	26
4.1.1.	BAKTERİLER, PLAZMİDLER ve GELİŞME KOŞULLARI	26
4.1.2.	BESİYERLERİ ve ÇÖZELTİLER.....	27
4.1.3.	PRİMERLER.....	29
4.2.	YÖNTEM	31
4.2.1.	LAMBDA RED REKOMBİNAZ SİSTEMİ ile <i>csrA</i> GENİ SPESİFİK MUTASYONUNUN OLUŞTURULMASI	31
4.2.1.1.	pKD46 ve pKD3 Vektörlerin İzolasyonu.....	32
4.2.1.2.	Touchdown PZR ile <i>csrA</i> Geni ile Homolog Bölgeler İçeren Kloramfenikol Direnç Gen Kasetinin Elde Edilmesi	33
4.2.1.3.	Elektrokompetan <i>S. Typhimurium</i> 14028 Hücrelerinin Hazırlanması... 34	
4.2.1.4.	pDK46 Plazmidin <i>S. Typhimurium</i> 14028 Elektrokompetan Hücrelerine Transformasyonu 35	
4.2.1.5.	Kloramfenikol Direnç Gen Kasetinin Transformasyonu	36
4.2.1.6.	Transformant Hücrelerde Kloramfenikol Gen Kaseti Varlığının Doğrulanması 36	
4.2.2.	<i>csrA</i> GENİNİN ARABİNOZ ile İNDÜKLENEBİLEN PROMOTORA SAHİP pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI ve TRANSFORMASYONU	37

4.2.2.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	37
4.2.2.2.	<i>csrA</i> Geninin PZR ile Amplifikasyonu	38
4.2.2.3.	pBAD24 Vektörünün İzolasyonu.....	39
4.2.2.4.	pBAD24 Vektörünün ve <i>csrA</i> Geninin İkili Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonları	40
4.2.2.5.	Ligasyon Reaksiyonları.....	41
4.2.2.6.	Elektrokompetan <i>S. Typhimurium</i> 14028Δ <i>csrA</i> Hücrelerinin Hazırlanması ve Rekombinant Plazmidin Transformasyonu	42
4.2.2.7.	Rekombinant Plazmidi İçeren Kolonilerin PZR ile Doğrulanması.....	42
4.2.3.	<i>SALMONELLA</i> 'DA <i>CsrA</i> REGÜLASYONUNUN OTOİNDÜKTÖR-2 AKTİVİTESİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....	43
4.2.3.1.	Suşlardan Süpernatant Eldesi	43
4.2.3.2.	<i>Salmonella</i> Suşlarının AI-2 Aktivitelerinin Belirlenmesi	44
4.2.4.	<i>S. TYPHIMURIUM</i> 14028 SUŞLARININ BİYOFİLM DİSPERSİYONUNU İNDÜKLEYEN OPTİMUM GLUKOZ KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİ.....	44
4.2.4.1.	Dispersiyonu İndükleyen Optimum Glukoz Konsantrasyonunun <i>S. Typhimurium</i> 14028Δ <i>csrA</i> Olgun Biyofilmleri Üzerine Etkisinin Araştırılması	45
4.2.5.	<i>CsrA</i> 'NIN AI-2 SENTEZİNDEN ve HÜCRE İÇİNE ALIMINDAN SORUMLU GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ	46
4.2.5.1.	Toplam RNA İzolasyonu	47
4.2.5.1.1.	Planktonik Hücrelerden RNA İzolasyonu	47
4.2.5.1.2.	Olgun Biyofilmden Dağılan Hücrelerden RNA İzolasyonu.....	47
4.2.5.2.	cDNA Sentezi.....	48

4.2.5.3.	Gen İfade Düzeylerinin qRT-PZR ile Belirlenmesi	48
4.2.5.4.	qRT-PZR Veri Analizi	49
4.2.6.	İSTATİSTİKİ ANALİZLER	50
5.	ARASTIRMA BULGULARI	51
5.1.	LAMBDA RED REKOMBİNAZ SİSTEMİ ile <i>csrA</i> GENİ SPESİFİK MUTASYONUNUN OLUŞTURULMASI	51
5.1.1.	pKD46 ve pKD3 PLAZMİDLERİNİN İZOLASYONU	51
5.1.2.	<i>csrA</i> GENİ ile HOMOLOG BÖLGELER İÇEREN KLORAMFENİKOL DİRENÇ GEN KASETİNİN ELDE EDİLMESİ	52
5.1.3.	pKD46 PLAZMİDİNİN <i>S. TYPHİMURİUM</i> 14028 SUŞUNA TRANSFORMASYONU	54
5.1.4.	KLORAMFENİKOL DİRENÇ GEN KASETİNİN TRANSFORMASYONU	55
5.2.	<i>csrA</i> GENİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI ve TRANSFORMASYONU	57
5.2.1.	<i>S. TYPHİMURİUM</i> 14028 SUŞUNDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU	57
5.2.2.	<i>csrA</i> GENİNİN COĞALTILMASI	58
5.2.3.	pBAD24 VEKTÖRÜN İZOLASYONU	59
5.2.4.	RESTRİKSİYON ENDONUKLEAZ ENZİM KESİM REAKSİYONLARI	60
5.2.5.	REKOMBİNANT PLAZMİDİN <i>S. Typhimurium</i> 14028Δ <i>csrA</i> HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU	62
5.3.	CsrA REGÜLASYONUNA BAĞLI OLARAK OTOİNDÜKTÖR-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	64

5.4. S. TYPHİMURİUM 14028 SUŞLARIN BİYOFİLM DİSPERSİYONUNU İNDÜKLEYEN OPTİMUM GLUKOZ KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ	66
5.4.1. BİYOFİLM DİSPERSİYONUNU İNDÜKLEYEN OPTİMUM GLUKOZ KONSANTRASYONUNUN S. TYPHİMURİUM 14028ΔcsrA OLGUN BİYOFİLM ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI	68
5.4.1.1. S. Typhimurium 14028ΔcsrA Suşlarının Biyofilm Üretim Özelliklerinin Belirlenmesi	68
5.5. CsrA’NIN AI-2 SENTEZİNDEN ve HÜCRE İÇİNE ALIMINDAN SORUMLU GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ	70
<u>6. TARTISMA VE SONUC</u>	<u>76</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>84</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>103</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>104</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Salmonella</i> Typhimurium elektron mikroskop görüntüsü (Volker Brinkmann, Max Planck Enfeksiyon Biyolojisi Enstitüsü, Berlin, Almanya) (25).....	4
Şekil 2.2. <i>P. aeruginosa</i> biyofilm oluşum aşamalarını (72). (1) Geri dönüşümlü tutunma, (2) Geri dönüşümsüz tutunma, (3) Mikrokolonilerin oluşumu, (4) Biyofilm olgunlaşması, (5) Biyofilm dağılımı (dispersiyon)	11
Şekil 2.3. Taramalı elektron mikroskobu ile çekilen <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin görüntüleri (77)	12
Şekil 2.4. Glukoz varlığında CsrA regülasyonu (87)	15
Şekil 2.5. Glukoz yokluğunda CsrA regülasyonu (87).....	16
Şekil 2.6. AI-2'nin sentezi ve Lsr proteinleri tarafından taşınması ve modifikasyonunu....	18
Şekil 4.1. pKD46 vektörünün genetik haritası (127).....	32
Şekil 4.2. pKD3 plazmidinin genetik haritası (128).....	33
Şekil 4.3. pBAD24 plazmidinin genetik haritası (130)	40
Şekil 5.1. pKD46 plazmidinin agaroz jel görüntüsü	51
Şekil 5.2. pKD3 plazmidinin agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 5.3. <i>csrA</i> geni ile homolog bölgeler içeren kloramfenikol direnç gen kasetinin agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 5.4. Saflaştırılmış kloramfenikol direnç gen kasetinin agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 5.5. <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşuna pKD46 plazmit transformasyonunun sonucunda oluşan koloniler	54
Şekil 5.6. pKD46 plazmit transformasyonunun sonucunda oluşan transformantlarda pKD46 plazmidinin tespiti	55

Şekil 5.7. <i>csrA</i> genini inaktive etmek için bakteriyofaj lambda'nın Red rekombinaz sistemine dayanan yöntem.....	56
Şekil 5.8. <i>S. Typhimurium</i> 14028'da <i>csrA</i> gen mutantının tespiti	57
Şekil 5.9. Genomik DNA jel görüntüsü	58
Şekil 5.10. <i>csrA</i> geninin jel görüntüsü.....	59
Şekil 5.11. pBAD24 plazmidinin jel görüntüsü	60
Şekil 5.12. pBAD24 plazmid vektörü ikili restriksiyon endonukleaz enzim kesimi agaroz jel görüntüsü	61
Şekil 5.13. <i>csrA</i> geninin ikili restriksiyon endonukleaz enzim kesimi agaroz jel görüntüsü	62
Şekil 5.14. <i>csrA</i> PZR ürününün pBAD24 vektörüne insersiyonu ile elde edilen rekombinant plazmid. Rekombinant plazmid, SnapGene 5.3 kullanarak görselleştirildi	63
Şekil 5.15. <i>S. Typhimurium</i> 14028 Δ <i>csrA</i> suşuna rekombinant plazmidin (<i>csrA</i> genini içeren pBAD24 plazmidi) transformasyonu sonucunda oluşan koloniler.....	63
Şekil 5.16. Koloni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	64
Şekil 5.17. Doğal tip <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşu, <i>csrA</i> geni bakımından mutant suş ve <i>csrA</i> 'nın aşırı ekspresyonunu gerçekleştiren suşların 4 saatlik bağlı AI-2 aktivitesi.....	65
Şekil 5.18. Üç farklı inkübasyon süresi (12 saat, 16 saat ve 24 saat) boyunca 4 farklı glukoz konsantrasyonu (% 2, % 1, % 0,5 ve % 0,25) ile muamele edilen <i>S. Typhimurium</i> biyofilm yapısının dispersiyon yüzdesi.....	67
Şekil 5.19. Doğal tip, <i>csrA</i> geni bakımından mutant ve <i>csrA</i> 'nın aşırı ifade edildiği <i>S. Typhimurium</i> suşlarının biyofilm üretim düzeyleri	68
Şekil 5.20. <i>Salmonella</i> test gruplarından izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel görüntüsü	71
Şekil 5.21. <i>csrA</i> ifadesine bağlı olarak <i>Salmonella</i> suşlarında araştırılan genlerin doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği.....	72

Şekil 5.22. Arabinoz varlığında ve yokluğunda <i>Salmonella</i> test gruplarında ifadesi araştırılan genlerin log2 kat değişim grafiği.....	73
Şekil 5.23. <i>Salmonella</i> suşlarında glukozla bağı olarak dispersiyon için optimum olan koşullarda araştırılan genlerin glukoz eklenmemiş doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği	74
Şekil 6.1. Bu çalışmada önerilen <i>S. Typhimurium</i> 'da glukoz molekölü, CsrA ve AI-2 molekölü kapsayan regölasyon modeli...	82



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan suşlar ve kodları	26
Çizelge 4.2. Tez çalışmasında kullanılan plazmidler	27
Çizelge 4.3. LB Broth ve Agar (Merck, Almanya)	27
Çizelge 4.4. NaCl içermeyen LB Broth.....	27
Çizelge 4.5. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)	28
Çizelge 4.6. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)	28
Çizelge 4.7. Stok Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu (5X).....	28
Çizelge 4.8. Fosfatla Tamponlanmış Tuz (PBS)	28
Çizelge 4.9. Glukoz Çözeltisi (% 10)	29
Çizelge 4.10. Serum Fizyolojik	29
Çizelge 4.11. Kloramfenikol direnç gen kaseti taşıyan <i>csrA</i> mutantlarının elde edilmesinde kullanılan primerler	29
Çizelge 4.12. <i>csrA</i> mutasyonunun doğrulanmasında kullanılan primer çifti	30
Çizelge 4.13. <i>csrA</i> geninin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primer çifti	30
Çizelge 4.14. pBAD24 vektörüne klonlanan genin koloni PZR ile doğrulanmasında kullanılan primer çifti	30
Çizelge 4.15. qRT-PZR yöntemi ile ekspresyon seviyeleri belirlenen genlerin primer dizileri ve oluşturdıkları ürünlerin büyüklükleri.....	31
Çizelge 4.16. Touchdown PZR karışımı (1X).....	34
Çizelge 4.17. Touchdown PZR sıcaklık döngüsü.....	34
Çizelge 4.18. Koloni PZR reaksiyon karışımı (1X)	37
Çizelge 4.19. Koloni PZR sıcaklık döngüsü	37

Çizelge 4.20. <i>csrA</i> geninin PZR ile amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı (1X)	38
Çizelge 4.21. <i>csrA</i> geninin PZR ile amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüsü	39
Çizelge 4.22. PZR ürünü <i>csrA</i> geninin ikili RE kesim reaksiyon karışımı	41
Çizelge 4.23. pBAD24 vektör DNA'nın ikili kesim reaksiyon karışımı	41
Çizelge 4.24. Ligasyon reaksiyon karışımı	42
Çizelge 4.25. Koloni PZR reaksiyon karışımı (1X)	43
Çizelge 4.26. Koloni PZR sıcaklık döngüsü	43
Çizelge 4.27. Ters transkripsiyon karışımı	48
Çizelge 4.28. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü	48
Çizelge 4.29. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı	49
Çizelge 4.30. LightCycler 480 cihazında kullanılan qRT-PZR program	49
Çizelge 5.1. Test edilen sıcaklık ve inkübasyon süreçlerinde doğal tip <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşun "Cut-off" OD (sınır değer, OD _c) ve OD _{suş} değerleri	69
Çizelge 5.2. Test edilen sıcaklık ve inkübasyon süreçlerinde <i>S. Typhimurium</i> 14028Δ <i>csrA</i> suşunun "Cut-off" OD (sınır değer, OD _c) ve OD _{suş} değerleri	70
Çizelge 5.3. Test edilen sıcaklık ve inkübasyon süreçlerinde MN1830 (pBAD24 vektörüne klonlanmış <i>csrA</i> genini içeren vektörü taşıyan <i>S. Typhimurium</i> 14028) suşunun "Cut-off" OD (sınır değer, OD _c) ve OD _{suş} değerleri	70
Çizelge 5.4. <i>Salmonella</i> suşlarında <i>csrA</i> regülasyonuna bağlı olarak araştırılan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı (2 ^{ΔΔCt} değerleri)	71
Çizelge 5.5. Kullanılan arabinoz konsantrasyonuna bağlı olarak test gruplarında yer alan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı (2 ^{ΔΔCt} değerleri)	73

Çizelge 5.6. Dispersiyon için optimum olan glukoz konsantrasyonuna (% 0,5) ve inkübasyon süresine (12 saat) bağlı olarak araştırılan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı ($2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri) 74



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
AB Broth	Otoindüktör biyoanaliz besiyeri
AHL	Açıl homoserin lakton
AI-2	Otoindüktör-2
ATCC	American Type Culture Collection
bç	Baz çifti
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
c-di-GMP	Siklik diguanilat monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik döngüsü
ddH ₂ O	Çift distile su
DGC	Diguanilat siklaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP.	Deoksinükleotid trifosfat.
eDNA	Hücre dışı deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	Hücre dışı polimerik maddeler
EtBr	Etidyum bromür
g	Gram
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
kb	Kilobaz
LB	Luria-Bertani
log	Logaritma
M	Molarite
mg	Miligram

mL	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ng	Nanogram
NK	Negatif kontrol
NTS	Tifoid olmayan Salmonella
OD	Optik yoğunluk
ORF	Açık okuma çerçevesi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PDE	Fosfodiesteraz
pH	Hidrojen gücü
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Quorum sensing
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SCV	Salmonella içeren vakuoller
SEM	Ortalamanın standart hatasını
SPI	<i>Salmonella</i> patojenite adaları
sRNA	Küçük ribonükleik asit
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
UTR	Kodlanmayan bölge
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Doğada, bakteriler iki farklı yaşam formunda bulunurlar: i) Serbest yaşayan planktonik bakteriler ve ii) Biyofilm olarak adlandırılan yapının içerisinde bulunan sessil bakteriler. Biyofilm, koruyucu bir polimerik matriks içerisinde bulunan, canlı (biyotik) veya cansız (abiyotik) bir yüzeye tutunmuş hücreler topluluğudur. Biyofilm oluşturan bakteriler; ultraviyole (UV), metal toksisitesi, dehidrasyon, yüksek tuz konsantrasyonu, antibiyotikler ve antimikrobiyal bileşikler gibi çok çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı yüksek direnç gösterirler (1-5). Biyofilm ilişkili bakterilerin antimikrobiyallere karşı planktonik hücrelere kıyasla 10-1000 kat daha dirençli olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisi daha zor ve maliyetlidir (6-8).

Gıda kaynaklı hastalıkların en yaygın nedeni olarak bilinen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, tedavisi zor gastroenterit enfeksiyonlarına ve gıda üretim hatlarını kolonize ederek ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (9, 10). *Salmonella* cinsi bakteriler, virülansını artırmak için biyofilm oluşturarak, antimikrobiyellere ve konak bağışıklık sistemine karşı daha dirençli hale gelmektedir (11).

Biyofilm oluşumunu genel olarak beş evrede incelemek mümkündür. İlk evre, bakterilerin yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunması sağlanır. İkinci evrede, geri dönüşümsüz bağlanma ve matriks bileşenlerinin üretimi gerçekleşir. Üçüncü evrede, mikro kolonilerin oluşumu ile biyofilm yapısı olgunlaşmaya başlar. Dördüncü evrede, olgun biyofilm yapısı meydana gelir. Son aşamada ise, biyofilm yapısı farklı koşullar sebebiyle dağılmaya başlayarak yeni bir döngünün başlamasına neden olur (5).

Biyofilm yapıları ile mücadelede sıklıkla iki farklı strateji izlenmektedir: i) Antimikrobiyallerle yüzey kaplama dahil olmak üzere çeşitli stratejiler kullanılarak geri dönüşümsüz bağlanmanın oluşmasını ve biyofilm oluşumunun engellenmesi ii) Biyofilmin üç boyutlu yapısının bozulmasını sağlanarak olgun biyofilmlerin eradikasyonun gerçekleşmesi. Biyofilm hücrelerinin EPS (hücre dışı polimerik maddeler) tarafından yüksek oranda korunduğu göz önüne alındığında, biyofilm eradikasyonu için daha yüksek antimikrobiyal konsantrasyonlar gerekir. Bu nedenle biyofilm hücrelerini koruyan EPS yapısından ayırmaya yönelik yaklaşımların araştırılması büyük önem taşımaktadır (12). Biyofilm yapısının dağılma aşamasında bakteriler planktonik forma dönerek daha savunmasız hale gelmektedir. Biyofilm yapısından ayrılan bakterilerin antibiyotiklere ve

antimikrobiyal ajanlara daha duyarlı olması sebebiyle, etkin biyofilm eradikasyon stratejileri belirlemek amacıyla son yıllarda biyofilm dispersiyon ajanları ve dispersiyon sürecinde rol alan genetik faktörler konusunda yoğun araştırmalar gerçekleştirilmektedir (13).

Biyofilm oluşumu ve dağılımı, çeşitli bakteri cinslerinde aydınlatılmış olsa da, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biyofilmlerinin dağılımı hakkında bildiklerimiz oldukça sınırlıdır. Karbon depolama düzenleyicisi olan CsrA proteininin ifadesinin, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *S. Typhimurium*'da biyofilm dispersiyonunu indüklediği bilinmektedir (14). CsrA proteinin, *S. Typhimurium*'da (3-5)-siklik-diguanosin monofosfat (c-di-GMP) sinyal moleküllerinin degradasyonunu regüle ederek hareket (motilite) yollarını aktive ettiği ve biyofilm oluşumunda rol alan faktörlerin üretimini engellediği bilinmektedir (15). Ayrıca, CsrA seviyesinin, glukoz varlığında artış gösterdiği yönünde bulgular literatürde yer almaktadır (16).

Bakterilerde, biyofilm oluşumunu önemli derecede etkileyen bir başka bakteriyel süreç ise QS (Quorum Sensing) sinyalizasyonudur. QS, otoindüktör olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimi, tanınması ve yanıtlanması yoluyla meydana gelen popülasyon yoğunluğuna bağlı gen ifadesinin düzenlenmesi mekanizmasıdır (17). Virülans, hareket (motilite) ve biyofilm oluşumu gibi birçok bakteriyel sürecin bu mekanizma tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Gram negatif ve/veya Gram pozitif bakteriler arasında "evrensel dil" olarak kullanılan otoindüktör 2 (AI-2) moleküllerinin (18) çeşitli bakteri cinslerinde biyofilm yapısının dağılımında rol oynadığı bilinmektedir (19, 20). *Salmonella Typhimurium*'da AI-2, *luxS* geni tarafından kodlanan LuxS sentaz enzimi tarafından üretilerek eksponansiyel üreme fazında salınır ve durağan fazın başlangıcında ATP bağlayıcı kaset (ABC) olan Lsr taşıma sistemi ile bakterilere aktarılır (21). *luxS*/AI-2 sistemi, *Salmonella Typhimurium*'da hareketlilik, biyofilm oluşumu, virülans ve hücresel işlevlerle ilişkili genlerin ifadesini etkilemektedir (22). CsrA'ya benzer bir şekilde, AI-2'nin hücre dışındaki seviyesi ve aktivitesi ortamda bulunan glukoz miktarından da etkilenmektedir (22, 23). CsrA ve AI-2'nin ortak hücresel süreçleri düzenlediği ve karbon kaynağı seviyesinden etkilendikleri bilinmektedir. Bu nedenle CsrA ve AI-2'nin arasında bir etkileşim olabileceği düşünülmüştür. *S. Typhimurium* patojeninin biyofilm dispersiyonunu düzenleyen yollarının aydınlatılması, biyofilm yapısı ile mücadelede yeni stratejiler belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

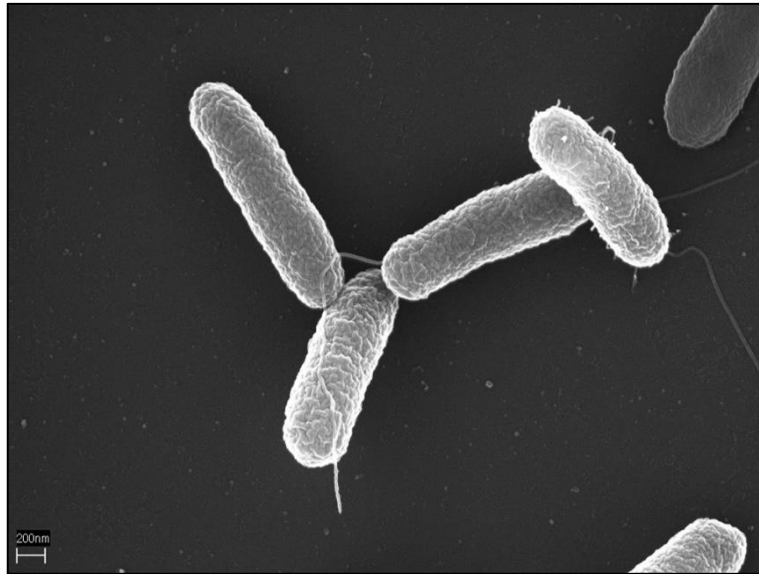
Bu tez çalışmasında, CsrA regülasyonunun AI-2 sentezine ve hücre içine alımına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca CsrA regülasyonun, glukozla indüklenen *S. Typhimurium* biyofilmlerinin dispersiyonu esnasında etkinin araştırılması çalışmaları literatürde ilk defa bu tez çalışmaları kapsamında araştırılmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *SALMONELLA* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Salmonella cinsi, Gram negatif, spor oluşturmeyen, çubuk şekilli bakterilerdir (Şekil 2.1.). Bu mikroorganizmaların çapları yaklaşık 0,7-1,5 µm ve uzunluğu 2-5 µm arasında değişmektedir. Fakültatif anaerob organizmalardır ve ağırlıklı olarak peritrik hareketlilik gösterirler (24). Kauffmann-White sınıflandırma şemasına göre *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan *Salmonella* cinsi; *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki geniş türe sahiplik yapmaktadır. *S. enterica*; *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salama* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) ve *S. enterica* subsp. *indica* (VI) olmak üzere altı alt türe ayrılır. *S. bongori* ise, II, IIIa, IIIb, IV ve VI olarak adlandırılan alt türlere ayrılmaktadır. Bu alt türler, esas olarak soğukkanlı omurgalılarda bulunurken, klinik örneklerden nadiren izole edilirler. Bu nedenle insanlarda ve evcil hayvanlarda hastalığa neden olan *Salmonella* organizmalarının hemen hemen hepsi *S. enterica* subsp. *enterica* (I)'ya aittir. *S. enterica* suşları, O (lipopolisakkarit) ve H (flagellar) antijenlerine göre 2557 serovar içerir ve klinik olarak en önemli olan serovarlar Typhi, Paratyphi, Enteritidis ve Typhimurium olarak bilinmektedir (11).



Şekil 2.1. *Salmonella* Typhimurium elektron mikroskop görüntüsü (Volker Brinkmann, Max Planck Enfeksiyon Biyolojisi Enstitüsü, Berlin, Almanya) (25)

S. enterica, kontamine sulardan, hayvansal ürünlerden, enfekte veya taşıyıcı biri ile yakın temastan bulaşmaktadır. Bu mikroorganizmalar dört ana sendroma neden olabilirler: enterik ateş (tifo), gastroenterit, bakteriyemi ve kronik asemptomatik taşıyıcılık. Enterik ateşe insan patojenleri *S. enterica* serovar Typhi ve *S. enterica* serovar Paratyphi A/B neden olurken, ishalleri hastalıklara esas olarak klinik ortamlarda en yaygın izole edilen non-tifoidal *Salmonella* (NTS) olarak bilinen *S. enterica* serovar Enteritidis ve *S. enterica* serovar Typhimurium neden olmaktadır. Bu serovarlar inek, köpek ve domuz gibi hayvanları da enfekte edebilirler (26).

S. enterica, tifoid olmayan *Salmonella* (NTS) nedeniyle 3 milyon ölüm dahil 200 milyon ila 1,3 milyar bağırsak hastalığı vakasına neden olduğu için büyük klinik öneme sahiptir (24). Tifoid olmayan *Salmonella* (NTS), 5 yaşın altındaki çocuklar arasında yüksek morbidite ve ölümün başlıca nedenidir. Kenya'da yapılan bir çalışmada, çocuklardan toplanan örneklerden elde edilen NTS serotiplerinin % 59'unun *S. Typhimurium* ve % 28,3'ünün *S. Enteritidis* içerdiği bildirilmiştir (27). 2001'den 2009'a kadar Kanada'da, taze meyve ve sebze tüketimine bağlı bakteriyel enfeksiyon salgınlarının % 50'sinin *Salmonella*'dan kaynaklandığı bilinmektedir (28). Her yıl farklı *Salmonella* serovarlarıyla bağlantılı birçok salgın rapor edilmektedir.

2.1.1. SALMONELLA PATOGENEZ MODELİ ve VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Salmonella Typhimurium ile kontamine yiyecek veya su alınmasıyla bakteriyel enfeksiyon başlar. *S. Typhimurium*, hücre içi pH'sını hücre dışı ortamından daha yüksek değerlerde tutmak için asit tolerans tepkisini aktive ederek midenin asidik pH'sında hayatta kalır. Bu patojen, bağırsak mukus tabakasını geçtikten sonra bağırsak epitel hücrelerine yapışır. Yapışmadan sonra istila süreci, konakçı hücrelerin sitoskelet yapısını yeniden düzenler ve yapışık bakterilerin kapsüllenerek hücrelerin konakçı hücrelerin içerisinde hayatta kalıp çoğalabildiği *Salmonella* içeren vakuoller (SCV'ler) adı verilen büyük veziküller oluşur. Eşzamanlı olarak, fagositlerin submukozal boşluktan bağırsak lümenine toplanması ve göçü başlar. Daha sonra SCV'ler bazolateral membrana transsitoz yaparak bakterileri submukozaya bırakır. Bakteriler daha sonra fagositler tarafından fagosit edilerek tekrar SCV'ler haline dönüşürler. Son olarak, bu enfekte fagositler, bakterilerin kan dolaşımı yoluyla diğer dokulara sistemik yayılmasını kolaylaştırarak invazif hastalığın ilerlemesine sebebiyet verir (11).

S. Typhimurium, yukarıda bahsedilen enfeksiyon basamakları esnasında konakçı savunma mekanizmaları ile etkileşim kurmak için kullanılan birçok virülans faktörüne ve farklı stratejilere sahiptir. En önemli virülans faktörlerini kodlayan genlerin çoğu, yüksek oranda korunmuş *Salmonella* Patojenite Adaları'nda (SPI) bulunurken, diğerleri virülans plazmitinde veya kromozomol DNA'da yer alır (29, 30).

Şimdiye kadar toplam beş SPI'nın (SPI-1 ila SPI-5), *S. Typhimurium* virülansına direkt olarak dahil olduğu tespit edilmiştir. En önemlileri ve iyi çalışılanları, SPI-1 ve SPI-2'dir. Her iki SPI, konakçı biyokimyasını ve hücre fizyolojisini doğrudan etkilemek için bakteriyel ve konakçı membranlar aracılığıyla konakçı hücrelere veya hücre dışı ortama 'efektörler' olarak bilinen bakteri proteinlerini enjekte edebilen Tip III Salgılama Sistemi (T3SS) adı verilen moleküler bir aparatı kodlar. SPI-1, aktin hücre iskeleti yeniden düzenlemelerine aracılık ederek bakterilerin fagosite edilmesine aracılık eder ve çoğunlukla epitel hücrelerin istilasını tetikleyen birkaç efektör proteini kodlar (31). SPI-2 patojenite adası, hücre içi parazitizm için ve *Salmonella*'nın, SCV'ler olarak konakçı hücrelerin (epitel hücreleri ve makrofajlar) içerisinde hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi için esastır (32). SPI-3, sistemik yayılma sırasında hem ilk bağlanma hem de uzun süreli kalıcılığın yanı sıra bakteriyel hayatta kalma ile ilişkilidir. SPI-4, bağırsak epiteli ile ilk etkileşim sırasında rol oynar. SPI-5, enfeksiyon sırasında çeşitli patojenik süreçlerin gerçekleştirilmesinde rol oynar (29).

Virülans plazmidi, sadece *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* ve *S. Dublin* gibi klinik olarak önemli serovarlarda bulunabilir. Serovara bağlı olarak boyutu 50 ila 95 kb arasında değişen serovar spesifik bir plazmittir. *S. Typhimurium*'da ise, yaklaşık 95 kb'dir ve pSLT olarak adlandırılmıştır. Bu plazmit, hastalığın hücre içi evresinde konağın proinflamatuvar yanıtında rol oynayan efektör proteinleri kodlar (33).

Flagella, *S. Typhimurium*'un sadece motilite ve kemotaksis için değil aynı zamanda patogenezdaki diğer birçok süreç için gerekli olan yüzey uzantılarından (34).

En önemli adezinler, Tip I fimbriya ve kıvrımlı fimbriyadır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonucunda, fimbriyaların çeşitli patojenik süreçlerde yer aldığı bildirilmiştir. Bunların arasında, spesifik epitel hücrelerine yapışma, bağırsak sıvı birikimi, farelerde bağırsakta kalıcılık ve klinik olarak tedavi edilmesi zor biyofilmlerin oluşumu yer almaktadır (35-37).

2.2. BAKTERİYEL BİYOFİMLER

Biyofilm, bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve ürettikleri hücre dışı polimerik maddelerden oluşan bir matrikse gömülü hücreler tarafından karakterize edilen sessiz bir mikrobiyal topluluktur. Biyofilm hücreleri, üreme hızları ve gen transkripsiyonu açısından planktonik formlarından farklıdırlar. Biyofilmler; canlı dokular, takılmış tıbbi cihazlar, endüstriyel ve doğal su sistemleri gibi farklı yüzeylerde oluşabilmektedir (1-5). Biyofilmler, tek bir mikrobiyal tür veya birden fazla mikrobiyal tür içerebilir. Dünyadaki bakteri hücrelerinin yaklaşık % 40-80'inin biyofilm oluşturabileceği bilinmektedir (38).

Biyofilm oluşumu, UV ışığına maruz kalma, metal toksisitesi, dehidrasyon ve tuzluluk, fagositoz, antibiyotikler ve antimikrobiyal ajanlar gibi çok çeşitli çevresel strese koruma sağlamaktadır (2, 4). Artan antimikrobiyal direnç, birçok faktörden kaynaklanabilir. Antimikrobiyal ajanların biyofilm yapısına geç penetrasyonu, yüksek konsantrasyonda hücre dışı antibiyotik parçalayıcı enzimleri içeren biyofilm matriksi, persister (inatçı) hücrelerin oluşumuna yol açan alt popülasyonların metabolik heterojenliği, antibiyotik duyarlılığını etkileyen genleri kodlayan çoklu gen ağlarının farklı ifadesi ve yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin kazanılması farklı mikrobiyal türlerde yüksek direncin ana mekanizmaları olarak gösterilmiştir (39).

Hücre dışı polimerik maddeler (EPS) matriksi; polisakaritler, proteinler, hücre dışı DNA (eDNA), lipitler ve su moleküllerinden oluşmaktadır. EPS matriksinin kimyasal ve fiziksel özellikleri bakteri türüne ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterebilmektedir (40). Polisakaritler, EPS matriksinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır ve esas olarak biyofilmlerin mekanik stabilitesinin desteklenmesinde rol oynarlar (41). Proteinler, biyofilm oluşumunda ve dağılımında farklı rollere sahiptirler. Hücrelerin yüzeylere tutunmasına katkıda bulunarak, ekzopolisakkarit ve nükleik asit bileşenleri ile etkileşim yoluyla biyofilm matriksini stabilize ederler. Ayrıca üç boyutlu biyofilm yapılarının gelişmesinde rol alarak biyofilm oluşumunda ve polisakkaritlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin enzimatik degradasyonu yoluyla biyofilm dağılımında rol oynarlar (42). eDNA, bakteri yapışmasına ve biyofilmin yapısal stabilitesine katkıda bulunmanın yanı sıra, yatay gen transferi yoluyla biyofilm hücrelerinin antibiyotiklere ve konak immün efektörlerine karşı direnç kazanmasını kolaylaştırır (43). Lipitler, bakteriyel yapışma ve biyofilmin yapısal stabilitesi için oldukça önemlidir. Matriksin en yüksek oranda bulunan bileşeni olan su molekülleri ise EPS'nin bakterilere besin dağılımını sağlaması için katkıda bulunur (40). Biyofilm hücrelerini

öldürmek için antimikrobiyal moleküllerin biyofilm matriksinden geçmesi gerekir. Bununla birlikte, EPS matriksi bu moleküllerin biyofilm içine taşınmalarını ve dolayısıyla biyofilm hücreleri ile temaslarını engelleyen bir difüzyon bariyeri olarak görev yapar (8). Ek olarak, EPS matriksi, biyofilm hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan antibiyotikleri parçalayabilen enzimleri içererek biyofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı direncine katkıda bulunmaktadır (44).

Biyofilm direncine neden olan bir diğer mekanizma ise, persister hücrelerin oluşumudur. Biyofilm yapısının farklı katmanları arasındaki besin ve oksijen mevcudiyeti farklıdır ve daha derin katmanlarda daha az besin ve oksijen bulunur. Bu nedenle alt katmanlarda yaşayan bakterilerin, biyofilm yüzeyine yakın bulunan bakterilerden daha düşük metabolik aktiviteye ve üreme hızına sahip olduğu bilinmektedir. Persister hücreler olarak adlandırılan ve metabolik olarak aktif olmayan bu tür hücreler, antibiyotik tedavilerini tolere ederek biyofilm enfeksiyonlarının direncine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Persister hücrelerin antibiyotiklere karşı yüksek toleransı, klinikte kullanılan antibiyotiklerin hedeflerinin çoğunu temsil eden transkripsiyon, translasyon, genom replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi hücresel süreçlerin düşük seviyelerde gerçekleştirilmesi ile açıklanabilmektedir (44).

Ek olarak biyofilm yapısı, yüksek hücre yoğunluğu ve hücre yakınlığı, artan genetik çeşitlilik ve EPS matriksi içine eDNA salgılanması nedeniyle yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin alımını destekleyebilmektedir (45). Sonuç olarak, yukarıda bahsedilen mekanizmalar, antimikrobiyallere ve antibiyotiklere karşı biyofilm direncini birden fazla yolla artırmada rol oynamaktadır.

Biyofilmlerin tıp ve halk sağlığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu giderek daha açık hale gelmektedir. Kronik enfeksiyonların yaklaşık % 80'ine sebep olarak hastaneye yatış oranlarında, sağlık bakım maliyetlerinde, morbidite ve mortalitede artışa yol açtığı bilinmektedir (8). Bu yapı, kateterler, protez kalp kapakçıkları ve kontakt lensler gibi birçok tıbbi implant üzerinde oluşabilir (46) ve antimikrobiyal maddelere karşı artan dirençleri nedeniyle enfeksiyonlar genellikle implantın çıkarılmasıyla tedavi edilebilir. Bu nedenle tedavi maliyeti ve hasta için travmayı artırır (47). Ek olarak, mikrobiyal biyofilmler, kistik fibroz gibi birçok enfeksiyöz hastalıkta rol oynarlar (48). *Legionella pneumophila* (49), *Staphylococcus aureus* (50), *Listeria monocytogenes* (51), *Escherichia coli* (52), *Salmonella*

Typhimurium (53), *Vibrio cholerae* (54) ve *Helicobacter pylori* (55) dahil olmak üzere çeşitli bakteriyel patojenlerin biyofilmle ilgili enfeksiyonlara yol açtığı gösterilmiştir.

Gıda endüstrisinde, biyofilmler yüzeylerde oluşabildikleri gibi gıda kaynaklı salgınların yaklaşık % 60'ına sebebiyet verdiklerinden gıda güvenliği açısından da önemli bir risk oluşturmaktadır (56). Bunun yanı sıra, gıda bozulmalarına neden olarak ciddi ekonomik sonuçlara yol açmaktadır (10). Tarım yapılan alanlarda da biyofilm ilişkili hastalıklar gözlenmekte ve kayıplara neden olmaktadır. Örneğin arabidopsis ve *Ocimum basilicum* (tatlı fesleğen) köklerinde bulunan *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin bitki ölümüne neden olabileceği belirlenmiştir (57).

Denizcilik sektöründe de biyofilm oluşumu ciddi sonuçlara yol açabilmektedir. Deniz biyolojik kirliliği (marine biofouling), gemi gövdeleri ve petrol veya gaz tesisatları dahil olmak üzere deniz suyuna maruz kalan doğal veya insan yapımı nesneler üzerinde istenmeyen organizma birikimi meydana gelebilir (58). Biyolojik kirlilik, denizcilik endüstrisinde ve açık denizde giden sivil gemiler için büyük bir zorluk oluşturur. Genel olarak, gemi gövdelerinde biyofilmlerin birikmesi, gemicilik endüstrisi için hızın düşürülmesi, temizlik süresinin uzaması ve daha fazla yakıt tüketimi gibi zorluklara neden olabilir (59). Ek olarak, gemi gövdelerinin biyolojik olarak kirlenmesi, istilacı deniz türlerinin yeni habitatlara yayılması için önemli bir vektör olarak kabul edilmiştir (60). Bu nedenle biyofilm oluşumu hem gemi kullanım maliyetini hem de deniz ortamının ekolojik dengesini etkileyebilmektedir.

2.2.1. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI

Biyofilmlerin oluşumu, daha önce de belirtildiği gibi beş basamakta incelenebilen çok aşamalı bir süreçtir. Biyofilm yapısının oluşumunun ilk aşaması bakterilerin yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunmasıdır. Ardından geri dönüşümsüz bağlanma ve mikro kolonilerin oluşumu ile biyofilm oluşumu ilerler. Dördüncü olarak, olgun biyofilm yapısı oluşur. Son aşama olan beşinci aşamada ise, olgun biyofilm farklı koşullar altında dağılmaya başlar (Şekil 2.2.) (61). Bu basamaklardan aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

İlk basamak olan geri dönüşümlü tutunma, planktonik hücreler ve yüzey arasındaki etkileşimle başlar. Hücreler bir yüzeye ulaştığında, hücreler ve yüzey arasındaki etkileşim, aralarında oluşturulan itici veya çekici kuvvetlerin net toplamına bağlıdır. Çekici kuvvetler itici kuvvetlerden daha büyükse, bakteri yüzeye yapışacaktır (62). Yüzey pürüzlülüğü,

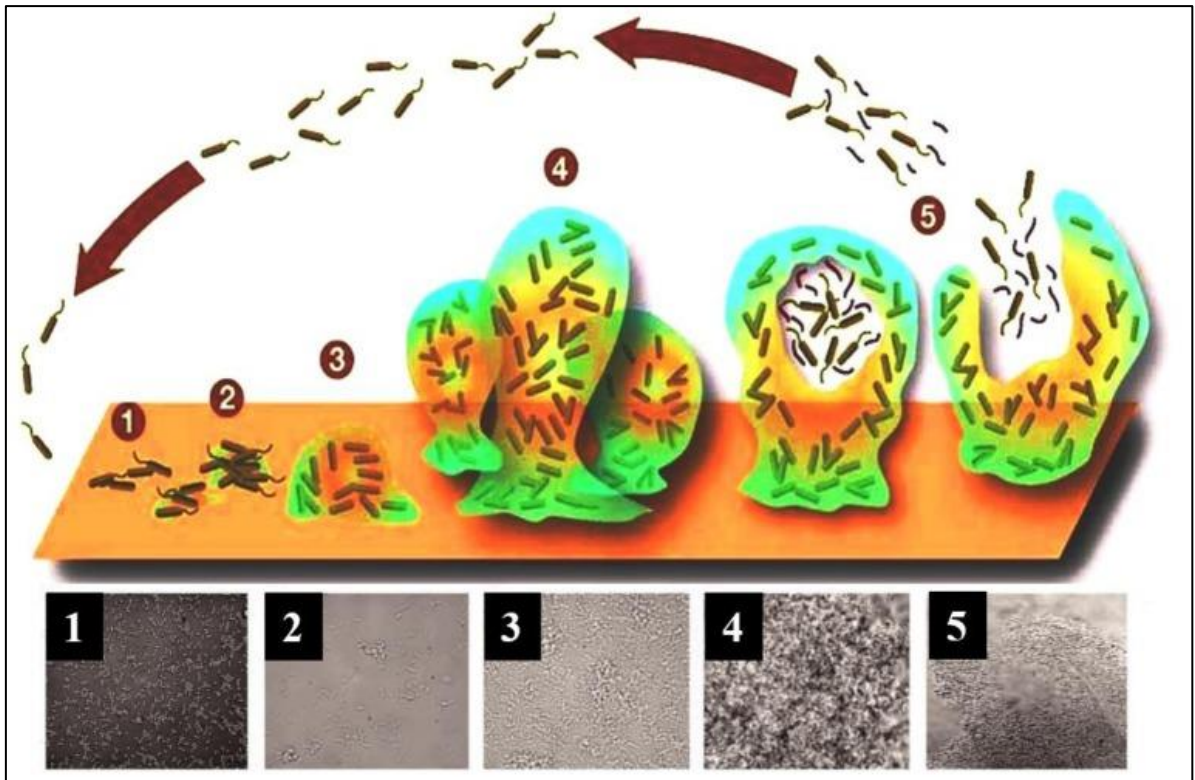
hidrofobisitesi ve yüzey yükü dahil olmak üzere yüzeyin fizikokimyasal özellikleri bakteri tutunmasını etkileyebilmektedir (5).

İkinci basamak olan geri dönüşümsüz tutunma, dipol-dipol ve hidrofobik etkileşimleri gibi kısa mesafeli etkileşimlerin ve bakteriyel yapısal adezyonların katılımıyla gerçekleştirilebilir (63). Bakterilerin yüzeyi, hücre yüzeyinden hücre dışı ortama uzatılan farklı yapışkanlara sahiptir. Şimdiye kadar, flagella, pili/fimbriya ve fimbriyal olmayan yapılar dahil olmak üzere bakterilerin yapışkan uçlarının, biyofilm oluşturan hücrelerin bir yüzeye bağlanmasında rol oynadığı tespit edilmiştir (64). Flagella, hücre-yüzey etkileşimlerini engelleyebilecek itici kuvvetlerin üstesinden gelerek hücrelerin yüzeylere yapışmasını başlatabilir (65). Fimbriya ise bakterilerin birbirlerine bağlanmasında ve erken hücre yüzeyi bağlanmasında rol alabilmektedir (66). Geri dönüşümsüz tutunma, biyofilmlerin yüzeye yapışmasına aracılık etmek için biyofilm oluşturan hücreler tarafından sentezlenen EPS üretimi ile ilerler (67). Ayrıca ikincil haberci c-di-GMP molekülleri, EPS ve hücre yüzey yapılarının üretimini regüle ederek bakterilerin planktonik yaşam formundan sesil yaşam formuna geçişi için en önemli sinyallardan biri olarak kabul edilmektedir (68).

Üçüncü ve dördüncü basamak olan mikrokoloniler oluşumu ve biyofilmlerin olgunlaşmasında, bakteriler, EPS matriksi içerisinde çoğalmaya devam eder ve mikrokolonilerin oluşumuna ve biyofilmlerin olgunlaşmasına yol açar (61). Mikrokoloni oluşumunu ve EPS birikimini takiben, dolaşım sistemleri görevi gören, besinleri hücre topluluklarına taşıyan ve atıkları uzaklaştıran su dolu kanalların oluşur (2). Mikrokolonilerin yapısal analizi genellikle piramit/mantar şeklinde çok hücreli bir yapı göstermektedir (2). Biyofilm olgunlaşmasının süreci esnasında, bakteriyel yüzey yapılarının üretimi inhibe edildiğinden mikrokoloniler içerisinde hareketlilik kısıtlanır. Sesil hücrelerin gen ekspresyon paterni planktonik formlarından önemli ölçüde farklılık göstermektedir (69).

Beşinci basamak olan biyofilm dağılımı (dispersiyon), biyofilm gelişiminin son sürecini temsil etmektedir. Dispersiyon esnasında, biyofilm yapısında bulunan bakteriler planktonik yaşam moduna dönerek yapısında boşluklar bulunan aşınmış bir biyofilm yapısını geride bırakırlar (70). Dağılma, çevresel sinyaller, sinyal iletim yolları ve efektörler tarafından düzenlenen kompleks bir süreçtir. Dispersiyon (dağılma), dış kuvvetlerden kaynaklanan pasif bir süreç olabileceği gibi yeni bölgelere yayılmak amacıyla genetik olarak programlanmış aktif bir süreç de olabilmektedir (13). İndüksiyon türüne göre iki tip dispersiyon vardır: i) Doğal olarak indüklenmiş dispersiyon ve ii) Çevresel olarak

indüklenmiş dispersiyon. Doğal olarak indüklenmiş dispersiyon, biyofilm yapısında bulunan bakteriler tarafından sentezlenen sinyal moleküllerine bağlı olarak veya biyofilm içindeki besin gradyanları sonucu meydana gelirken, çevresel olarak indüklenmiş dispersiyon, ortamda mevcut olan sinyal moleküllerine veya çevreleyen ortamın değişen koşullarına yanıt olarak meydana gelmektedir (70). Aktif dağılım sırasında, flagella sentezi ve EPS degradasyonu gibi hücre hareketliliğinden sorumlu olan genler up regüle edilirken, EPS matriksinin üretimi, tutunma ve fimbriya sentezi ile ilgili genler down regüle edilir. Ayrıca, hücre içi c-di-GMP seviyelerinin azalması biyofilm gelişimini engelleyeceği ve biyofilm dağılımını artıracığı için c-di-GMP sinyal yolları engellenir (71).



Şekil 2.2. *P. aeruginosa* biyofilm oluşum aşamalarını (72). (1) Geri dönüşümlü tutunma, (2) Geri dönüşümsüz tutunma, (3) Mikrokolonilerin oluşumu, (4) Biyofilm olgunlaşması, (5) Biyofilm dağılımı (dispersiyon)

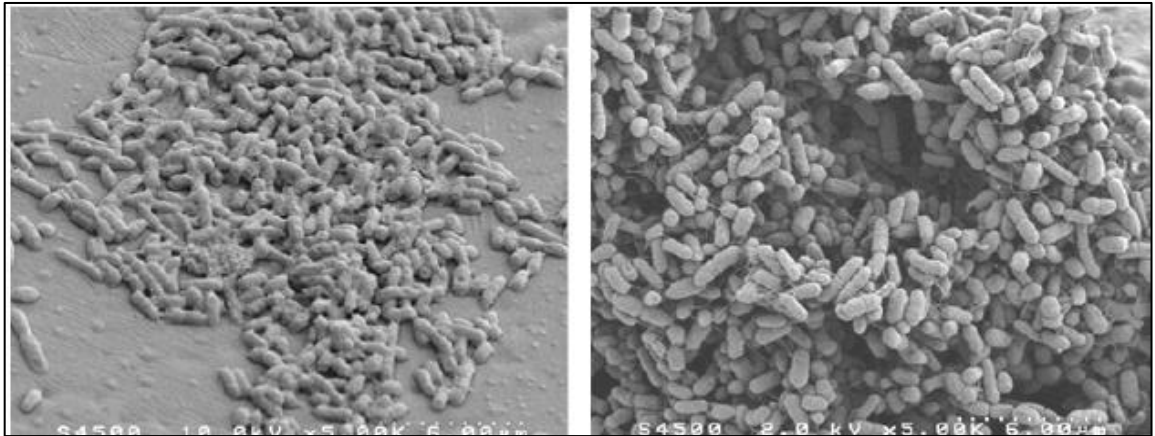
2.3. *SALMONELLA* BİYOFİMLERİ

Farklı *Salmonella* türlerinin arasındaki farklılıklara rağmen biyofilm oluşturma yeteneğinde ortak noktalar bulunmaktadır ve bu durum, biyofilm oluşumunun *Salmonella* serovarları arasında (özellikle birden fazla konakçıyı kolonize edebilen serovarlarda) oldukça korunmuş bir özellik olduğu ve evrimsel bir avantaj olarak hizmet ettiğine işaret eder. Biyofilm oluşturma yeteneği; sınırlı besin mevcudiyeti, ısı, asidik pH, düşük sıcaklıklar ve

antimikrobiyallere maruz kaldıklarında hayatta kalmalarını desteklediğinden, enfeksiyon döngüsü sırasında *Salmonella* virülansında, uzun süreli kalıcılıkta ve bulaşmasında önemli bir faktördür (Şekil 2.3.) (53).

Salmonella biyofilmlerine birçok biyotik (bitki yüzeyleri, epitel hücreleri ve safra taşları) ve abiyotik (plastik, cam, çimento, kauçuk ve paslanmaz çelik) yüzeylerde rastlanmaktadır (73). Laboratuvar koşullarında, *S. Typhimurium* biyofilmleri, koloni görünümünden dolayı rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfoloji olarak adlandırılan Kongo kırmızısı agar plakaları üzerinde belirgin desenli, agregatif koloniler olarak ortaya çıkar. Bu biyofilm formu, *S. Typhimurium*'da iki ana hücre dışı matriks bileşeni olan selüloz ve kıvrımlı fimbriyaların ifadesi ile karakterize edilmektedir (74). Rdar morfoloji, 28 °C'nin altında tuzsuz besiyeri (düşük ozmolarite) içeren agar plakalarında veya 37 °C'de demir içermeyen besiyerinde görünmektedir (73).

Diğer biyofilm oluşturan bakterilerde olduğu gibi, *Salmonella* biyofilm hücreleri, proteinler, polisakkaritler ve eDNA'dan oluşan bir EPS matriksi içerisinde bulunur. *Salmonella* biyofilm EPS'lerinin tam bileşimi hem serovar hem de çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Ancak temel olarak farklı tip yapışkan fimbriyalar olan tip 1 fimbriya, plazmid kodlu fimbriya (Pef), kıvrımlı fimbriya (Csg), uzun polar fimbriya (Lpf), geniş yüzey proteini BapA ve flagella gibi proteinli bileşiklerden oluşur. Selüloz, kolanik asit ve O-antijen kapsülü gibi ekzopolisakkaritler ve lipidleri de içerdiği bilinmektedir (75). Ek olarak, *S. Typhimurium* tarafından oluşturulan biyofilmlerde eDNA tespit edilmiştir. Fakat, çoğu bakteri türünün aksine, eDNA'nın varlığı, *S. Typhimurium*'de biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilemektedir (76).



Şekil 2.3. Taramalı elektron mikroskobu ile çekilen *Salmonella* biyofilmlerinin görüntüleri (77)

Salmonella hücrelerinin planktonik formlarından biyofilm yapısına geçişi, sıcaklık dalgalanmaları, besin mevcudiyetindeki değişiklikler ve zararlı maddelere maruz kalma gibi çeşitli çevresel tetikleyicilerden etkilenebilmektedir. Bu nedenle, biyofilm genlerinin ekspresyonu, çok sayıda global düzenleyici, iki bileşenli yanıt sistemi ve diğer düzenleyici proteinler ve küçük RNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Bu tezin konusu olan Csr sistemi ve QS sinyalizasyonuna vurgu yapılarak *Salmonella* biyofilminin en önemli düzenleyicilerine aşağıda değinilmiştir (78).

CsgD, *Salmonella*'daki ana biyofilm düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (79). CsgD, *csgBAC* curli (kıvrımlı fimbriya) biyosentez operonu içerisinde yer alan *csgB* promotoruna doğrudan bağlanarak ve ikincil haberci (3'-5')-siklik-diguanozin monofosfatın (c-di-GMP) modülasyonu yoluyla selüloz biyosentezini düzenleyen diguanilat siklaz AdrA'nın ifadesini indükleyerek iki ana EPS bileşenini olan kıvrımlı fimbriya ve selülozun üretimini indüklemektedir (78). CsgD ifadesi, besin seviyeleri, sıcaklık, oksijen gerilimi, ozmolarite ve membran bütünlüğü dahil olmak üzere çok sayıda çevresel sinyale yanıt olarak meydana gelir. CsgD'nin ifadesi; transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde kontrol edilmektedir. Biyofilm düzenleyici ağında birkaç sigma faktörü de yer almaktadır. *in vitro* transkripsiyon deneylerinde, *csgBA* promotorun ekspresyonu için CsgD'nin RpoD ($\sigma 70$) ve RpoS (σS) sigma faktörleri ile yüklü RNA polimeraz ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Buna karşılık, CsgD, *adrA* transkripsiyonunu yalnızca sigma faktörü RpoS ile yüklü RNA polimeraz ile etkileşime girerek aktive eder. Rdar morfoloji ayrıca küçük kodlamayan RNA'lar (sRNA) tarafından da düzenlenmektedir. ArcZ sRNA, *rpoS* translasyonunu pozitif olarak düzenler, hareketliliği inhibe eder ve dolaylı olarak *csgD* ekspresyonunun stimülasyonunu indükler. RpoS'ye bağlı sRNA SdsR, *csgD* ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonu yoluyla rdar morfoloji oluşumunun pozitif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Ancak RprA sRNA, *csgD* mRNA ile doğrudan etkileşim yoluyla rdar morfolojisini negatif olarak etkiler (78).

Çeşitli bakterilerde biyofilm ve planktonik yaşam modu arasındaki geçiş, sinyal molekülü (3-5)-siklik-diguanosin monofosfat (c-di-GMP) tarafından düzenlenir. c-di-GMP, katalitik olarak aktif GGDEF bölgelerini içeren diguanilat siklazlar (DGC'ler) tarafından sentezlenir ve EAL veya HD-GYP bölgelerini barındıran fosfodiesterazlar (PDE) tarafından degrade edilir. Bu ikincil habercinin yüksek hücre içi seviyeleri, biyofilm ile ilişkili fenotipleri teşvik ederken, düşük c-di-GMP konsantrasyonları dispersiyon ve hareketliliğe yol açmaktadır

(80). *S. Typhimurium*'da c-di-GMP'nin aşırı ekspresyonu, yüksek *csgD* ekspresyonu, *rdar* biyofilm oluşumu ve yüksek selüloz üretiminin yanı sıra motilite ve virülans özelliklerinin inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. *S. Typhimurium*'daki GGDEF ve/veya EAL bölgelerini barındıran bazı proteinler, *rdar* morfortipinin ve/veya selüloz ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (81).

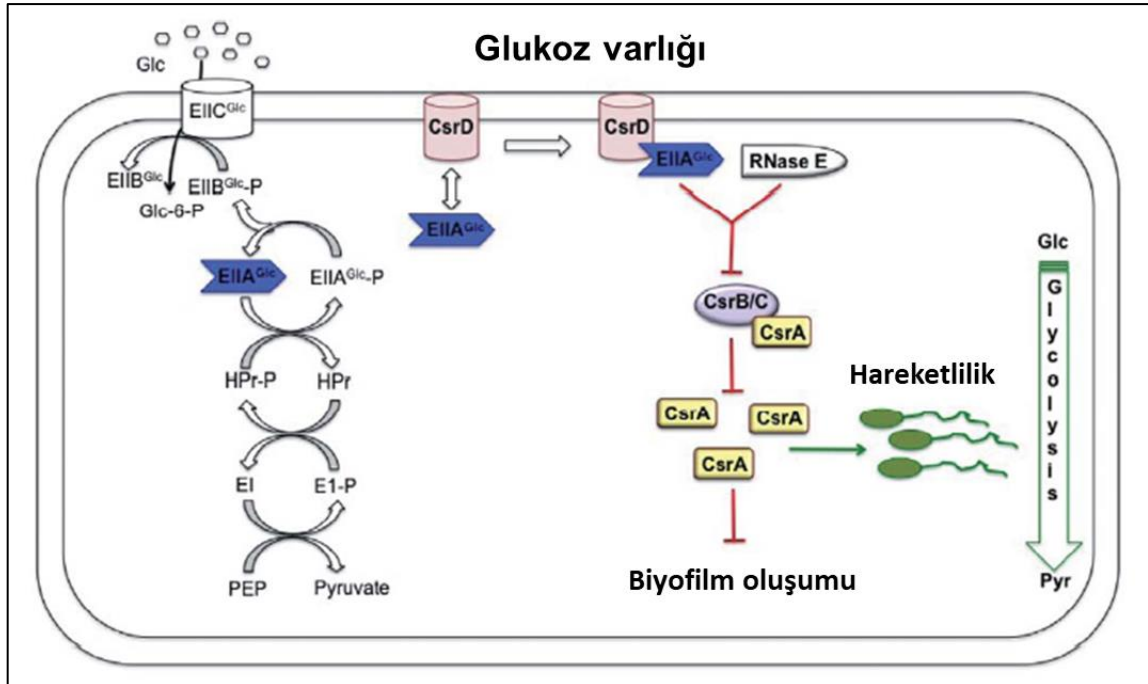
2.3.1. SALMONELLA BİYOFİLMİNİN Csr SİSTEMİ TARAFINDAN DÜZENLENMESİ

Karbon depolama düzenleyicisi CsrA, hedef mRNA'ları destabilize veya stabilize ederek gen ekspresyonunu baskılayan veya aktive eden homodimerik bir RNA bağlayıcı proteindir. CsrB ve CsrC adlı küçük RNA'lar ise, çok sayıda CsrA bağlanma bölgesi içerir ve bu proteine bağlanarak etkilerini antagonize ederler. Enzimatik aktivitesinden yoksun dejenere GGDEF-EAL bölgelerini içeren CsrD proteini ise, CsrB ve CsrC sRNA'ların RNaz E aracılığıyla parçalanmasını sağlar (82). CsrD proteini, CsrA tarafından negatif olarak düzenlenir, bu da, CsrA ifadesi için bir düzenleyici döngü oluşturmaktadır. BarA/SirA iki bileşenli sistem, *Salmonella* virülansı, hareketliliği ve biyofilm oluşumunda yer alan önemli bir global düzenleyici sistemdir. SirA, sensör kinaz BarA veya hücrel asetil fosfat tarafından fosforile edilen bir yanıt düzenleyicidir. SirA, *csrB* ve *csrC* sRNA'larını transkripsiyonel olarak aktive ettiği için Csr sistemi, BarA /SirA tarafından da kontrol edilmektedir (83). *Salmonella Typhimurium*'da CsrA, SPI-1'de bulunan virülans genleri, biyofilm oluşumu, motilite genlerini, B12 vitamini sentezini ve kullanımı ile ilişkili genleri ve konak bağırsağında bulunan bazı besinlerin metabolizması için gerekli olan genleri düzenler (84).

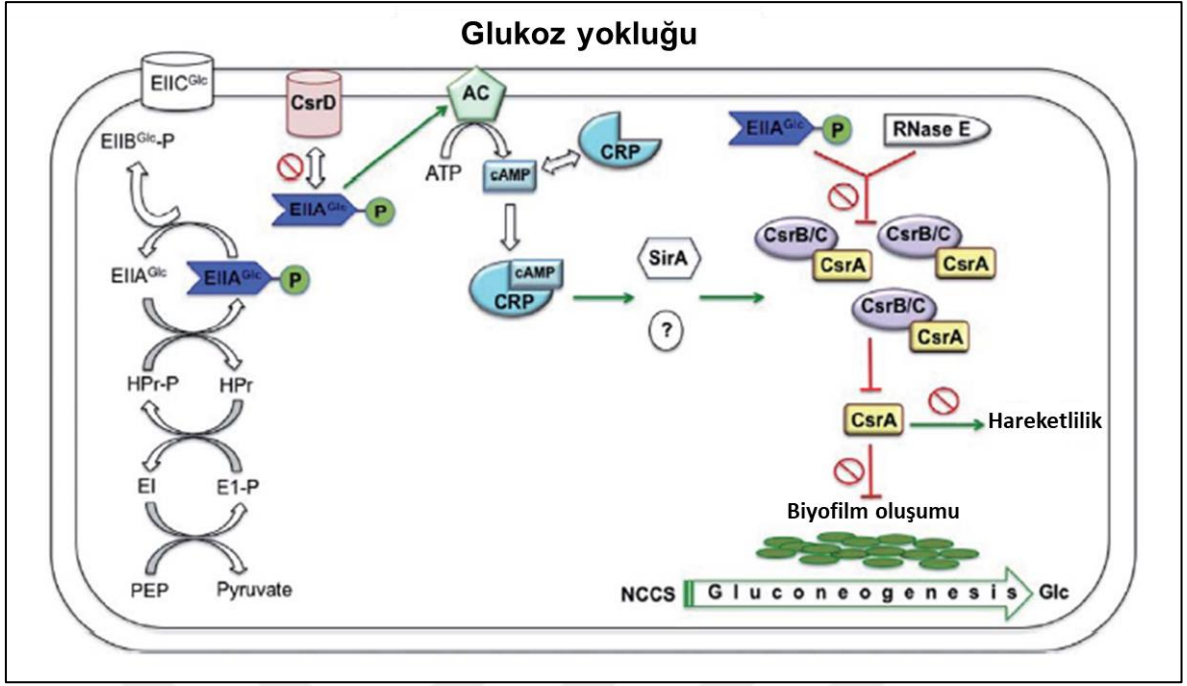
Gerçekleştirilen bir çalışmada, *csrA* geni bakımından mutant *E. coli* suşlarında biyofilm oluşumunun arttığı, söz konusu genin aşırı ekspresyonunun ise, hem *E. coli* hem de *S. Typhimurium* suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca *csrA* ifadesinin indüksiyonu, 24 saatlik biyofilm yapılarında dağılmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, *E. coli* olgun biyofilmlerine glukoz eklenmesinin, CsrA'nın biyofilm dağılımı üzerindeki düzenleyici etkisinin yok olmasına sebebiyet verdiği belirlenmiştir (14). CsrA'nın GGDEF/EAL bölgesini içeren proteinlerini kodlayan sekiz genin ekspresyonunu hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalarla kontrol ettiği bilinmektedir. Biyofilm oluşumunu kontrol etmek için Csr, flagellar ve c-di-GMP sistemi arasındaki ilişkiyi araştıran diğer çalışmalar, CsrA'nın flagella regülununun bir aktivatörü olduğunu göstermiştir. Sonuç

olarak, CsrA'nın sinyal yolağında birden fazla süreçte rol alarak *S. Typhimurium*'da hareket (motilite) yollarını aktive ettiği ve biyofilm oluşumunda rol alan faktörlerinin üretimini engellediği belirlenmiştir (15). Ek olarak, Solano vd. (2002), LB sıvı besiyerinde sıkı bir pelikül oluşumu için BarA'nın gerekli olduğunu belirlemiştir (85). Ancak beklenmeyen bir şekilde *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium*'un biyofilm üretiminde bir artış gözlenmemiştir. Bu nedenle karmaşık düzenleyici ağda ek bileşenlerin yer alabileceği öne sürülmüştür (86).

Leng vd. (2015) tarafından glukoz konsantrasyonunun CsrB/C sRNA'ların oluşumu ve degradasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Glukoz varlığının (Şekil 2.4.), membran taşıyıcılarına bağlanan ve alternatif karbon kaynaklarının alımını önleyen $EIIA^{Glc}$ 'nin defosforilasyonuna yol açtığı gözlenmiştir. Defosforile olan $EIIA^{Glc}$ daha sonra CsrD'nin EAL bölgesine bağlanır ve RNase E aracılığıyla CsrB/C'yi degrade ederek serbest CsrA seviyesini artırır. CsrA seviyesindeki artış hücrelerin hareketliliğinin artmasına neden olur. Ancak, glukoz yokluğunda (Şekil 2.5.), $EIIA^{Glc}$ fosforile kalır ve cAMP üretimi artar. CAMP, CRP'ye bağlanır ve alternatif karbon kaynaklarının kullanımı için gerekli enzimlerin ekspresyonunu destekler. cAMP-CRP kompleksi, SirA regülatörü yoluyla CsrA'nın sekestrasyonuna ve biyofilm ile ilişkili fenotiplerin ekspresyonuna yol açan CsrB/C'nin bozulmasını inhibe eder (16, 87).



Şekil 2.4. Glukoz varlığında CsrA regülasyonu (87)



Şekil 2.5. Glukoz yokluğunda CsrA regülasyonu (87)

2.3.2. *SALMONELLA* BİYOFİLMİNİN QS TARAFINDAN DÜZENLENMESİ

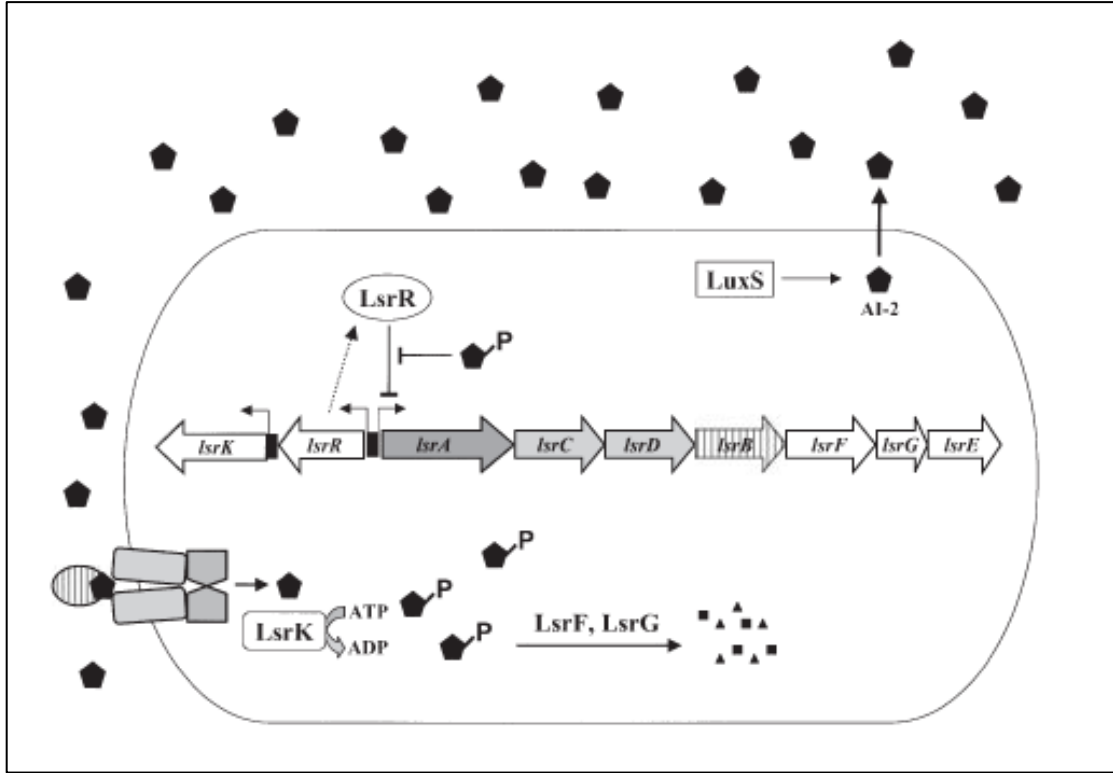
QS, otoindüktör olarak adlandırılan küçük sinyal moleküllerinin üretimi, tespiti ve yanıtlanması yoluyla meydana gelen popülasyon yoğunluğuna bağlı bir gen ifadesinin düzenlenmesi mekanizmasıdır. Virülans, hareket (motilite) ve biyofilm oluşumu gibi birçok bakteriyel süreç QS mekanizması tarafından düzenlenir (17).

Bakterilerdeki QS sistemleri üç sınıfa ayrılmıştır: (i) Sinyal molekülleri olarak açıl-homoserin laktonları (AHL) kullanan Gram-negatif bakterilerde LuxI/LuxR-tipi QS sistemi; (ii) Sinyal molekülleri olarak küçük peptitler kullanan Gram pozitif bakterilerde oligopeptit-iki bileşenli tip QS; ve (iii) Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde *luxS* tarafından kodlanan AI-2. Her tip sinyal molekülü, hassas bir algılama aparatı ve kompleks bir düzenleyici ağ tarafından algılanmakta ve yanıtlanmaktadır (88). Çoğu bakteri türlerinde, biyofilm oluşumunun kısmen QS ile düzenlendiği bildirilmiştir. *Salmonella*'da, iki ana tip QS sistemi tanımlanmıştır: AHL ve AI-2 (73).

İlk olarak, *Salmonella*, diğer bakteri türleri tarafından üretilen AHL'lere yanıt veren SdiA adlı LuxR ailesinin bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Fakat, *E. coli* biyofilm oluşumunda SdiA'nın rolü aydınlatılmış olsa da, SdiA ve *Salmonella* biyofilmleri arasında doğrudan bir bağlantı rapor edilmemiştir (73).

İkinci olarak, birçok araştırma grubu tarafından polistiren üzerinde *Salmonella* biyofilm oluşumunun *luxS* geninin mutasyonundan etkilendiği bildirmiştir. Mikrodizin analizinde, *luxS* delesyonunun, birçok hareketlilik geninin ve biyofilm ile ilgili genlerin down regülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Bu genlerin bazılarının ekspresyon seviyelerinin doğal tip *S. Typhimurium*'un hücresiz süpernatantının eklenmesiyle kısmen kompanse edildiği gözlenmiştir. Bu da AI-2'nin, bu genlerin düzenlenmesinde rol oynayabildiğini göstermektedir (22).

Salmonella Typhimurium'da AI-2, *luxS* geni tarafından kodlanan LuxS sentaz tarafından üretilip eksponansiyel üreme fazında salınır ve ardından ATP bağlayıcı kaset (ABC) olan Lsr taşıyıcı aracılığıyla bakterilere aktarılır. *Lsr* operonu, *lsrACDBFGE* olmak üzere yedi gen içerir. *lsrACDB*, AI-2 taşıyıcısının bileşenlerini kodlar. *lsrR*, farklı promotordan transkribe edilen *lsr* transkripsiyonunun bir baskılayıcısıdır. *lsrK* geni, Lsr taşıyıcısı yoluyla içe aktarıldıktan sonra AI-2'yi fosforile eden bir sitoplazmik kinazı kodlar. Fosfo-AI-2, LsrR baskılayıcıyı inaktive ederek *lsr* transkripsiyonunu indükler. *lsrF* ve *lsrG*, sitoplazmik fosfo-AI-2'nin işlenmesinde yer alan enzimleri kodlar (Şekil 2.6.) (21). *luxS*/AI-2 sistemi, *Salmonella Typhimurium*'da hareketlilik, biyofilm oluşumu, virülans, translasyon, transkripsiyon ve diğer temel hücresel işlevlerle ilgili genlerin ifadesini etkilemektedir (22). *luxS* ifadesinden bağımsız olarak, ekstraselüler AI-2 seviyesi, *E. coli*'de ortamdaki glukoz bolluğundan etkilenir (23). Benzer şekilde, *S. Typhimurium*'da glukoz varlığında, hücre dışı AI-2 seviyesi artmış ve glukoz yokluğunda azalmıştır. Dahası, glukoz varlığı, *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (22). *E. coli*'de bulunan cAMP, *lsr* transkripsiyonunu aktive ederek hücre dışı AI-2 seviyesinin azalmasına neden olur. Glukoz yokluğunda cAMP seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (89).



Şekil 2.6. AI-2'nin sentezi ve Lsr proteinleri tarafından taşınması ve modifikasyonunu. AI-2 (beşgen olarak gösterilmiştir) LuxS tarafından sentezlenir ve hücre dışı ortama salınır. Lsr taşıyıcısının bazal ekspresyonu, AI-2'nin sitoplazmaya girmesine ve ardından LsrK tarafından fosforile edilmesine neden olur. Fosfo-AI-2, LsrR proteinini inaktive ederek lsr operonunun transkripsiyonunu indükler. AI-2'nin hücre içine daha fazla alınmasıyla Lsr taşıyıcısının üretimi gerçekleşmiş olur. AI-2 molekülleri LsrF ve LsrG proteinleri tarafından işlenmektedir (21)

Gram negatif ve/veya Gram pozitif bakteriler arasında "evrensel dil" olarak kullanılan AI-2 (18) de biyofilm dağılımında rol alabilmektedir. AI-2'nin, *Helicobacter pylori* (19) ve *Vibrio vulnificus* (20) bakterilerinde biyofilm yapısının dispersiyonunu teşvik ettiği bilinmektedir.

2.4. BİYOFİLM YAPILARININ KONTROLÜ

Biyofilmler iki yol izlenerek kontrol edilebilir: i) Geri dönüşümsüz bağlanmanın oluşmasını engelleyerek biyofilm oluşumunun engellenmesi ve ii) Olgun biyofilmlerin eradikasyonu (12).

Bakterilerin biyofilm oluşturan yüzeylere ilk tutunmasını engellemek ve böylece biyofilm geliştirme şansını azaltmak, yüzeyin kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirerek sağlanabilir. Biyofilm oluşumunu önlemek amacıyla biyomedikal cihazların yüzeyini değiştirmek için yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemler arasında antibiyotikler, biyositler ve iyon kaplamaları bulunmaktadır (90). Minosiklin ve rifampin antibiyotikleriyle

kaplı cihazların klinik ortamlarında *Staphylococcus aureus* biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarının insidansını azalttığı gösterilmiştir (91). Biyofilm oluşumunda önemli olan iyonların görevlerine müdahale eden şelatörler de biyofilm inhibitörleri olarak kabul edilmektedir (92). Gümüş iyon kaplı implantların konak dokularda gümüş birikimine sebep olmadan *S. aureus* biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (93, 94). Ayrıca, çeşitli destekliyi bileşikleri ve antimikrobiyal ajanları kullanılarak yük ve hidrofobiklik gibi yüzey fiziksel özelliklerinin modifikasyonunun, biyofilm önlemede etkili olduğu kanıtlanmıştır (95). Hidrofilik özellikleri nedeniyle yüzeylere bakteri yapışmasını azaltan çeşitli hidrojel kaplamalar özellikle tıbbi cihazlarda biyofilm oluşumunu önlemek için kullanılmak üzere tasarlanmıştır (96).

Mevcut biyofilmlerin eradikasyonu için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Nekrotik dokuyu veya dental biyofilmleri çıkarmak için cerrahi alan enfeksiyonlarının debridmanını ve yüksek hızlı sprey kullanımı dahil olmak üzere çeşitli mekanik eradikasyon yaklaşımları uygulanmaktadır (12). Bakterileri öldürmek ve ilişkili biyofilm yapıları ortadan kaldırmak amacıyla elektriksel olarak iletken bir hedef yüzeye bir akım uygulanmasını içeren elektrokimyasal yöntemler, yakın zamanda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (97). Bununla birlikte, biyofilmler planktonik bakterilere göre antimikrobiyallere 10-1000 kat daha dirençli olduğundan, biyofilmle ilişkili enfeksiyonların geleneksel antibiyotiklerin kullanımı ile yok edilmesi oldukça zordur. Enfekte tıbbi cihazlar çıkarılamadığında, antibiyotik kilit tedavisi gibi agresif antimikrobiyal stratejiler uygulanmaktadır (98). Bu durum göz önüne alındığında, biyofilm eradikasyonu hem daha yüksek antimikrobiyal konsantrasyonlar hem de daha yüksek maliyetler gerektirir. Bu nedenle biyofilm hücrelerini koruyucu EPS'lerinden ayırmaya yönelik yaklaşımların araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Biyofilm gelişiminin son aşaması olan dağılım sırasında, biyofilmde bulunan bakteriler planktonik durumlarına dönerek biyofilm hücrelerine kıyasla daha savunmasız hale gelir. Bu nedenle biyofilm dağıtıcı ajanlarına dayalı etkin biyofilm eradikasyon stratejileri oluşturmak amacıyla son yıllarda yoğun bir şekilde dispersiyon ajanları ve mekanizmaları araştırılmaktadır (13).

2.4.1. BİYOFİLM KONTROL STRATEJİSİ OLARAK BİYOFİLM DİSPERSYONU

Daha önce belirtildiği gibi, biyofilm hücrelerinin dağılmasına ve savunmasız planktonik durumlarına geri dönmesine neden olmak, antibiyotik uygulamasının başarısını arttırabilir ve mevcut biyofilmlerin etkili bir şekilde eradikasyonu ile sonuçlanabilir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, EPS matriksi, QS sistemi ve persister (inatçı) hücreler gibi biyofilmin en önemli kısımları ve süreçleri hedeflenerek biyofilm yapılarının dağıtılabileceği gösterilmiştir (99).

EPS matriksi biyofilm hücrelerini; UV ışığı, dehidrasyon, toksinler ve yüksek antibiyotik konsantrasyonları dahil olmak üzere birçok stresten koruduğu için bu hücrelerin "kalkanı" olarak kabul edilmektedir. EPS matriksi, biyofilm yapılarının konakçıda daha kalıcı olmasına ve tedaviye daha dirençli olmasına neden olmaktadır (2). Bu nedenle biyofilm hücrelerinin "kalkanından" ayrılması biyofilm stabilitesinin bozulmasına ve hücrelerin salınmasına neden olur. EPS genellikle polisakkaritler, proteinler, lipidler ve eDNA'dan oluşur (100). EPS yapısı, üretiminin engellenmesi ve/veya hücre dışı enzimler kullanarak EPS bileşenlerinin parçalanması yoluyla hedeflenebilmektedir (12). Biyofilm tutunması ve stabilitesi için önemli olan EPS proteinleri, Tripsin (101), Proteinaz K (102) ve LapG Proteinaz (103) gibi proteazlar tarafından hedeflenebilir. Ayrıca biyofilm yapısının korunmasında ve çeşitli streslere karşı direnç için hayati öneme sahip olan EPS ekzopolisakkaritleri (40) Dispersin B gibi glikozit hidrolazlar kullanılarak parçalanabilir (104). Son olarak, DNase I gibi deoksiribonükleazların kullanılması, biyofilm yapısının stabilize edilmesine ve yatay gen transferi yoluyla biyofilm hücrelerinin genetik çeşitliliğini artırmasına katkıda bulunan eDNA'nın degradasyonuna yol açmaktadır (105). Bununla birlikte, EPS'nin biyokimyasal bileşiminin farklı mikrobiyal türler arasında önemli ölçüde değişebileceğini ve hedefleme stratejilerinin her bir türe ayrı ayrı uyarlanması gerektiğini göz önünde bulundurmak gerekir (100).

Daha önce bahsedildiği üzere QS, otoindüktör olarak adlandırılan küçük sinyal moleküllerinin üretimi, tespiti ve bunlara yanıt verilmesi yoluyla meydana gelen, popülasyon yoğunluğuna bağlı gen ekspresyonunun düzenlenmesi mekanizmasıdır. Virülans, motilite ve biyofilm oluşumu gibi birçok bakteriyel süreç QS sistemi tarafından düzenlendiğinden, QS sisteminin hedeflenmesi ve hücreden hücreye iletişimin kesilmesi biyofilm dağılmasına ve virülansın azalmasına neden olabilmektedir (17). QS sistemi,

otoindüktörlerin üretimini engelleyerek, yapısını değiştirerek veya parçalayarak hedeflenebilir (106). QS sinyal moleküllerini parçalayabilen enzimler, üç tip AHL laktonaz, asetil homoserin lakton (AHL) asilaz ve oksidoredüktazdır. Ek olarak, çeşitli araştırmalar sonucunda uçucu yağlar ve bitki özleri gibi birçok QS inhibitörü (QSI) tanımlanmıştır (107). Bu moleküllerin bir örneği, *Pseudomonas aeruginosa*'da hem QS'ye bağlı virülans faktörlerinin üretimini hem de biyofilm oluşumunu engellediği kanıtlanmış olan sinnamik asittir (108). Başka bir örnek ise, *Chromobacterium violaceum* 12472 ve *S. aureus* suşlarındaki hem AI moleküllerin hem de AHL'lerin aktivitesine karşı geniş spektrumlu bir anti-QS aktivitesi sergileyen hidrolize edilebilir tanenler bakımından zengin Hint şifalı bitki özleridir (109). Ek olarak, sarımsağın da QS sisteminde bloke edici özelliklere sahip olduğu araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır (110).

Uyuyan (dormant) hücreler veya persister olarak da adlandırılan hücreler, herhangi bir antibiyotik direnç geni taşımadıkları halde antibiyotiklerden etkilenmeyen hücrelerdir. Bu direncin sebebi, persistent hücrelerin metabolik olarak inaktif olmaları ve antibiyotiklerin protein sentezi, hücre duvar sentezi gibi hücresel aktiviteleri hedeflemesidir. Bu tip hücreler, biyofilm aktif dağılım indüksiyonunu ve antibiyotik tedavilerini engelledikleri için önemli bir zorluğu temsil etmektedir (111). Son zamanlarda, antibiyofilm peptitlerinin, metabolik aktivitelerinden bağımsız olarak biyofilm içerisindeki persistent hücreleri etkili bir şekilde hedeflediği gösterilmiştir. Bu antibiyofilm peptitlerinin önemli bir örneği, düşük konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* biyofilm miktarını azaltan insan peptiti olan LL-37'dir (112).

Ayrıca, biyofilm aktif dağılma tepkisinin başlatılması, dağılma molekülleri ile gerçekleştirilebilir. Bu moleküller dağılma sinyallerine, anti-matriks moleküllerine, sekestrasyon moleküllerine ve metabolik interferans moleküllerine ayrılmakta ve biyofilmden planktonik hücreleri çevreye aktif olarak salmak için dağılma tepkisini tetikleyebilmektedir (99). İkincil haberci nükleotid c-di-GMP gibi birçok dağılma sinyalinin bakteriyel biyofilm dağılımına yol açtığı gösterilmiştir. Bu molekülü parçalayan enzimler olan fosfodiesterazlar tarafından modüle edilen düşük c-di-GMP seviyeleri, bakteriyel biyofilmlerin dağılmasına neden olur. Bu nedenle, c-di-GMP sentezinin diguanil siklazlar tarafından bloke edilmesi veya fosfodiesterazlar tarafından degradasyonunun teşvik edilmesi, umut verici bir dağılma indüksiyon yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (113). Diğer bir dağılma sinyali, birçok bakteri türünde biyofilm hücrelerinin salınımını tetikleyen

Nitrik Oksit (NO) ve donörleridir (114). Cis-2-dekenoik asit (CDA) ise bir dispersiyon sinyalidir (115). EPS'yi hedefleyen anti-matriks molekülleri; biyosüpfaktanları, ramnolipidleri ve fenolde çözünen modölinleri (PSM'ler) içermektedir (99). EDTA gibi sekestrasyon molekülleri ise, biyofilm gelişimi için gerekli bileşenleri (iyonlar, besinler, metabolitler vb.) bağlayan ve biyofilm yapısının stabilitesini bozarak dağılmaya yol açan moleküllerdir (116). Son olarak, L-arginin, D-arginin ve L-metionin gibi ekzojen amino asitler gibi metabolik interferans moleküllerinin, çeşitli bakteri türlerinde dispersiyon tepkilerini tetiklediği bulunmuştur (99).

Bununla birlikte, dağılmış hücrelerin antibiyotiklere karşı daha duyarlı olmasına rağmen, daha hareketli ve virulent olabilecekleri gösterilmiştir. Bu nedenle diğer alanlara kolonize olma riski veya dağılma sürecinden sonra septisemi riski artmaktadır. Dağılan hücrelerin ve kalan biyoölmelerin etkin bir şekilde ortadan kaldırılması için biyofilm dispersiyon stratejilerinin antibiyotiklerle birleştirilmesi gerekmektedir (117).

2.4.2. SALMONELLA BİYOFİLM DİSPERSİYONUNDA KULLANILAN STRATEJİLER

Bu bölüm, *S. enterica*'nın oluşturduğu biyoölmeleri üzerinde test edilen bazı dispersiyon yaklaşımları hakkında bilgileri özetlemektedir.

Çeşitli araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, bakterilerde nitrik oksit aracılı sinyalleşmenin biyoölmün dağılmasına neden olabileceği belirlenmiştir. Nitrik oksit donörleri, farklı optimal dağılım koşulları altında *S. Typhimurium* biyoölmelerinin dağılmasını indüklemiştir (118, 119). Bu ajanlar, *S. Typhimurium* biyoölmelerinin etkin bir şekilde dağılması için hidrojellerle birlikte kullanılabileceği gibi (120) dezenfektanlarla birlikte de kullanılarak etkinliği artırılabilir (121). Biyofilm dispersiyonu, bir alarmon olan (p)ppGpp'nin bloke edilmesiyle de indüklenebilir. De La Fuente-Nunez vd. (2014), (p)ppGpp sinyalini bloke edebilen ve sonuçta *S. Typhimurium*'un da içinde bulunduğu birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriyel patojenlerin biyofilm dağılımına yol açan yeni bir anti-biyofilm peptid tanımlamışlardır (122). Çeşitli araştırmacılar, dispersiyon verimliliğini artırmak için birden fazla dispersiyon indükleyici ajanın birlikte kullanımı sonucunda gerçekleşen dispersiyon oranını araştırmıştır. Örneğin; doymamış yağ asidi cis-2-dekenoik asit (CDA), *S. enterica* dahil olmak üzere gıda kaynaklı pek çok bakterinin oluşturduğu olgun biyofilm yapısının dağılmasında etkilidir. CDA'nın,

dezenfektanlar ve antibiyotiklerle birlikte kullanılarak dispersiyon etkinliğindeki değişiminin araştırıldığı bir çalışma sonucu, 310 nM CDA'nın dezenfektanlar (Persidin ve Epimax S) veya antibiyotikler (siprofloksasin, vankomisin ve ampisilin) ile birlikte kullanımının biyofilm biyokütlesini yaklaşık % 80 oranında azalttığı gösterilmiştir (123). Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, P22 fajı, EDTA ve nisinin üçlü kombinasyonunun *S. Typhimurium* olgun biyofilm dağılımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 10^7 PFU mL⁻¹ P22 fajı, 20 mM EDTA ve 150 µg mL⁻¹ nisin kombinasyonunun, olgun biyofilm yapısını % 70 oranında azalttığı belirlenmiştir (124). Ek olarak, antibakteriyel aktiviteye sahip diğer suşların ekzopolisakkarit yapıları da biyofilm dağılımını indüklemek için kullanılmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise, yeni izole edilmiş *Lactobacillus casei* NA-2 suşunun ekzopolisakkarit yapısı, *S. Typhimurium* biyofilmini % $40,8 \pm 3,3$ oranında azaltmada başarılı olmuştur (125).

DNaz'ların çeşitli bakteri türlerinde biyofilm dispersiyonuna neden olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen Wang et al. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, DNaz I'in, *S. Typhimurium* ve *S. Typhi*'nin polistiren ve cam yüzeylerde oluşturduğu olgun biyofilmler üzerinde, DNaz I'in eklenmediği biyofilmlere kıyasla, önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (76).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Gıda kaynaklı salgınların en yaygın sebebi olarak bilinen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, biyofilm yapısı oluşturarak hem tedavisi daha zor olan gastroenterit enfeksiyonlarına neden olmakta hem de gıda üretim hatlarında kolonize olarak ciddi salgınlara ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (9, 10). Bu patojen ile mücadelede farklı stratejiler ve yöntemler kullanılmaktadır. *S. Typhimurium* halk sağlığına ve ekonomiye ciddi bir tehdit olduğu için araştırmacılar yeni stratejileri ve anti-biyofilm ajanlarını geliştirmek amacıyla yoğun bir şekilde çalışmaktadırlar. Biyofilm oluşumunda son aşama olarak bilinen dispersiyon (dağılma) aşamasının sonunda biyofilm yapısından dağılan hücrelerin antibiyotiklere ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir (70). Bu nedenle, son yıllarda biyofilm yapısının kontrolü için dispersiyon ajanları ve mekanizmaları yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (118-120, 123-125).

S. Typhimurium'da biyofilm dispersiyonunu indüklediği bilinen karbon depolama düzenleyici CsrA proteininin, c-di-GMP sinyal molekülünün degradasyonuna neden olarak motilite yolaklarını aktive ettiği ve biyofilm oluşumunda rol alan faktörlerin üretimini engellediği bilinmektedir (15). Aynı zamanda, glukoz varlığında CsrA seviyesinin arttığı yapılan araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (16). Öte yandan, Quorum Sensing (QS) sinyal molekülü olan otoindüktör-2 (AI-2)'nin çeşitli bakteri cinslerinde biyofilm dağılımında rol aldığı bilinmektedir. AI-2'nin hücre dışı seviyesi ve aktivitesi glukoz seviyesinden etkilenmektedir (22, 23). CsrA ve AI-2'nin ortak yolları ve hücre içi süreçleri düzenlediği ve her ikisinin de karbon kaynağı seviyesinden etkilendikleri gerçeği, aralarında bir etkileşim olduğu fikrine yol açmaktadır. Yaptığımız literatür araştırması sonucunda, *S. Typhimurium*'da CsrA proteininin AI-2 sentezine ve bu molekülün hücre içine alımına etkisinin araştırıldığı bir çalışmanın literatürde yer almadığı belirlenmiştir. Önerilen bu tez çalışması, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium patojeninin biyofilm dispersiyonunu düzenleyen yolları aydınlatmayı amaçlamaktadır. *S. Typhimurium* biyofilm yapısının dispersiyonunda düzenleyici rol oynadığı bilinen CsrA proteininin, QS sinyal molekülü olan AI-2 sentezine etkisinin ve hücre içine alımında regülatör etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasının hedefleri şu şekildedir:

- Lambda red rekombinaz sistemi ile *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşunun oluşturulması,

- *csrA* geninin arabinoz ile indüklenebilen promotora sahip pBAD24 vektörüne klonlanması ve transformasyonu,
- *S. Typhimurium* biyofilm oluşumunda inhibitör rol oynayan CsrA proteininin aktivitesini teşvik ettiği bilinen glukoz molekülünün biyofilm dispersiyonu için optimum konsantrasyonunun belirlenmesi ve belirlenen optimum dispersiyon konsantrasyonunda CsrA'nın düzenleyici rolünün araştırılması,
- Hem CsrA regülasyonuna hem de biyofilm dispersiyonu için optimum glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak AI-2 sentezinden sorumlu olan *luxS* geni ve AI-2 hücre içine alımında rol alan *lsrA*, *lsrK*, ve *lsrR* genlerinin ekspresyon seviyelerinin qRT-PZR denemeleri ile belirlenmesi,
- CsrA regülasyonuna bağlı olarak *Vibrio harveyi* BB170 suşu kullanılarak *Salmonella* suşlarının AI-2 aktivitelerinin araştırılması.

Özetle bu tez çalışmasında; literatürdeki konu ile ilgili eksikliğin tamamlanması ile *Salmonella* biyofilm yapısının yayılmasına neden olan dispersiyon basamağının genetik regülasyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, QS sistemi ile ilgili aydınlatıcı fikirler vererek QS sisteminin inhibisyonu ve dolayısıyla biyofilm yapısının ortadan kaldırılması için yeni yöntemlerin ve yeni anti-biyofilm ajanların geliştirilmesinde hedeflerin belirlenmesine katkı sunacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. BAKTERİLER, PLAZMİDLER ve GELİŞME KOŞULLARI

Bu çalışmada, Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın kültür koleksiyonunda mevcut olan doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu kullanıldı. *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* suşu ve pBAD24 vektörüne klonlanmış *csrA* genini içeren vektörü taşıyan *S. Typhimurium* 14028 (*S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA*/pBAD24+*csrA*) suşu bu çalışmada oluşturuldu ve MN1830 kodu kullanılarak adlandırıldı. Tez çalışmasında kullanılan plazmidler, kültür koleksiyonumuzda bulunan suşlardan (pKD46 plazmidini içeren *E. coli* MZ1000 suşu, pKD3 plazmidini içeren *E. coli* MZ0997 suşu ve pBAD24 plazmidini içeren *S. Typhimurium* MZ1629 suşu) izole edildi. *Salmonella* suşlarının AI-2 aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan *Vibrio harveyi* BB170 suşu ATCC (American Type Culture Collection) kültür koleksiyonundan temin edildi.

Salmonella ve *E. coli* suşları, Luria-Bertani Broth (LB) ortamında 37 °C'de geceboyu çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* suşunun gelişme ortamına kloramfenikol (25 µg/mL), *S. Typhimurium* MN1830 suşunun gelişme ortamına ise kloramfenikol (25 µg/mL) ve ampisilin (100 µg/mL) antibiyotikleri ilave edildi. *csrA* genin ifadesinin indüklemek için MN1830 suşunun gelişme ortamına % 0,1 oranında L-arabinoz eklendi. *Vibrio harveyi* BB170 suşu, otoindüktör biyoanaliz besiyeri (AB Broth) ortamında 30 °C'de geceboyu çalkalamalı inkübatörde (175 rpm/dakika) geliştirildi. Bakteri stok kültürleri, % 60 steril gliserol içeren Luria-Bertani Broth (LB) ortamında -80 °C'de saklandı.

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan suşlar ve kodları

Suş Adı	Suş kodu
<i>S. Typhimurium</i> 14028	14028
<i>S. Typhimurium</i> 14028 Δ <i>csrA</i>	Δ <i>csrA</i>
<i>S. Typhimurium</i> 14028 Δ <i>csrA</i> /pBAD24+ <i>csrA</i>	MN1830
<i>Vibrio harveyi</i> BB170 ATCC	BB170

Çizelge 4.2. Tez çalışmasında kullanılan plazmidler

Plazmid	İzole Edildiği Suş	Özellik	Direnç
pBAD	<i>S. Typhimurium</i> MZ1629	L-arabinoz ile indüklenebilir promotora sahip	Amp ^R
PKD46	<i>E. coli</i> MZ1000	Red-ifade vektörü	Amp ^R
pKD3	<i>E. coli</i> MZ0997	Kloramfenikol direnç kasetin kalıp plazmidi	Amp ^R , Chl ^R

4.1.2. BESİYERLERİ ve ÇÖZELTİLER

Çizelge 4.3. LB Broth ve Agar (Merck, Almanya)

İçerik	Miktar (g/L)
Trypton (Fluka, Fransa)	10 g
Maya ekstraktı (Merck, Almanya)	5 g
NaCl (Sigma, ABD)	10 g
Agar (Merck, Almanya)	15 g

Çizelge 4.3.'deki besiyeri içerikleri 800 mL distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve cam tüplere 5'er mL olacak şekilde dağıtıldı. Katı besiyerinin hazırlanması için agar eklendikten sonra 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edildi. Katı besiyerleri yaklaşık 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 100 mm petri plaklarına 15 mL dağıtılıp, sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

Çizelge 4.4. NaCl içermeyen LB Broth

İçerik	Miktar (g/L)
Trypton (Fluka, Fransa)	10 g
Maya Ekstratı (Merck, Almanya)	5 g

Çizelge 4.4.'deki besiyer içerikleri distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve pH'sı 7,0 ± 0,2'ye ayarlanan sıvı besiyeri cam tüplere 5'er mL dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edildi.

Çizelge 4.5. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)

İçerik	Miktar (g/L)
NaCl (Merck, Almanya)	17,5 g
MgSO ₄ (BioShop, Kanada)	12,3 g
Casamino asit (BD, ABD)	2 g

Çizelge 4.6. Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)

İçerik	Hacim
KH ₂ PO ₄ (pH 7.0) (BioShop, Kanada)	10 mL
0,1 M L-Arjinin (Merck, Almanya)	10 mL
Gliserol (Sigma, ABD)	10 mL

Çizelge 4.5.'deki besiyeri içerikleri 970 mL distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacim 3N NaOH ile pH'sı $7,5 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika boyunca sterilize edildi. Soğuyan besiyerine Çizelge 4.6.'deki içerikleri ilave ederek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Çizelge 4.7. Stok Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu (5X)

İçerik	Miktar
Trizma (Sigma, ABD)	54 g
Borik asit (Sigma, ABD)	27,5 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0) (Sigma, ABD)	20 mL

Çizelge 4.7.'deki içerikler distile su ile içerisinde çözündürülerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Çizelge 4.8. Fosfatla Tamponlanmış Tuz (PBS)

İçerik	Miktar (g/L)
NaCl (Sigma, ABD)	8 g
KCl (Merck, Almanya)	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck, ALmanya)	1,44 g
KH ₂ PO ₄ (BioShop, Kanada)	0,24 g

Çizelge 4.8.'deki içerikler 800 mL distile su içerisinde homojen hale geldikten sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlanıp, otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edildi.

Çizelge 4.9. Glukoz Çözeltisi (% 10)

İçerik	Miktar
Glukoz (Sigma, ABD)	5 g

Çizelge 4.9.'deki içerik 100 mL distile su içerisinde homojen hale geldikten sonra, 0,22 µm por çaplı filtre kullanılarak sterilize edildi.

Çizelge 4.10. Serum Fizyolojik

İçerik	Miktar (g/L)
NaCl (Sigma, ABD)	9 g

Çizelge 4.10.'deki içerik 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dk boyunca sterilize edildi.

4.1.3. PRİMERLER

Çizelge 4.11. Kloramfenikol direnç gen kaseti taşıyan *csrA* mutantlarının elde edilmesinde kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün büyüklüğü (bp)
Chl ^R Kaseti	F: GGATACAGAGAGACCCGACTCTTTTAATCTTTCAAGGAG CAAAGAGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGC	1104
	R: GAGAAGAGAGGCTGCGTCTCACCCGAAAAGTGAGACGCG AAAACCCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTA	

Altı çizili diziler *csrA* geni yukarı ve aşağı akış bölgeleriyle (upstream-downstream) homoloji gösteren dizilerdir.

Çizelge 4.12. *csrA* mutasyonunun doğrulanmasında kullanılan primer çifti

Gen Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün büyüklüğü (bç)
<i>csrA</i>	F: TAATGCCGGGATACAGAGAGA	*1167
	R: GCACCATATCAACAGTGAGGT	

*Kloramfenikol direnç gen kaseti insersiyonu gerçekleşirse 1167 bç'lik bir PZR ürününün, kaset insersiyonu gerçekleşmezse 339 bç'lik bir PZR ürünü amplifiye edilmesi beklenmektedir.

Çizelge 4.13. *csrA* geninin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primer çifti

Gen Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün büyüklüğü (bç)
<i>csrA</i> F <u>EcoRI</u>	ACCTGAGA <u>AATTC</u> ATGCTGATTCTGACTCGT	210
<i>csrA</i> R <u>HindIII</u>	TGACTGA <u>AAGCTT</u> TTAGTAACTGGACTGCTG	

Altı çizili diziler kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerini göstermektedir.

Çizelge 4.14. pBAD24 vektörüne klonlanan genin koloni PZR ile doğrulanmasında kullanılan primer çifti

Gen Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün büyüklüğü (bç)
pBAD24	F: ATGCCATAGCATT TTTTATCC	*209
	R: GATTTAATCTGTATCAGG	

*Klonlama başarılı bir şekilde gerçekleşirse, 209 bç olan PZR ürün büyüklüğüne klonlanan genin büyüklüğü (bç) eklenecektir.

Çizelge 4.15. qRT-PZR yöntemi ile ekspresyon seviyeleri belirlenen genlerin primer dizileri ve oluşturdukları ürünlerin büyüklükleri

Gen Adı	Primer Dizisi (5' - 3')	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>csrA</i>	F: GAATGCTGATTCTGACTCGT	190
	R: CCTTAGTAACTGGACTGCTG	
<i>luxS</i>	F: TATCGATATCTCGCCGATGG	159
	R: CACTGGTAAACGTTTCAGCTC	
<i>lsrA</i>	F: AACTGGCTGAAACGCTGTAC	184
	R: AGCGAACAGACATTCCATGC	
<i>lsrK</i>	F: GGATGGCCTTTATGCTCAGC	144
	R: TTACCGGCGAGAGAATGTCA	
<i>lsrR</i>	F: CGATATTGGTCTGCGCTTAG	156
	R: GTGACCAGTCGGATTTGTTG	
16S rRNA	F: GGAGACTGCCAGTGATAAAC	151
	R: GGACTACGACGCACTTTATG	

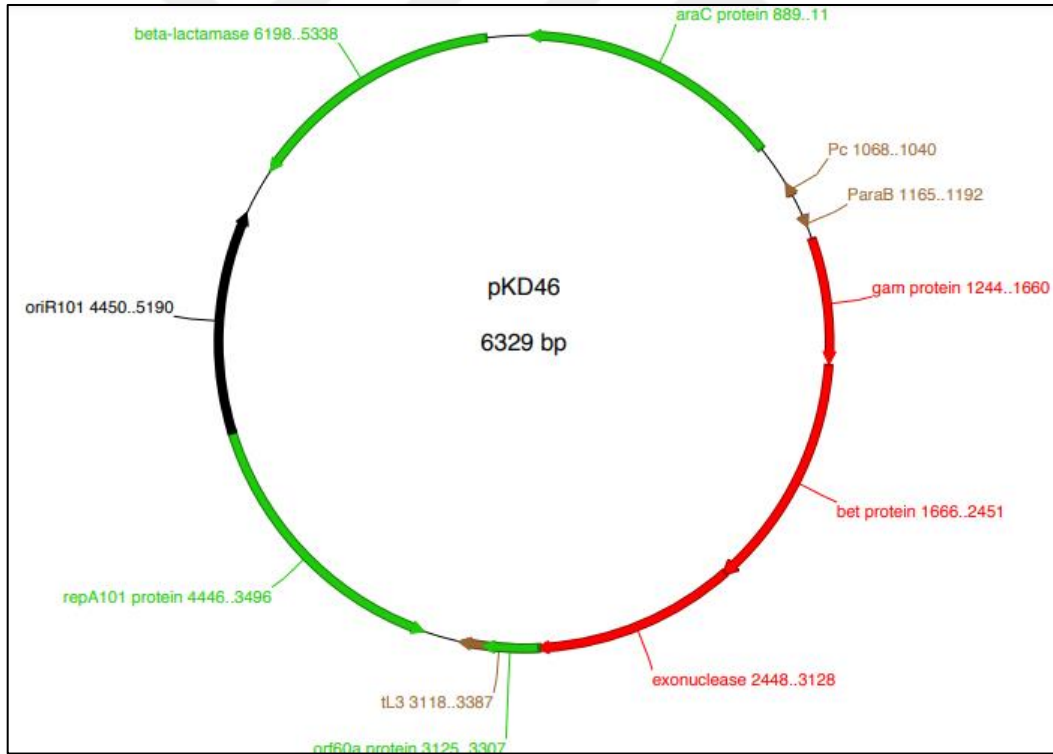
4.2. YÖNTEM

4.2.1. LAMBDA RED REKOMBİNAZ SİSTEMİ ile *csrA* GENİ SPESİFİK MUTASYONUNUN OLUŞTURULMASI

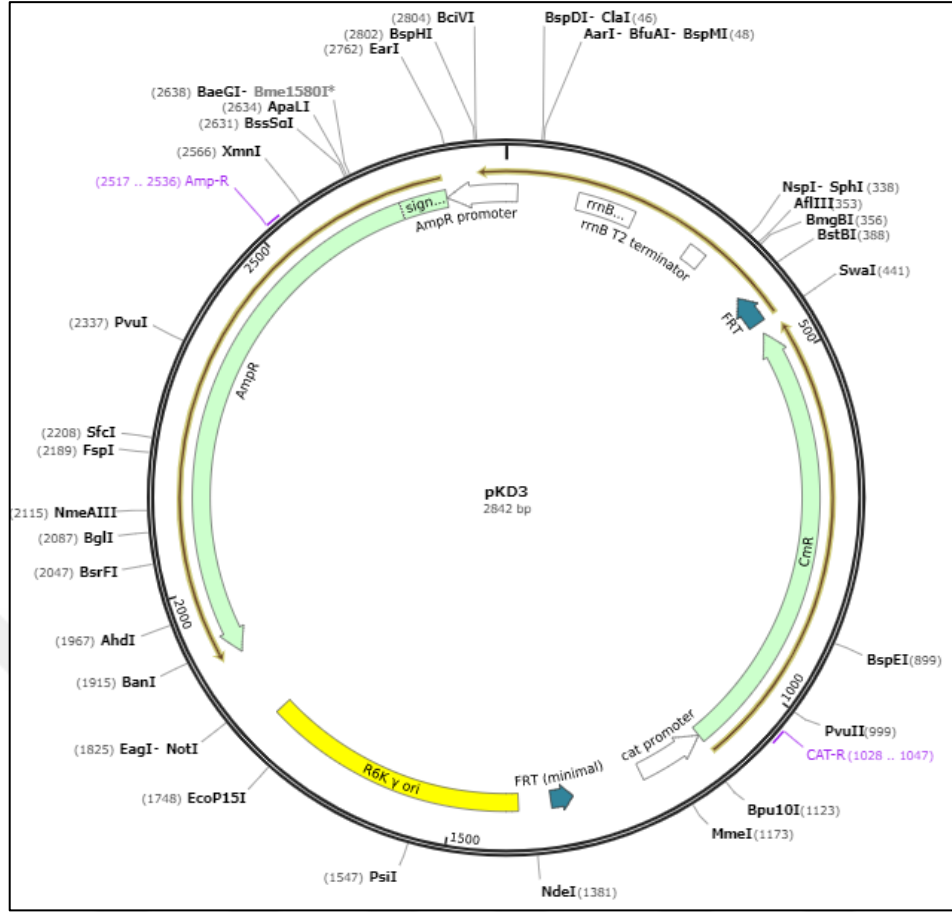
Tez çalışması kapsamında, biyofilm dispersiyonundaki rolünü araştırdığımız *csrA* genini inaktive etmek için bakteriyofaj lambda'nın Red rekombinaz sistemine dayanan yöntem kullanıldı (126). Bu amaçla kloramfenikol direnç gen kaseti, *csrA* geni yukarı ve aşağı akış bölgeleriyle homoloji gösteren primerler kullanılarak Touchdown PZR ile amplifiye edildi. Ardından, lambda Red rekombinazı ifade eden *S. Typhimurium* 14028 suşuna transformasyonu gerçekleştirildi. *csrA* geni ile PZR ürünü arasında gerçekleşen homolog bölge rekombinasyonu sonucunda kloramfenikol direnç gen kasetinin, *csrA* gen bölgesinin yerine insersiyonu gerçekleştirilerek *csrA* geninin insersiyonal mutasyon yoluyla inaktivasyonu gerçekleştirildi. Bu protokolde, pKD3 plazmidi, kloramfenikol direnç gen kasetini amplifiye etmek için kullanıldı. pKD46 plazmidi ise rekombinasyon için önemli olan Red genlerini (γ , β , exo) senteztezi için kullanıldı. *csrA* kromozomal geninin inaktivasyon aşamaları detaylı olarak aşağıda yer almaktadır.

4.2.1.1. pKD46 ve pKD3 Vektörlerin İzolasyonu

pKD46 plazmidini (Şekil 4.1.) içeren *E. coli* MZ1000 suşu, 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde 30 °C’de, pKD3 plazmidini (Şekil 4.2.) içeren *E. coli* MZ0997 suşu, 25 µg/mL Kloramfenikol ve 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C’de, geceboyu çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dk) geliştirildi. High Pure Plasmid Isolation (Roche, ABD) kitinin protokolü izlenerek aktif kültürden plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak izole edilen plazmid DNA’ların saflık ve miktar tayini ölçümleri gerçekleştirildi ve 0,2 µg/mL EtBr içeren % 1’lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Jeller UV ışık altında Syngene Gene Genius Jel Görüntüleme Sistemi SN:SYDR2 (Synoptics Group, Cambridge, Birleşik Krallık) kullanılarak görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 1 kb (kilobaz) DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. pKD46 vektörünün genetik haritası (127)



Şekil 4.2. pKD3 plazmidinin genetik haritası (128)

4.2.1.2. Touchdown PZR ile *csrA* Geni ile Homolog Bölgeler İçeren Kloramfenikol Direnç Gen Kasetinin Elde Edilmesi

csrA geni ile homolog bölgeler içeren kloramfenikol direnç gen kaseti Touchdown PZR yöntemiyle elde edildi. pKD3 plazmidi kalıp olarak kullanılarak kloramfenikol direnç gen kasetini amplifiye eden ve *csrA* geninin mutasyonunu oluşturmak amacıyla kullanılan primer çifti, her iki ucuna *csrA* gen başlangıç ve bitiş bölgeleri (45 bç) eklenerek tasarlandı (Çizelge 4.11.). Touchdown PZR bileşenleri ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4.16. ve Çizelge 4.17.'da gösterildi. Amplifikasyon, Thermal Cyclers (Bio-Rad T100, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 4.16. Touchdown PZR karışımı (1X)

İçerik	Hacim (µL)
DreamTaq tampon çözeltisi (10X) (20 mM MgCl ₂ içeren)	5
dNTP (2.5 mM)	1
İleri primer (10 µM)	1,25
Geri primer (10 µM)	1,25
DreamTaq DNA polimeraz (Fermentas, 1 U/µL)	0,125
Nükleaz içermeyen su	39,375
pDNA (100 ng/µL)	2
Toplam	50

Çizelge 4.17. Touchdown PZR sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	20
Bağlanma	70-->60*	45 saniye	
Uzama	72	2 dakika	
Denatürasyon	94	30 saniye	20
Bağlanma	60	45 saniye	
Uzama	72	2 dakika	
Son uzama	72	10 dakika	1

*Döngü başına 0.5 °C sıcaklık azalmaktadır.

PZR ürünleri, GeneMATRIX Basic DNA Purification Kiti (EUR_x, Polonya) ve kit protokolü uygulanarak saflaştırıldı. Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak saflaştırılan PZR ürünlerin saflık ve miktar tayini belirlendi, ardından 0,2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemine tabi tutulup UV ışık altında incelendi.

4.2.1.3. Elektrokompentan *S. Typhimurium* 14028 Hücrelerinin Hazırlanması

pKD46 plazmidinin transformasyonunun gerçekleştirileceği *S. Typhimurium* 14028 suşları elektrokompentan hale getirildi. *S. Typhimurium* 14028 suşları, LB sıvı (5 mL) besiyerine % 1 oranında inoküle ederek 37 °C'de geceboyu çalkalamalı inkübatörde (200 rpm/dakika)

geliştirildi. *S. Typhimurium* 14028 suşları, LB agar petri plaklarına tek koloni elde edilmesi amacıyla steril öze ile ekildi. Elde edilen petri plakları, 37 °C’de geceboyu inkübe edildi. LB agar yüzeyinde gelişen tek koloniler, steril öze ile alınarak 5 mL LB sıvı besiyeri içeren tüplere aktarıldı. 37 °C’de 200 rpm/dk çalkalamalı koşullarda gece boyunca inkübe edildi. Üreme gerçekleşen kültürden LB besiyerine 1:50 oranında (50 mL LB besiyerine 1 mL aktif kültür) inoküle edildi ve OD₆₀₀= 0,25-0,35 ulaşınca kadar 37 °C’de 200 rpm/dk çalkalamalı koşullarda inkübe edildi. Kültür ortamı 4 °C’de 6000 rpm’de 15 dk süre ile santrifüj edilerek üst sıvı döküldü. Hücre çökeltileri sıcaklığı önceden 4 °C’ye ayarlanmış % 10 gliserol çözeltisinde süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon, 4 °C’de 5500 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edilerek yeniden hücre çökeltileri elde edildi. Üst sıvı döküldükten sonra hücre çökeltileri % 10 gliserol çözeltisinde süspansiyon edildi ve buz üzerinde soğutulan ependorf tüplere 50 µL’lik süspansiyonlar halinde dağıtıldı. Hazırlanan kompetan hücreler -80 °C’de muhafaza edildi.

4.2.1.4. pDK46 Plazmidin *S. Typhimurium* 14028 Elektrokompetan Hücrelerine Transformasyonu

pDK46 plazmidinin, Gene Pulser Xcell Electroporation System cihazında (Bio-Rad, ABD), 2 mm örnek haznesi olan elektroporasyon kuvvetleri (Gene Pulser Cuvettes, Bio-Rad, ABD) kullanılarak *S. Typhimurium* 14028 elektrokompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Elektroporasyon öncesinde, kompetan hücreler, plazmid ve elektroporasyon kuvvetleri buz üzerinde bekletildi. 50 µL kompetan hücre süspansiyonu ile 500 ng plazmid DNA küvete aktarıldı. Bu esnada küvetin kuru olmasına ve pipetleme sırasında baloncuk oluşmamasına dikkat edildi. Elektroporator cihazında 2500 V değeri ayarlanarak 5 ms elektrik akımı uygulandı. Transformasyon işlemi gerçekleştirilen hücrelerin bulunduğu küvete önceden 30 °C’ye ısıtılmış 500 µL LB besiyeri eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Küvette bulunan tüm içerik steril Falkon tüpüne aktarıldı ve 500 µL LB besiyeri daha eklendi. Elde edilen kültür süspansiyonu 4 saat süre ile 30 °C’de 200 rpm/dakika çalkalamalı koşullarda inkübe edildi. Bu aşamadan sonra suşların 30 °C’de inkübe edilmesinin nedeni, pDK46 plazmidinin sıcaklığa duyarlı bir replikasyon orijini taşıması ve sadece 30 °C’de replikasyonun gerçekleşmesidir. İnkübasyon sonrasında ampisilin (100 µL/mL) içeren LB agar besiyerine yayıldı ve 30 °C’de 1 gece inkübe edildi.

Seçilen transformantların doğrulanması amacı ile ampisilin (100 µL/mL) içeren LB agar besiyerin üzerinde gelişen koloniler 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besi ortamında 30

°C’de geceboyu çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. Aktif kültürlerden 2 mL alınarak High Pure Plasmid Isolation (Roche, ABD) kitinin protokolü izlenerek plazmidin izolasyonu gerçekleştirildi ve izole edilen plazmidler agaroz jelde görüntülendi.

4.2.1.5. Kloramfenikol Direnç Gen Kasetinin Transformasyonu

Saflaştırılmış kloramfenikol direnç gen kaseti, pKD46 taşıyan *S. Typhimurium* 14028 hücrelerine aktarıldı. pKD46 taşıyan *S. Typhimurium* 14028 suşları bölüm 4.2.1.3.’deki protokol izlenerek elektrokompotan hale getirildi. Kloramfenikol direnç gen kasetinin aktarımı gerçekleştirilecek kompetant hücrelerin geliştirilmesi esnasında, pKD46 plazmidinin içerdiği rekombinasyon için önemli olan alfa, beta ve gama proteinlerinin indüksiyonu için gelişme ortamına son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde (1 M stoktan 1/100 olacak şekilde, v/v) L-arabinoz ortama eklendi. Kaset, hazırlanmış elektrokompotent hücrelere aktarması için bölüm 4.2.1.4.’deki protokol izlendi. *csrA* mutasyonunun *S. Typhimurium*’da üreme gecikmesine neden olduğunu göz önünde bulundurarak (129), transformantların gelişmesi amacı ile 37 °C’de 48 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Transformantlar, kloramfenikol (25 µL/mL) içeren LB agar ortamında seçildi.

4.2.1.6. Transformant Hücrelerde Kloramfenikol Gen Kaseti Varlığının Doğrulanması

Kloramfenikol içeren LB agar plakları üzerinde ürettiği gözlenen kolonilerden rastgele seçim yapıldı ve *csrA* mutasyonunun doğrulanması amacıyla, spesifik primerler (Çizelge 4.12.) varlığında koloni PZR gerçekleştirildi. Seçilen her bir koloni, LB agar plaklarına inoküle edildi ve 37 °C’de inkübe edildi. Koloni PZR için hazırlanan reaksiyon bileşenleri ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4.18. ve Çizelge 4.19.’de verildi. Seçilen koloniler 50 µL distile su içerisinde çözdürülerek 98 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda elde edilen süspansiyonun 2 µL’si PZR için kalıp DNA olarak kullanıldı. PZR ürünleri, TBE tamponu ve 0,2 µg/mL EtBr içeren % 1’lik agaroz jelde 1 saat süre ile 100 V sabit elektrik akımı uygulanarak yürütüldü. Süre sonunda jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Böylelikle, PZR aracılığıyla homolog bölge rekombinasyonunun meydana geldiği gösterildi.

Çizelge 4.18. Koloni PZR reaksiyon karışımı (1X)

İçerik	Hacim (µL)
DreamTaq tampon çözeltisi (10X) (20 mM MgCl ₂ içeren)	2
dNTP (2.5 mM)	0,5
İleri primer (10 µM)	0,5
Geri primer (10 µM)	0,5
DreamTaq DNA polimeraz (Fermentas, 1 U/µL)	0,1
Nükleaz içermeyen su	9,4
Süspanse koloni örneği	2
Toplam	15

Çizelge 4.19. Koloni PZR sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	20 saniye	25
Bağlanma	58 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

PZR işleminden sonra, *csrA* mutasyonunu içerdiği düşünülen kolonilerden elde edilen PZR ürünü, GeneMATRIX Basic DNA Purification Kiti (EUR_x, Polonya) ve kit protokolü uygulanarak saflaştırıldı ve mutasyonu doğrulamak için saflaştırılmış PZR ürününün dizilenmesi için BM Labosis firmasına gönderildi.

4.2.2. *csrA* GENİNİN ARABİNOZ ile İNDÜKLENEBİLEN PROMOTORA SAHİP pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI ve TRANSFORMASYONU

4.2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

S. Typhimurium 14028 suşu, LB sıvı besiyerinde 37°C’de geceboyu çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. Genomik DNA izolasyonu, GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma, ABD) kiti kullanılarak üretici firmanın belirttiği aşamalar izlenerek gerçekleştirildi. İzolasyon sonucu elde edilen DNA’ların saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile belirlendi. Uygun saflıkta olduğu belirlenen DNA’lar, % 1 agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez

işlemine tabi tutuldu. Süre sonunda jel, UV ışık altında Syngene Gene Genius Jel Görüntüleme Sistemi SN:SYDR2 (Synoptics Group, Cambridge, Birleşik Krallık) kullanılarak görüntülendi.

4.2.2.2. *csrA* Geninin PZR ile Amplifikasyonu

csrA geninin amplifikasyonu, bir önceki aşamada *S. Typhimurium* 14028 suşundan elde edilen gDNA kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirildi. *csrA* geninin amplifikasyonu için kullanılan primer çifti, EcoRI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgeleri eklenerek tasarlandı (Çizelge 4.13.). Primerlere eklenen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgelerinin, ait olduğu enzimin çoğaltılacak gen içerisinde kesim bölgesi içermemesine ve pBAD24 vektörünün klonlama bölgesinde yer almasına dikkat edildi. Amplifikasyon, Thermal Cycler (Bio-Rad T100, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon bileşenleri ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4.20. ve Çizelge 4.21.'da gösterildi. Elde edilen PZR ürünleri, GeneMATRIX Basic DNA Purification Kiti (EUR_x, Polonya) kullanılarak saflaştırıldı ve 1x TBE tamponu ile hazırlanmış 0,2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat süre ile yürütüldü. Son aşamada jel UV ışık altında görüntülendi ve moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 100 bç Plus DNA Ladder kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 4.20. *csrA* geninin PZR ile amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı (1X)

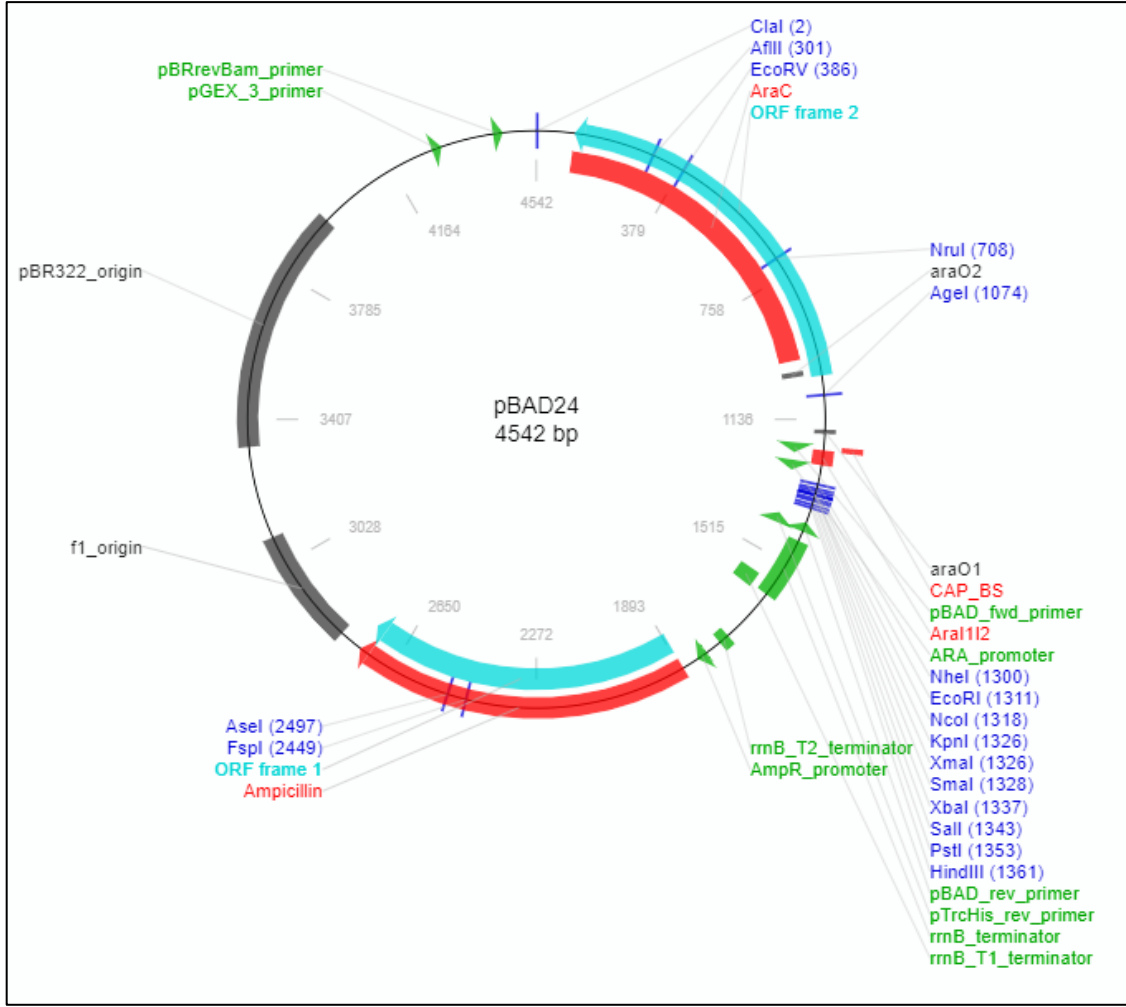
İçerik	Hacim (µL)
DreamTaq tampon çözeltisi (10X) (20 mM MgCl ₂ içeren)	2,5
dNTP (2.5 mM)	1
İleri primer (10 µM)	0,5
Geri primer (10 µM)	0,5
DreamTaq DNA polimeraz (Fermentas, 1 U/µL)	0.2
Nükleaz içermeyen su	19,3
gDNA (100 ng/µL)	1
Toplam	25

Çizelge 4.21. *csrA* geninin PZR ile amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	30
Bağlanma	56 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

4.2.2.3. pBAD24 Vektörünün İzolasyonu

pBAD24 plazmidini (Şekil 4.3.) ihtiva eden *S. Typhimurium* MZ1629 suşu, 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde 37 °C’de geceboyu çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geliştirildi. Aktif kültürden High Pure Plasmid Isolation (Roche, ABD) kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmid DNA’ların saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak belirlendi ve 0,2 µg/mL EtBr içeren % 1’lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat boyunca yürütüldü. Elektroforez işlemi sonunda jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 1 kb (kilobaz) DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4.3. pBAD24 plazmidinin genetik haritası (130)

4.2.2.4. pBAD24 Vektörünün ve *csrA* Geninin İkili Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonları

csrA geninin klonlanması esnasında, restriksiyon endonükleaz enzimleri ve bu enzimlere ait tampon çözeltiler Thermo Scientific, ABD firmasından sağlandı ve reaksiyonları için firma tarafından önerilen reaksiyon karışımları (Çizelge 4.22. ve Çizelge 4.23.) kullanıldı.

Çizelge 4.22. PZR ürünü *csrA* geninin ikili RE kesim reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	8
R tamponu (10X)	2
Saflaştırılmış <i>csrA</i> PZR ürünü (1000 ng/µL)	8
HindIII enzimi (10 U/µL)	1
EcoRI enzimi (10 U/µL)	1
Toplam	20

Çizelge 4.23. pBAD24 vektör DNA'nın ikili kesim reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
Nükleaz içermeyen su	9
R tamponu (10X)	2
pBAD24 pDNA (1000 ng/µL)	7
HindIII enzimi (10 U/µL)	1
EcoRI enzimi (10 U/µL)	1
Toplam	20

İkili kesim reaksiyonlarının gerçekleşmesi için hazırlanan reaksiyon karışımlarının 37 °C'de 2 saat inkübasyonu sağlandı. Enzimlerin sıcaklıkla inaktivasyonu için 65 °C'de 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. Kesim ürünleri, GeneMATRIX Basic DNA Purification Kiti (EUR_x, Polonya) kullanılarak saflaştırıldı. Moleküler büyüklük tespiti için GeneRuler 1 kb ve 100 bp DNA Ladder varlığında % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat yürütülerek UV ışık altında görüntülendi.

4.2.2.5. Ligasyon Reaksiyonları

Kesim ürünlerinde oluşturulan yapışkan uçlar aracılığıyla PZR ürününü lineer hale getirilen pBAD24 vektörüne aktararak rekombinant plazmid elde etmek amacıyla ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyon için T4 DNA ligaz enzimi ve bu enzime ait tampon çözeltileri Thermo Scientific, ABD firmasından sağlandı. Üretici firmanın talimatları dikkate alınarak, pBAD24 vektörü ve vektöre insersiyonu sağlanacak olan *csrA* gen dizisinin molar konsantrasyonlarına göre 3:1 oranında ligasyon karışımları (Çizelge 4.24.) hazırlandı. Elde edilen karışımlar 37 °C'de 20 dakika süre ile inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında 70 °C'de 5 dakika daha inkübasyon gerçekleştirilerek T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu

sağlandı. DNA-Vektör molar oranlarının hesaplanması için aşağıda verilen formülden yararlanıldı:

$$\text{DNA Konsantrasyonu (ng)} = \frac{\text{DNA boyutu (bç)}}{\text{Vektör boyutu (bç)}} \times \text{Vektör Konsantrasyonu (ng)} \times \text{Ligasyon oranı (3:1)}$$

Çizelge 4.24. Ligasyon reaksiyon karışımı

İçerik	3:1
Nükleaz içermeyen su	14,6 µL
T4 DNA ligaz tamponu (10X)	2 µL
Saflaştırılmış <i>csrA</i> PZR ürünü (18 ng)	0,4 µL
*pBAD24 (140 ng)	2 µL
T4 DNA ligaz (5 U/µL)	1 µL
Toplam Hacim	20 µL

*Kontrol grubu olarak yalnızca vektörü içeren bir ligasyon karışımı hazırlandı.

4.2.2.6. Elektrokompetan *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* Hücrelerinin Hazırlanması ve Rekombinant Plazmidin Transformasyonu

Ligasyon reaksiyonları sonucu ile elde edilen rekombinant plazmid (*csrA* genini içeren pBAD24 vektörü), daha önceden elektrokompetan hale getirilen *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* suşlarına aktarıldı. *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* suşları bölüm 4.2.1.3.'de anlatılan protokol izlenerek elektrokompetan hale getirildi. Ligasyon ürünlerinin, elektrokompetant hücrelere aktarılmasında bölüm 4.2.1.4.'de anlatılan protokol izlenerek gerçekleştirildi. Transformant hücreler, kloramfenikol (25 µL/mL) ve ampicilin (100 µg/mL) içeren LB agar ortamlarında seçildi.

4.2.2.7. Rekombinant Plazmidi İçeren Kolonilerin PZR ile Doğrulanması

Ampicilin ve kloramfenikol antibiyotiklerini içeren LB agar plakları üzerinde gelişen kolonilerden rastgele seçim yapılarak hedef genin varlığının saptanması amacıyla pBAD24 primerleri (Çizelge 4.14.) varlığında koloni PZR gerçekleştirildi. PZR öncesinde, seçilen her bir koloninin rekombinant plazmidi içermesi olasılığı dikkate alınarak LB agar plaklarına ekimi yapıldı ve 37 °C'de inkübe edildi. PZR sonucu, hedef geni içermeyen pBAD24 plazmidleri 209 bç ürün meydana getirirken, rekombinant plazmidlerde bu ürüne hedef genin uzunluğu eklenir. İnsersiyonu hedeflenen *csrA* geni 192 bç olduğundan pozitif

kolonilerin PZR sonucunda 401 bç uzunluğunda ürün oluşturması beklendi. Koloni PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4.25. ve Çizelge 4.26.'de gösterildi. Seçilen koloniler 50 µL distile su içerisinde çözdürülerek 98 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından bu süspansiyondan 2 µL alınarak PZR denemelerinde kalıp DNA olarak kullanıldı. PZR ürünleri, TBE tamponu içeren ve 0,2 µg/mL EtBr içeren % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat koşturuldu. Süre sonunda jel, UV ışık altında görüntülendi. Moleküler büyüklük tespiti, GeneRuler 100 bç Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 4.25. Koloni PZR reaksiyon karışımı (1X)

İçerik	Hacim (µL)
DreamTaq tampon çözeltisi (10X) (20 mM MgCl ₂ içeren)	2
dNTP (2.5 mM)	0,5
İleri primer (10 µM)	0,5
Geri primer (10 µM)	0,5
DreamTaq DNA polimeraz (Fermentas, 1 U/µL)	0,1
Nükleaz içermeyen su	9,4
Süspanse koloni örneği	2
Toplam	15

Çizelge 4.26. Koloni PZR sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	25
Bağlanma	54 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

4.2.3. *SALMONELLA*'DA CsrA REGÜLASYONUNUN OTOİNDÜKTÖR-2 AKTİVİTESİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

4.2.3.1. Suşlardan Süpernatant Eldesi

QS sinyalizasyonunda rol oynayan otoindüktör molekülleri, bakteriler tarafından dış ortama salgılanmaktadır. Araştırma kapsamında, *Salmonella* test suşlarının sentezlediği AI-2

moleküllerinin elde edilmesi amacıyla bakteri hücrelerinden arındırılmış süpernatant örnekleri elde edildi. Doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve *csrA* genini aşırı eksprese eden *S. Typhimurium* suşları LB sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C’de çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) geceboyu geliştirildi. Aktif kültürler, LB sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C’de çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) ekspanansiyel fazın ortalarına kadar (OD₅₉₅ 0,3-0,5) geliştirildi. *csrA* geninin aşırı ekspresyonunu indüklemek amacıyla MN1830 suşunun gelişme ortamına % 0,1 L-arabinoz eklendi. İnkübasyon sonucunda kültürlerden 1,5 mL alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj uygulaması ile hücreler çöktürüldü. Hücrelerin tamamen uzaklaştırılması için süpernatant, 0,22 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Suşlardan elde edilen süpernatantlar -20 °C’de muhafaza edildi.

4.2.3.2. *Salmonella* Suşlarının AI-2 Aktivitelerinin Belirlenmesi

Raportör suş *V. harveyi* BB170, AI biyoanaliz besiyerine (AB Broth) % 1 oranında inoküle edilerek 175 rpm çalkalamalı koşullarda 30 °C’de geceboyu boyunca geliştirildi. Bir gece boyunca geliştirilen aktif *V. harveyi* BB170 suşu, steril AB besiyerinde 1:5000 oranında dilüe edilerek 96 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plaklarına 90 µL hacimde dağıtıldı. Bir önceki aşamada elde edilen süpernatantlardan 10 µL alınarak *V. harveyi* BB170 suşunun bulunduğu kuyulara aktarıldı. Kontrol kuyularına ise 10 µL AB Broth eklendi ve 30 °C’de 200 rpm’de 4 saat boyunca inkübe edildi. 1, 2, 3 ve 4 saatlik zaman dilimlerinde plak okuyucuda (Tecan Infinite 200) luminometrik ölçümler gerçekleştirildi. Suşların AI-2 aktiviteleri süpernatant içeren örnek kuyularından elde edilen okumaların kontrol kuyularından elde edilen okumalara oranlanması ile yüzde (%) kat değişimi hesaplandı. Hesaplama için, aşağıda verilen formülden yararlanıldı (131).

$$\text{Yüzde kat değişimi (\%)} = (\text{süpernatant kuyuları} / \text{kontrol kuyuları}) \times 100$$

4.2.4. *S. TYPHIMURIUM* 14028 SUŞLARININ BİYOFİLM DİSPERSİYONUNU İNDÜKLEYEN OPTİMUM GLUKOZ KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİ

S. Typhimurium biyofilm oluşumunda inhibitör rol oynarken, CsrA proteininin aktivitesini teşvik ettiği bilinen glukoz molekülünün *S. Typhimurium* biyofilm dispersiyonu için optimum konsantrasyonu belirlendi. Doğal tip *S. Typhimurium* suşlarının polistiren yüzeyde ürettiği biyofilm miktarını belirlemek amacıyla Woodward vd. (2000) tarafından önerilen

yöntem kullanıldı (132). Bu yöntemde doğal tip *S. Typhimurium* suşları, 5 mL'lik LB^{-NaCl} (NaCl içermeyen LB sıvı besiyeri) ortamına % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C'de çalkalamalı koşullarda geceboyu inkübe edildi. *S. Typhimurium* suşlarının OD₅₉₅ değeri 0,2 olacak şekilde ayarlanarak 100 µL LB^{-NaCl} içeren 96 kuyulu mikrodilasyon plaklarına 30 µL hacimde eklendi. Plaklar *Salmonella* biyofilm üretimi için optimum olduğu bilinen 72 saat süresince 20°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyular 2 defa fosfatla tamponlanmış tuz (PBS) ile yıkanarak planktonik hücrelerin uzaklaştırılması sağlandı. Farklı glukoz konsantrasyonlarına sahip (% 2, % 1, % 0,5 ve % 0,25) solüsyonlar biyofilm içeren kuyulara 10 µl hacimde aktarıldı ve optimum dispersiyon süresinin belirlenmesi amacıyla 12 saat, 16 saat ve 24 saat süre boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda, kuyular 3 defa serum fizyolojik ile yıkanarak planktonik hücrelerin uzaklaştırılması sağlandı. Biyofilm yapısının fiksasyonu için her kuyuya 150 µL % 95 methanol eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra kuyular oda sıcaklığında kapakları açık bırakarak kurutuldu ve her bir kuyuya 130 µl % 1'lik kristal viyole eklenerek 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda kuyular distile su ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından biyofilm tabakasına bağlanan boyayı çözmek için 130 µl % 33'lük glasiyal asetik asit kuyulara eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra çözünen kristal viyole boyasının optik yoğunluğu 595 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Perkin-Elmer Victor V3) ölçüldü. Olgun biyofilm yapısının dispersiyon yüzdesi alınan OD değerlerinin ortalaması, kontrol kuyularının (glukoz içermeyen kuyular) OD değerlerine oranlanması ile hesaplandı. Hesaplama için aşağıda verilen formülden yararlanıldı (133).

Yüzde (%) biyofilm dispersiyonu = $100 - [(OD_{595} \text{ Örnek Kuyuları} / OD_{595} \text{ Kontrol Kuyuları}) \times 100]$

4.2.4.1. Dispersiyonu İndükleyen Optimum Glukoz Konsantrasyonunun *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* Olgun Biyofilmleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşunda biyofilm dispersiyonunu indüklediği belirlenen optimum glukoz konsantrasyonu (% 0,5) kullanılarak *csrA* geni bakımından mutant suşlarda glukozun biyofilm yapısının dispersiyonuna etkilerinin araştırılması amaçlandı. *CsrA*'nın düzenleyici etkisinin varlığını belirlemek amacıyla *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşları bölüm 4.2.4.'de anlatılan protokol izlenerek polistiren yüzeyde biyofilm oluşturma için 72 saat süresince 20°C'de inkübasyona bırakıldı. Ancak *csrA* geni

bakımından mutant *S. Typhimurium* suşlarının biyofilm oluşturmadığı gözlemlendi. Bu nedenle dispersiyon deneyleri gerçekleştirilemedi. Buna karşın, *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* suşlarının, farklı inkübasyon sürelerinde (72, 96 ve 120 saat) 20 °C'de ve 37 °C'de 96 saat sürecinde biyofilm üretim özellikleri araştırıldı.

Plaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerin sonuçları "cut off" (sınır değer, OD_c) değerlerine göre üretilen biyofilm düzeyi açısından "üretici olmayan", "zayıf", "orta" ve "güçlü" olmak üzere değerlendirildi. OD_c değerleri denklem (1) kullanılarak hesaplandı. Suşların ortalama OD'si (OD_{suş}) denklem (2) kullanılarak hesaplandı ve biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan "cut off" dönüşümleri değerlendirildi: OD_{suş} ≤ OD_c üretici değil, OD_c < OD_{suş} ≤ 2xOD_c zayıf üretici, 2xOD_c < OD_{suş} ≤ 4xOD_c orta düzey üretici, 4xOD_c < OD_{suş} güçlü üretici.

OD_c=kontrol kuyulardan alınan OD değerlerin ortalaması + (3 × kontrol kuyulardan alınan OD değerlerin standart sapmaları (1)

OD_{suş}= Örnek kuyulardan alınan OD değerlerin ortalaması – OD_c (2)

4.2.5. CsrA'NIN AI-2 SENTEZİNDEN ve HÜCRE İÇİNE ALIMINDAN SORUMLU GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Dispersiyon için optimum olan glukoz konsantrasyonunda (% 0,5) CsrA'nın AI-2 sentezinden sorumlu olan *luxS* geni ve AI-2 hücre içine alımında rol alan *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi araştırıldı. Doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve *csrA* geni içeren pBAD24 vektörünü taşıyan MN1830 suşlarında *luxS*, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırıldı. Aynı zamanda glukoz konsantrasyonuna (% 0,5) bağlı olarak ilgili genlerin ifade seviyeleri belirlendi. İlgili genlerin ekspresyon seviyelerinin hem planktonik hücrelerde hem de biyofilm yapısından dağılan hücrelerde belirlenmesi hedeflendi. Tüm *Salmonella* suşlarından toplam RNA elde edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA'lar kullanılarak qRT-PZR ile ilgili genlerin göreceli kat değişimleri (fold-change) belirlendi.

4.2.5.1. Toplam RNA İzolasyonu

4.2.5.1.1. Planktonik Hücrelerden RNA İzolasyonu

Tüm *Salmonella* suşları LB sıvı besiyerinde $OD_{600} = 0,4$ düzeyine ulaşana kadar (eksponansiyel faz) çalkalamalı koşullarda, 37°C 'de inkübe edildi. Toplam RNA izolasyonu SV Total RNA Isolation System (Promega, ABD) kiti kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen talimatlar doğrultusunda gerçekleştirildi. Biyofilm dispersiyonunu indüklemek amacıyla daha önceki çalışmalarımız sonucu optimum olduğunu belirlediğimiz % 0,5 konsantrasyonunda glukoz suşların üreme ortamlarına eklendi ve 37°C 'de çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 12 saat inkübasyon süresine tabi tutuldu. *S. Typhimurium* MN1830 suşu, $OD_{600} = 0,2$ düzeyine ulaşana kadar çalkalamalı koşullarda, 37°C 'de geliştirildi. Ortama BAD promotorunun teşviki için % 0,1 oranında L-arabinoz ilave edilerek 30 dakika daha inkübasyona tabi tutuldu. Böylece *csrA* geninin aşırı ekspresyonu sağlandı. Gelişme ortamına glukoz ve L-arabinoz eklenmemiş planktonik hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı.

4.2.5.1.2. Olgun Biyofilmden Dağılan Hücrelerden RNA İzolasyonu

Chua vd. (2015) tarafından önerilen protokol gerçekleştirilerek RNA izolasyonu için biyofilm yapısından dağılan hücrelerin elde edilmesi hedeflendi (134). $\text{LB}^{-\text{NaCl}}$ sıvı besiyeri içeren polistiren mikrodilüsyon plaklarında hem doğal tip *S. Typhimurium* 14028 hem de *csrA* genini içeren pBAD24 vektörlerini taşıyan mutant suşların biyofilm oluşturmaları (4.2.4. bölümünde anlatıldığı üzere) sağlandı. Aseptik koşullar altında olgun biyofilm yapısından planktonik hücreleri uzaklaştırılması için kuyular 2 defa fosfatla tamponlanmış tuz (PBS) ile yıkandı. Kuyularda oluşan biyofilm yapısının dispersiyonu için belirlenen optimum glukoz konsantrasyonu (% 0,5) kuyulara 10 μL eklendi ve 12 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, *csrA* genini taşıyan pBAD24 vektörünü içeren mutant suşların oluşturduğu biyofilmlerin olduğu kuyulara *csrA* geninin ifadesini indüklemek amacıyla % 0,1 oranında L-arabinoz eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Biyofilmden dağılan hücrelerin toplanması ve toplam RNA izolasyonu SV Total RNA Isolation System (Promega, ABD) kiti kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen basamaklar izlenerek gerçekleştirildi.

Elde edilen RNA'ların saflık ve miktar tayinleri ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü ve % 2 agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Süreç sonunda, 0,2 $\mu\text{g/mL}$ EtBr içeren

jel, UV ışık altında görüntülendi. Bantların moleküler büyüklüklerinin tespiti için, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

4.2.5.2. cDNA Sentezi

Tüm *Salmonella* suş gruplarından elde edilen RNA örnekleri ile cDNA sentezi, iScript™ cDNA Synthesis kiti (Bio-Rad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve sıcaklık döngüsü Çizelge 4.27. ve Çizelge 4.28.'da verildi. Elde edilen cDNA'lar, qRT-PZR denemelerine kadar -20 °C'de saklandı.

Çizelge 4.27. Ters transkripsiyon karışımı

İçerik	Hacim (µL)
iScript reaksiyon karışımı (5X)	4
Total RNA (1000 ng/µL)	-
Nükleaz içermeyen su	-
iScript ters transkriptaz	1
Son Hacim	20

Çizelge 4.28. Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Bağlanma	25	5	1
Ters transkripsiyon	46	20	1
İnaktivasyon	95	1	1

4.2.5.3. Gen İfade Düzeylerinin qRT-PZR ile Belirlenmesi

qRT-PZR denemelerinde ifade düzeyleri araştırılan genler ve bu genlere özgü tasarlanan primerler, Çizelge 4.15.'de gösterildi. qRT-PZR denemeleri Light Cyclers 480 (Roche, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm genler için kullanılan amplifikasyon karışımları 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonia) kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı (Çizelge 4.29.). Reaksiyonlar, 96 kuyulu plaklarda toplam 10 µL hacimde gerçekleştirildi. cDNA kalıbını içermeyen, aynı hacimde ddH₂O içeren reaksiyon karışımı ise negatif kontrol (NK) olarak kullanıldı. Light Cyclers 480 cihazında kullanılan döngü programı Çizelge 4.30.'de verildi.

Çizelge 4.29. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı

İçerik	Son Konsantrasyon	Hacim (µl)
EvaGreen qPCR supermix (5X)	1X	2
İleri primer	10 pmol/µL	0,5
Geri primer	10 pmol/µL	0,5
cDNA (1:10 sulandırılmış)	10 ng/µL	1
ddH ₂ O	-	6
Toplam hacim	-	10

Çizelge 4.30. LightCycler 480 cihazında kullanılan qRT-PZR program

Basamak	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Artış (°C/s)
İlk Denatürasyon	İlk Denatürasyon	95	15 dk	4.4
Amplifikasyon (40 Döngü)	Denatürasyon	95	15 sn	4.4
	Bağlanma	58*	20 sn	2.2
	Uzama	72	20 sn	4.4
Erime Eğrisi	Denatürasyon	95	30 sn	4.4
	Bağlanma	60	30 sn	2.2
	Denatürasyon	99		0.11
Soğuma	Soğuma	40	30 sn	2.2

*Primer bağlanma sıcaklığı (T_m) *csrA*, *lsrA* ve *lsrK* genleri için 58 °C, *luxS* geni için 59 °C, *lsrR* geni için 57 °C ve referans gen olan 16S için 54 °C olarak belirlendi.

4.2.5.4. qRT-PZR Veri Analizi

qRT-PZR verilerinin analizi için öncelikle örneklerin yer aldığı test grupları oluşturuldu. Glukoz veya L-arabinoz eklenmemiş doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu kontrol grubu iken, diğer gruplar (glukoz veya L-arabinoz eklenmiş doğal tip *S. Typhimurium* 14028, *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* ve *S. Typhimurium* MN1830) test grubu olarak belirlendi. Veri analizi için göreceli kantifikasyon olarak bilinen, kontrol ve test grubunda yer alan hedef

genin göreceli ifade miktarına (kat farkına, fold change) dayanan bir yöntem kullanıldı. Bu yöntem, hedef genin farklı iki gruptaki ifade düzeyindeki değişimine oranlanmasına dayalıdır. Hesaplamalar, eşik döngü değeri (Ct) farklılıklarının amplifikasyon verimi de dikkate alınarak karşılaştırılır. qRT-PZR ile elde edilen veriler, biyolojik olarak anlamlı hale gelebilmesi amacıyla normalize edildi. Normalizasyon işlemi için, ifade seviyelerinin tüm gruplarda sabit olduğu kabul edilen 16S rRNA referans geni kullanıldı. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri; 16S rRNA geninin her bir örnek grubundaki ifade seviyesi ile oranlanarak normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) metodu kullanılmadan önce, hedef ve referans genin amplifikasyon verimliliklerinin belirlenmesi esastır. Tüm genlerin % 100'e yakın amplifikasyon verimliliğine sahip olduğu bilindikten sonra, normalize edilmiş örnek gruplarındaki genlerin ifade seviyelerinin kat farkının hesaplanması için aşağıda verilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanıldı (135).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{(Ct_H - Ct_R)_T - (Ct_H - Ct_R)_K}$$

Ct_H : Hedef genin ortalama Ct değeri

Ct_R : Referans genin ortalama Ct değeri

K: Kontrol grubu

T: Test grubu

4.2.6. İSTATİSTİKİ ANALİZLER

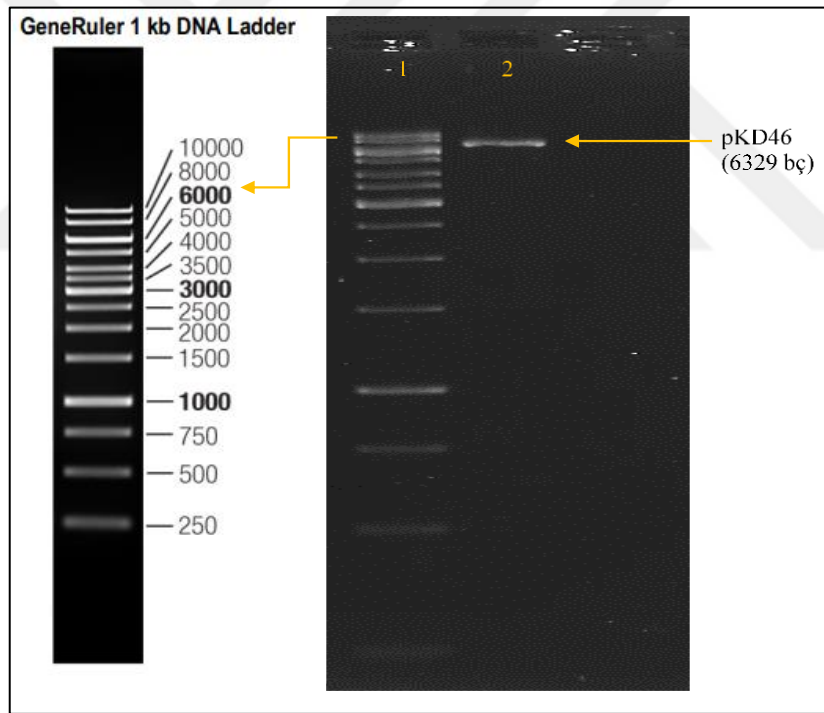
Tüm istatistiki analizler, GraphPad Prism (sürüm 9.2) Windows paketi kullanılarak gerçekleştirildi. Anlamlı farklılıkları değerlendirmek için Student t-testi kullanıldı ve $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. LAMBDA RED REKOMBİNAZ SİSTEMİ ile *csrA* GENİ SPESİFİK MUTASYONUNUN OLUŞTURULMASI

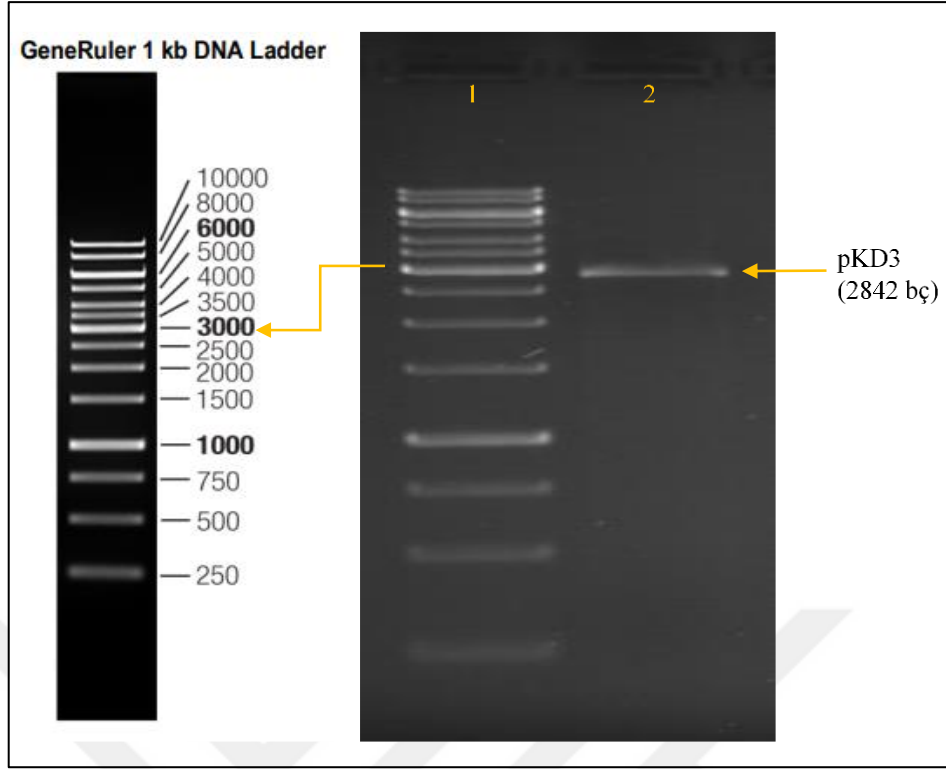
5.1.1. pKD46 ve pKD3 PLAZMİDLERİNİN İZOLASYONU

pKD46 plazmidinin, arabinoz ile indüklenebilen bir promotorun kontrolü altında rekombinasyon için önemli olan Red genlerini (γ , β , exo) kodlayan sıcaklığa duyarlı, düşük kopya sayılı bir plazmid olduğu bilinmektedir. Rekombinasyon için kullanılmak üzere *E. coli* MZ1000 suşundan kit yardımı ile pKD46 plazmidinin izolasyonu gerçekleştirildi. Moleküler büyüklüğünün tespiti için 6329 bp büyüklüğünde olan pKD46 plazmidi, yalnızca bir kesim dizisi içerdiği bilinen EcoRV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde doğrusal formda görüntülendi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. pKD46 plazmidinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: pKD46 plazmidinin doğrusal formunu (6329 bp)

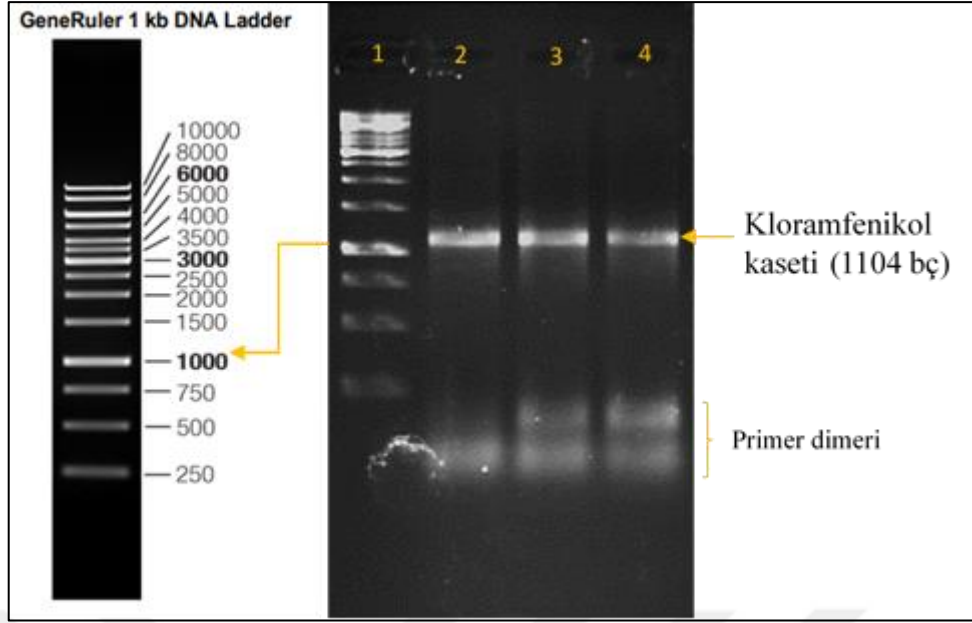
pKD3 plazmidi, Kloramfenikol direnç kasetinin amplifikasyonunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere *E. coli* MZ0997 suşundan izolasyonu gerçekleştirildi. Moleküler büyüklüğünün tespiti için 2842 bp büyüklüğünde olan pKD3 plazmidi, yalnızca tek bir bölgeden kesim yaptığı bilinen PvuI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. Ardından agaroz jelde doğrusal formu görüntülendi (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. pKD3 plazmidinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: pKD3 plazmidinin doğrusal formunu (2842 bç)

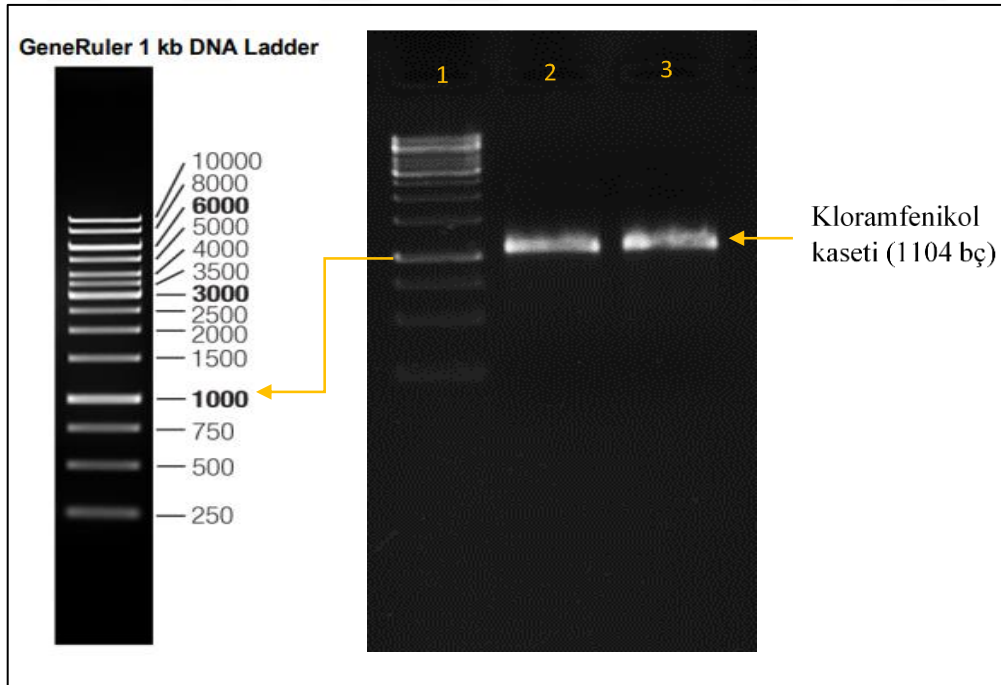
5.1.2. *csrA* GENİ ile HOMOLOG BÖLGELER İÇEREN KLORAMFENİKOL DİRENÇ GEN KASETİNİN ELDE EDİLMESİ

Kloramfenikol direnç gen kaseti, izole edilen pKD3 vektörü kalıp DNA olarak kullanarak *csrA* geni ile downstream ve upstream homoloji bölgelerine sahip primerler ile amplifiye edildi. Bu süreç, Touchdown PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. Elde edilen gen kasetinin moleküler büyüklüğünü kontrol etmek amacıyla, PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3. *csrA* geni ile homolog bölgeler içeren kloramfenikol direnç gen kasetinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2-4: Touchdown PZR ürünleri

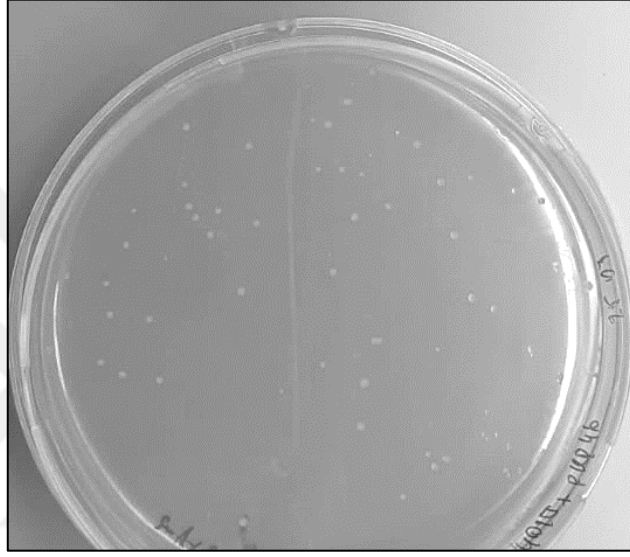
Touchdown PZR ile amplifiye edilen kloramfenikol direnç gen kaseti, GeneMATRIX Basic DNA Purification Kiti (EUR_x, Polonya) yardımıyla mutasyon oluşumunda kullanılmadan önce primer dimerinden arındırıldı (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. Safaştırılmış kloramfenikol direnç gen kasetinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2,3: Safaştırma ürünleri

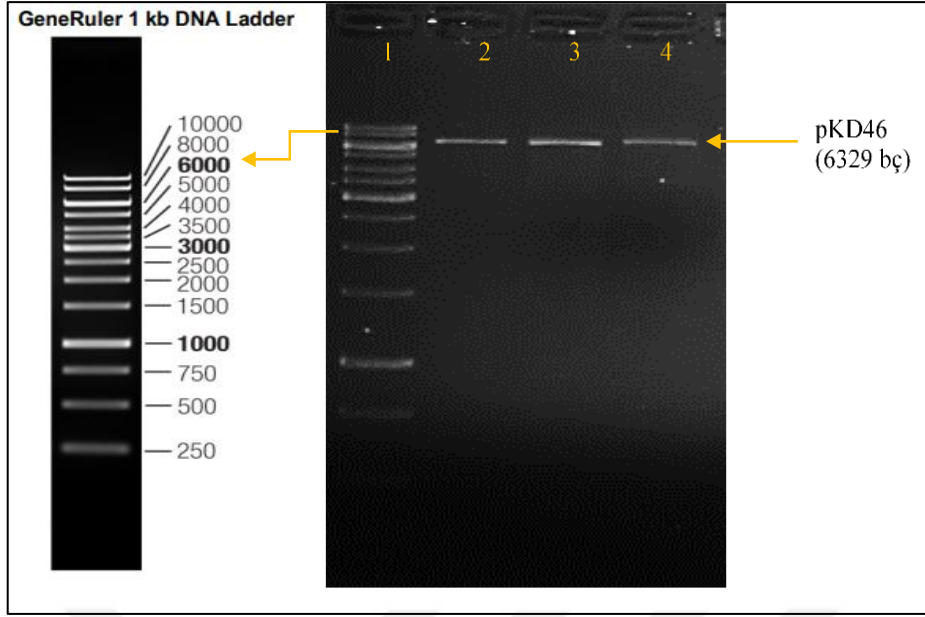
5.1.3. pKD46 PLAZMİDİNİN S. TYPHİMURİUM 14028 SUŞUNA TRANSFORMASYONU

S. Typhimurium 14028 suşunda başarılı bir şekilde kloramfenikol direnç gen kasetinin *csrA* genine insersiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla Red genleri (γ , β , *exo*) taşıyan pKD46 plazmidi elektroporasyon aracılığıyla *S. Typhimurium* 14028 suşuna transforme edildi. Ardından ampisilin (100 μ L/mL) içeren LB agar besiyerinde geliştiği gözlenen koloniler seçildi (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. *S. Typhimurium* 14028 suşuna pKD46 plazmit transformasyonunun sonucunda oluşan koloniler

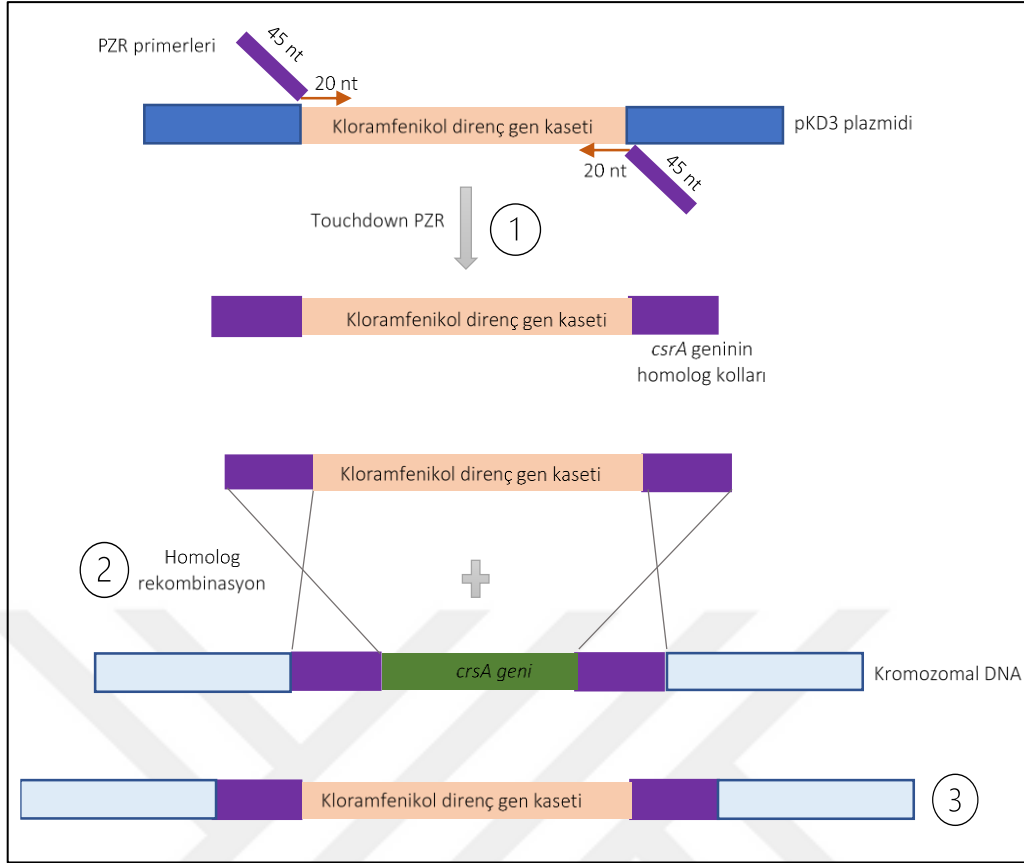
Rastgele seçim yapılan kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmidlerin moleküler büyüklüğünü doğrulamak amacıyla tek bir bölgeden kestiği bilinen *EcoRV* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesildi. Kesim ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. pKD46 plazmit transformasyonunun sonucunda oluşan transformantlarda pKD46 plazmidinin tespiti. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: *E. coli* MZ1000 suşundan izole edilen pKD46 plazmidinin doğrusal formunu; kuyu 3,4: iki transformatlardan izole edilen pKD46 plazmidinin doğrusal formunu

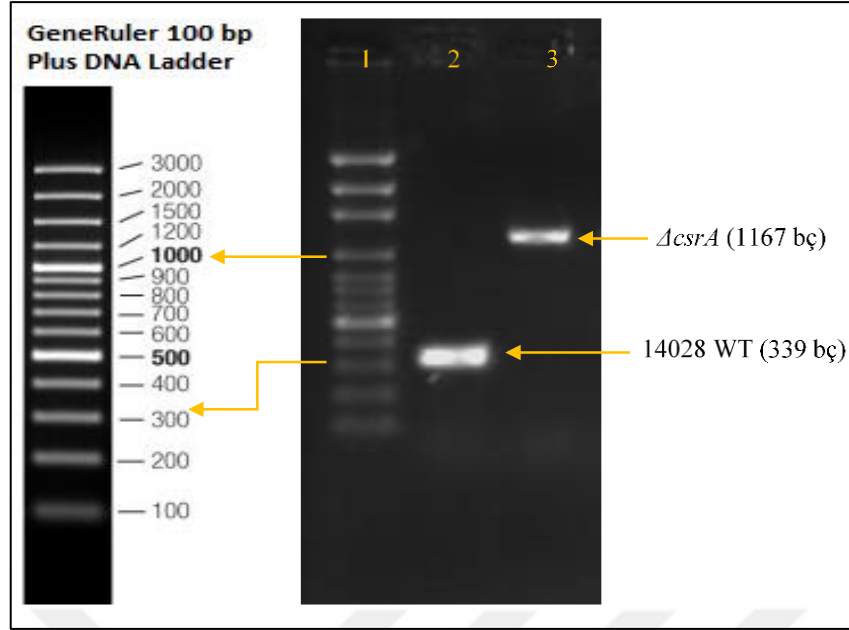
5.1.4. KLORAMFENİKOL DİRENÇ GEN KASETİNİN TRANSFORMASYONU

csrA geni bakımından mutant *S. Typhimurium* 14028 suşlarının elde edilmesi amacıyla uygulanan yöntem Şekil 5.7.'de gösterildi.



Şekil 5.7. *csrA* genini inaktive etmek için bakteriyofaj lambda'nın Red rekombinaz sistemine dayanan yöntem. (1) Touchdown PZR ile *csrA* geninin homolog kollarına sahip kloramfenikol direnç gen kaseti elde edilmesi. (2) ve (3) kloramfenikol direnç gen kaseti ile kromozomal *csrA* geni arasında homolog rekombinasyonun meydana gelerek *csrA* geninin yerine kloramfenikol gen kasetinin insersiyonunun gerçekleştirilmesi.

csrA mutantları, kloramfenikol içeren LB agar besiyerinde seçildi ve kloramfenikol direnç gen kasetinin varlığı, *csrA* mutasyon doğrulama primerleri kullanılarak (Çizelge 4.12.) koloni PZR ile doğrulandı (Şekil 5.8.). *csrA* mutasyonunun doğrulanmasında kullanılan primerler ile gerçekleştirilen PZR sonucu *csrA* geni içeren doğal tip hücreler 339 bç ürün oluştururken, *csrA* geni bakımından mutant hücreler 1167 bç büyüklüğünde ürün meydana getirmesi beklendi. Ayrıca, *csrA* mutasyonu *S. Typhimurium*'un gelişmesini negatif etkilediğinden (129), transformantlar 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra seçildi. Mutasyonu doğrulamak amacıyla koloni PZR ürünü, dizileme için BM Labosis firmasına gönderildi. Sanger dizilemesi sonuçları, mutasyonun başarıyla oluşturulduğunu gösterdi.

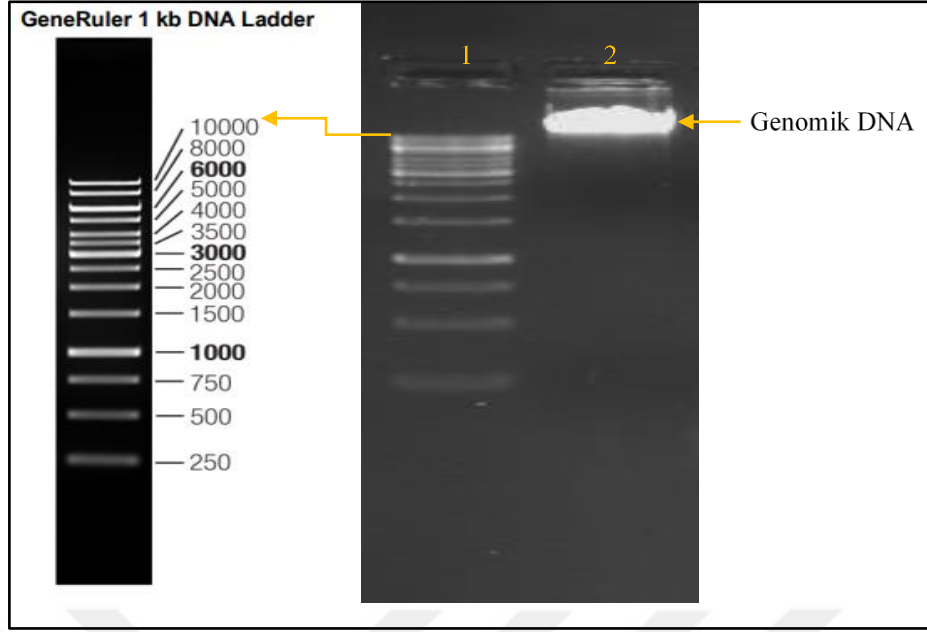


Şekil 5.8. *S. Typhimurium* 14028'da *csrA* gen mutantının tespiti. Kuyu 1: 100 bç DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: Doğal tip *S. Typhimurium* 14028 ; kuyu 3: *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* 14028

5.2. *csrA* GENİNİN pBAD24 VEKTÖRÜNE KLONLANMASI ve TRANSFORMASYONU

5.2.1. *S. TYPHIMURIUM* 14028 SUŞUNDAN GENOMİK DNA İZOLASYONU

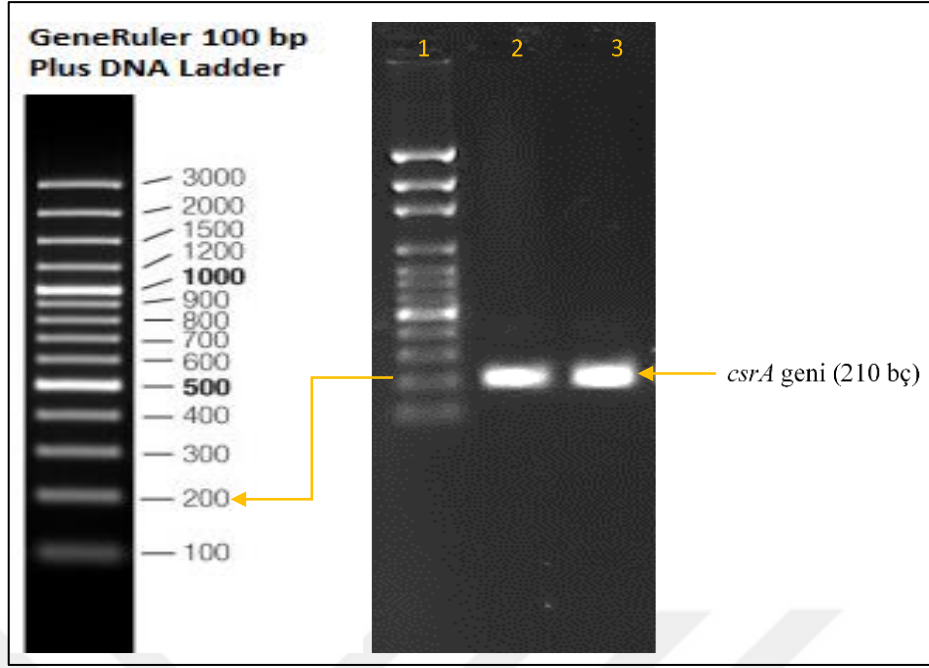
Genomik DNA (gDNA), *csrA* genini PZR ile amplifiye etmek amacıyla DNA kalıbı olarak kullanılmak üzere doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşundan gDNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen gDNA, % 1'lik agaroz jelde 100 V sabit elektrik akımında 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu ve UV ışığı altında görüntülendi (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. Genomik DNA jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: Doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşundan izole edilen gDNA

5.2.2. *csrA* GENİNİN COĞALTILMASI

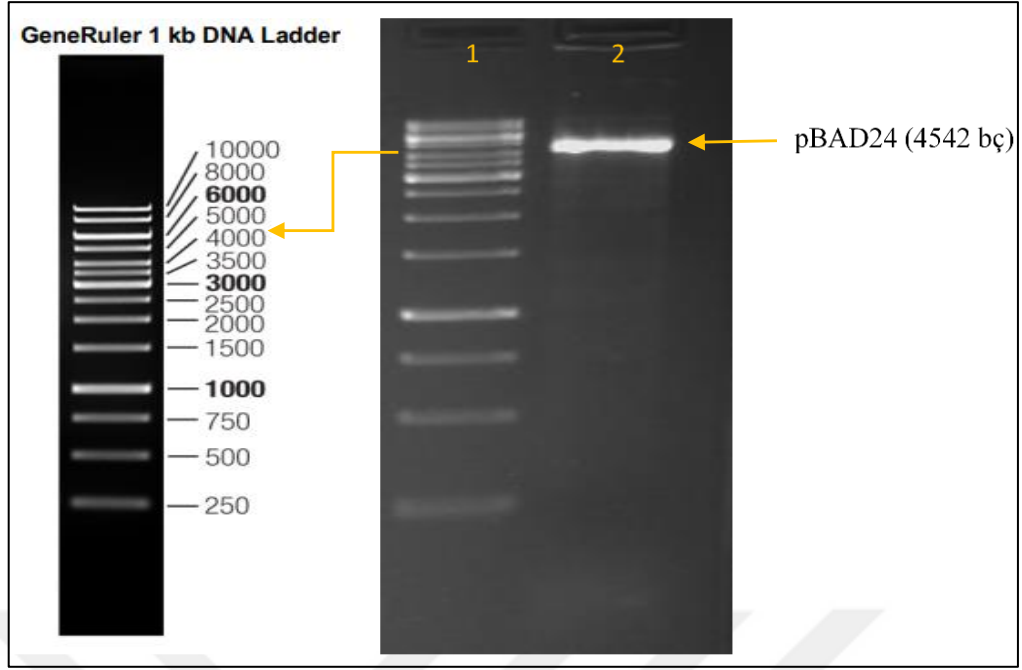
Doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşundan izole edilen gDNA kalıp olarak kullanılarak *csrA* geninin açık okuma çerçevesi PZR ile amplifiye edildi. *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgelerinin de dahil edildiği primerler varlığında 210 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildiği agaroz jelde elektroforezi sonrası belirlendi (Şekil 5.10.).



Şekil 5.10. *csrA* geninin jel görüntüsü. Kuyu 1: 100 bç DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2,3: PZR ürünleri

5.2.3. pBAD24 VEKTÖRÜN İZOLASYONU

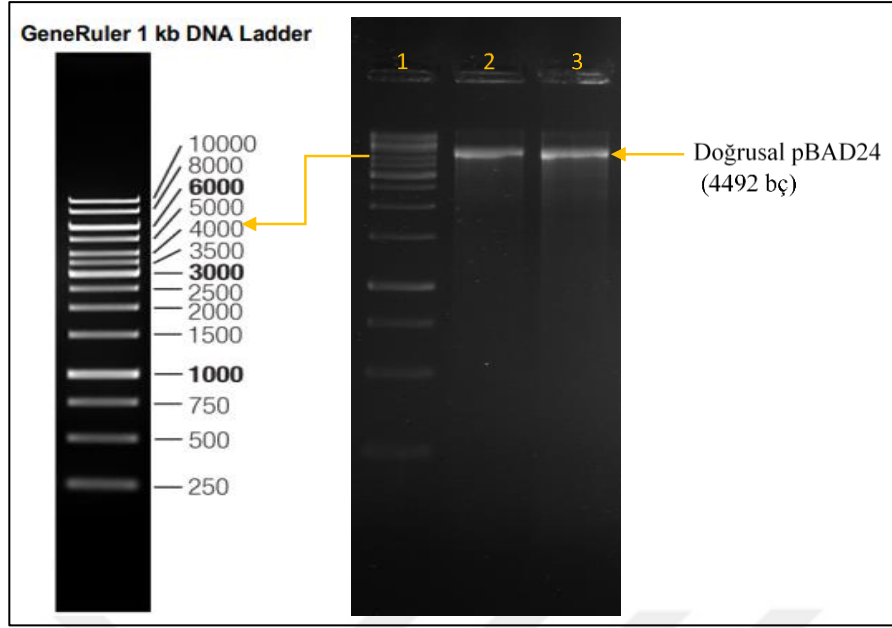
csrA gen klonlaması çalışmalarında kullanılmak üzere arabinoz ile indüklenebilen promotora sahip pBAD24 plazmidi, *S. Typhimurium* MZ1629 suşundan izole edildi. Moleküler büyüklüğü 4542 bç olan plazmid DNA, EcoRV restriksiyon endonükleaz enzimi ile tek bir bölgeden kesim işlemine tabi tutularak % 1'lik agaroz jelde doğrusal formu UV ışık altında görüntülendi (Şekil 5.11.).



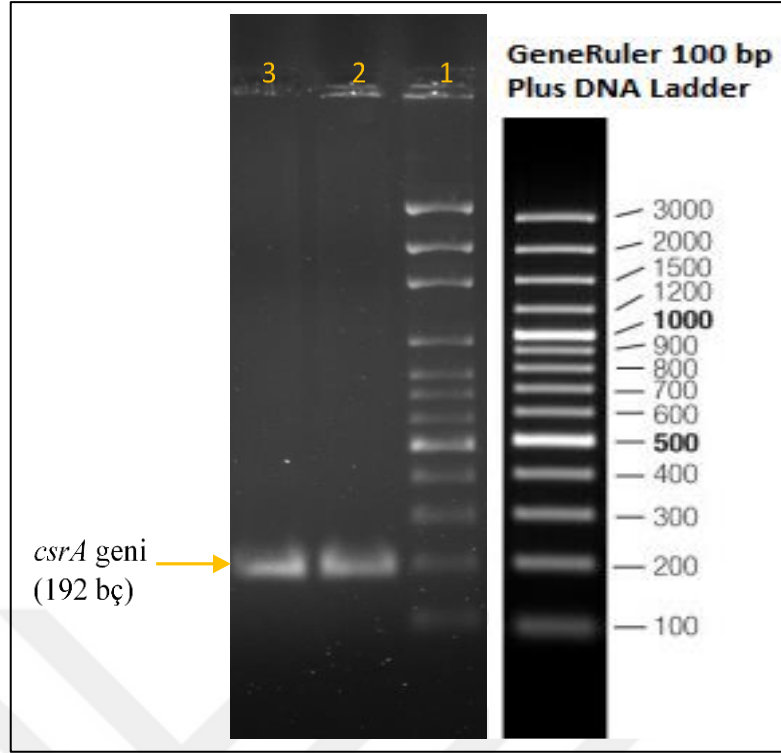
Şekil 5.11. pBAD24 plazmidinin jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 Kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: *S. Typhimurium* MZ1629 suşundan izole edilen pBAD24 plazmidinin doğrusal formunu

5.2.4. RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİM REAKSİYONLARI

Saflaştırılmış *csrA* geni PZR ürünü ve dairesel formda izole edilmiş saf pBAD24 vektöründe, yapışkan uçlar oluşturmak amacıyla EcoRI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. pBAD24 plazmidinin ikili kesimi, 50 bp ve 4492 bp olmak üzere iki kesim ürünü oluşturması beklendi. Ancak, kesim sonucu, % 1'lik agaroz jelde 4,5 kb büyüklüğünde tek bir bant olarak görülürken 50 bp'lik fragment küçük olması nedeniyle jelde görüntülenemedi (Şekil 5.12.). Uç bölgelerinde restriksiyon endonükleaz kesim dizisini içeren *csrA* geni, ikili kesimden sonra agaroz jelde 192 bp olarak görüntülendi (Şekil 5.13.).



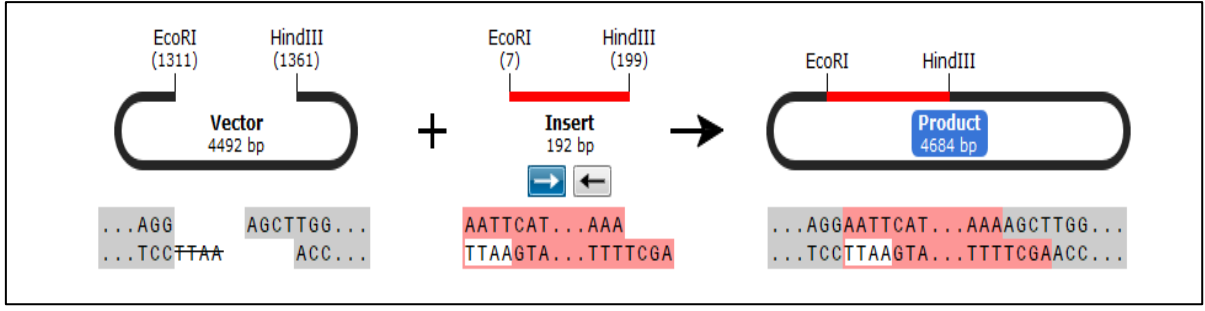
Şekil 5.12. pBAD24 plazmid vektörü ikili restriksiyon endonukleaz enzim kesimi agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: pBAD24 plazmidinin EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesim ürünü



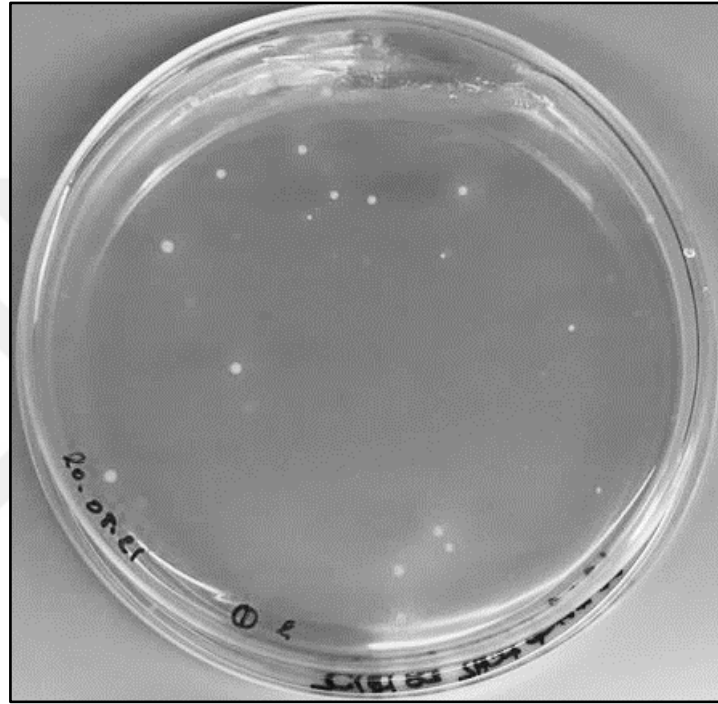
Şekil 5.13. *csrA* geninin ikili restriksiyon endonukleaz enzim kesimi agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1:100 bç DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: *csrA* geninin EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesim ürünü

5.2.5. REKOMBİNANT PLAZMİDİN *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU

Ligasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen rekombinant plazmid (*csrA* genini içeren pBAD24 plazmidi) (Şekil 5.14.), elektroporasyon yöntemi ile elektrokompetan *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* hücrelerine aktarıldı. Transformantlar, çalışmada kullanılan pBAD24 vektörü ampisilin ve *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* suşu kloramfenikol dirençliliği taşıması nedeniyle, kloramfenikol (25 μ g/mL) ve ampisilin (100 μ g/mL) içeren LB agar üzerinde seçildi. Seçici besiyerinin yüzeyinde oluşan kolonilerden (Şekil 5.15.) rastgele seçim yapılarak koloni PZR gerçekleştirildi.

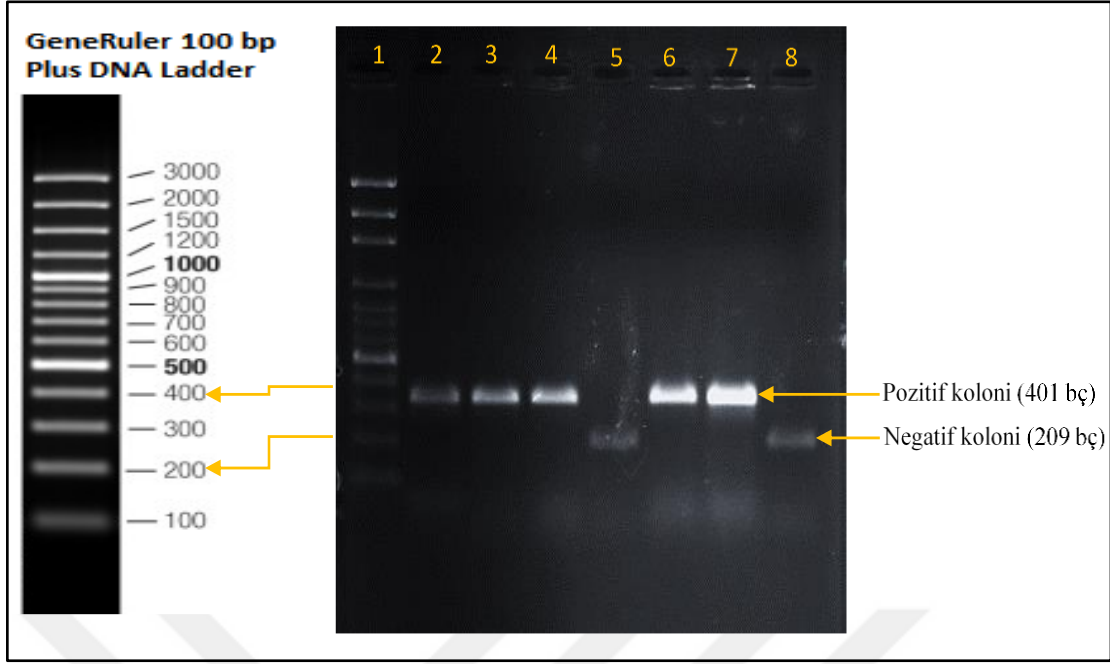


Şekil 5.14. *csrA* PZR ürününün pBAD24 vektörüne insersiyonu ile elde edilen rekombinant plazmid. Rekombinant plazmid, SnapGene 5.3 kullanarak görselleştirildi



Şekil 5.15. *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* suşuna rekombinant plazmidin (*csrA* genini içeren pBAD24 plazmidi) transformasyonu sonucunda oluşan koloniler

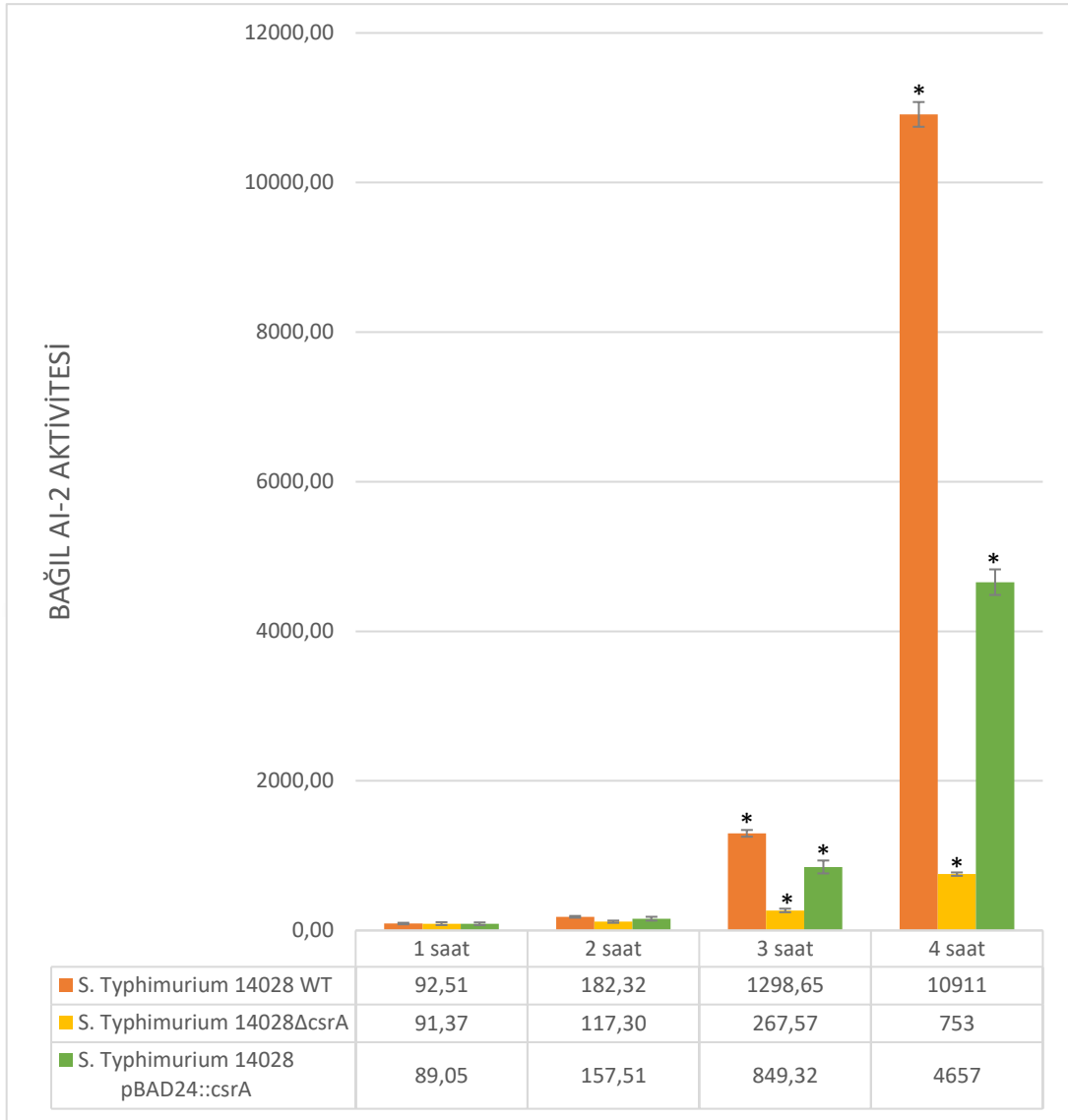
pBAD24 plazmidine özgü primerler kullanılarak koloni PZR gerçekleştirildi. Koloni PZR sonucu, klonlama başarısız ise *csrA* geni içermeyen pBAD24 plazmidlerini amplifiye ederek 209 bp'lik ürünler elde edilir. Ancak klonlama başarılı ise *csrA* geni içeren pBAD24 plazmidlerini amplifiye ederek 401 bp büyüklüğünde ürünler elde edilir. Koloni PZR ürünleri, moleküler büyüklüklerini belirlemek ve pozitif kolonileri seçmek amacıyla agaroz jelde görüntülendi (Şekil 5.16.).



Şekil 5.16. Koloni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 100 bç DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2-4,6,7: transformant (pozitif) kolonilerin PZR ürünü; kuyu 5,8: transformant olmayan (negatif) kolonilerin PZR ürünü

5.3. CsrA REGÜLASYONUNA BAĞLI OLARAK OTOİNDÜKTÖR-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

CsrA'nın *Salmonella*'da QS sinyal molekülü olan AI-2 aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla, doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve *csrA*'nın aşırı ekspresyonunun sağlandığı *S. Typhimurium* suşlarının bağlı AI-2 aktiviteleri, 4 saat inkübasyon ile 4 farklı zaman noktasında (1, 2, 3 ve 4 saat) luminometrik olarak ölçüldü. Raportör suş olan *Vibrio harveyi* BB170'in lüminesans bazlı tepkisi, AI-2 aktivitesini belirlenmesi amacıyla kullanıldı. *V. harveyi* BB170 varlığında suşlardan elde edilen süpernatantları içeren kuyularda ölçülen AI-2 miktarı, yüzde (%) kat değişimi olarak hesaplandı (Şekil 5.17.). Her bir suşun bağlı AI-2 aktivitesinin yüzde (%) kat değişimini hesaplamak için süpernatant içeren kuyulardan alınan okumalar, kontrol kuyularından alınan okumalara oranlandı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar, Student t-testi kullanarak belirlendi ve $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



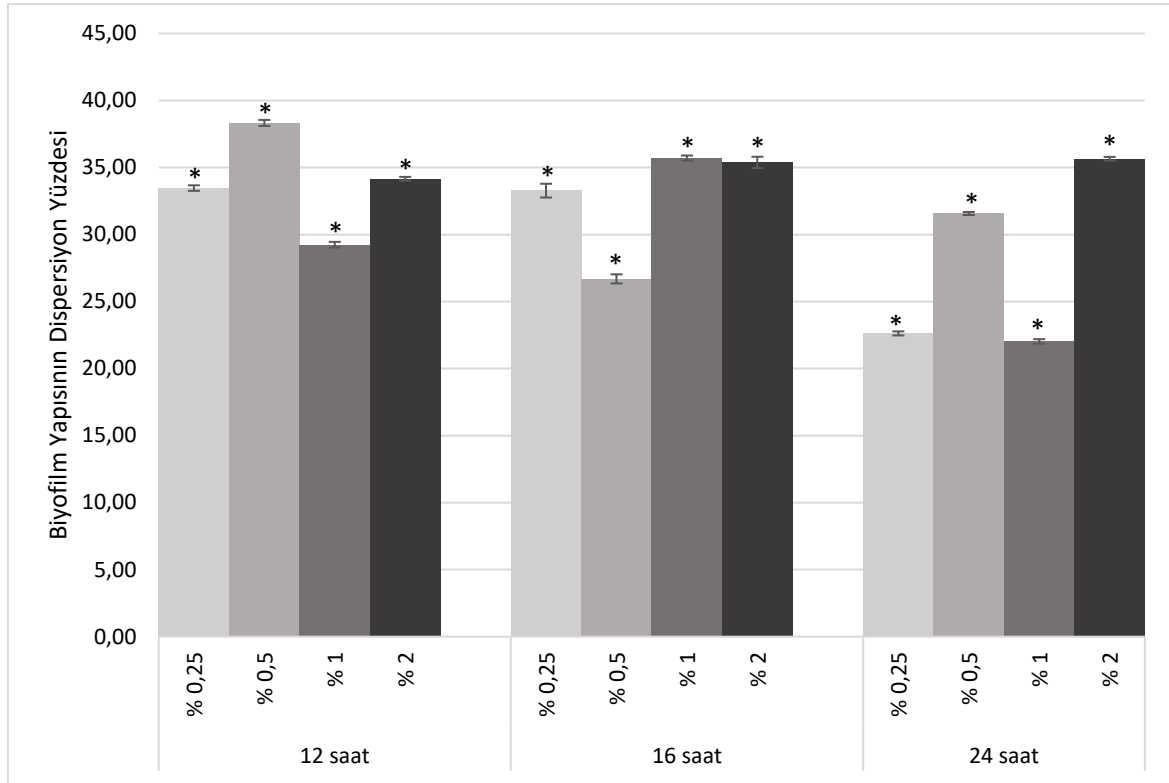
Şekil 5.17. Doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu, *csrA* geni bakımından mutant suş ve *csrA*'nın aşırı ekspresyonunu gerçekleştiren suşların 4 saatlik bağıl AI-2 aktivitesi. Luminometrik ölçümler, *V. harveyi* BB170 raportör suşun 4 saatlik inkübasyonu ile 4 farklı zaman noktalarında (1, 2, 3 ve 4 saat) gerçekleştirildi. Hata çubukları, üç bağımsız tekrara dayalı standart sapmaları göstermektedir ve * sembolü, $p \leq 0.05$, anlamlı fark derecesini temsil etmektedir

İnkübasyonun birinci saatinde, *S. Typhimurium* suşları (doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve *csrA*'yı pBAD24 plazmidinde eksprese eden MN1830 suşları) benzer bir AI-2 aktivitesi gösterdi. İnkübasyonun ikinci saatinden başlayarak, doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşunun AI-2 aktivitesi artmaya başladı. İnkübasyonun üçüncü ve dördüncü saatinden sonra, doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşunda AI-2 aktivitesi önemli ölçüde artış gösterirken ($p \leq 0.05$), *csrA* geni bakımından mutant suşun (*S. Typhimurium* 14028Δ*csrA*), doğal tip suşa kıyasla AI-2 aktivitesinde önemli bir düşüş gözlemlendi ($p \leq 0.05$). İndüklenebilir rekombinant plazmitten (pBAD24*csrA*) *csrA*'nın ektopik ekspresyonu, *csrA* mutasyonunun

etkisini ortadan kaldırarak MN1830 suşta AI-2 aktivitesinde bir artış belirlendi ($p \leq 0.05$). Bu sonuçlara dayanarak, *csrA* mutasyonunun AI-2 aktivitesini negatif olarak etkilediği sonucuna ulaşıldı.

5.4. S. TYPHIMURIUM 14028 SUŞLARIN BİYOFİLM DİSPERSİYONUNU İNDÜKLEYEN OPTİMUM GLUKOZ KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Hem biyofilm oluşumunda inhibitör olarak rol oynadığı hem de CsrA proteininin aktivitesini teşvik ettiği bilinen glukoz molekülünün, *S. Typhimurium* biyofilmlerinin dispersiyonu için gereken optimum konsantrasyonu belirlendi. Polistiren üzerinde 72 saat boyunca 20 °C’de oluşturulan olgun *S. Typhimurium* 14028 suşlarının biyofilm yapısından planktonik hücreler aseptik koşullar altında uzaklaştırıldıktan sonra dört farklı glukoz konsantrasyonuna sahip (% 2, % 1, % 0,5 ve % 0,25) solüsyonlar biyofilm içeren kuyulara aktarıldı ve 20 °C’de 12 saat, 16 saat ve 24 saat inkübasyondan sonra kristal viyole ile boyandı ve biyofilm tabakasına bağlanan boyanın optik yoğunluğu 595 nm dalga boyunda plaka okuyucusunda ölçüldü. Olgun *S. Typhimurium* biyofilm yapısının dispersiyon yüzdesi, glukoz eklenen örnek kuyularından elde edilen okumaların LB broth eklenen kontrol kuyularından elde edilen okumalara oranlanarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.18.’de sütun grafiği halinde görselleştirildi.



Şekil 5.18. Üç farklı inkübasyon süresi (12 saat, 16 saat ve 24 saat) boyunca 4 farklı glukoz konsantrasyonu (% 2, % 1, % 0,5 ve % 0,25) ile muamele edilen *S. Typhimurium* biyofilm yapısının dispersiyon yüzdesi. Hata çubukları, üç bağımsız tekrara dayalı standart sapmaları göstermektedir. * $p \leq 0.05$ sembolü istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir

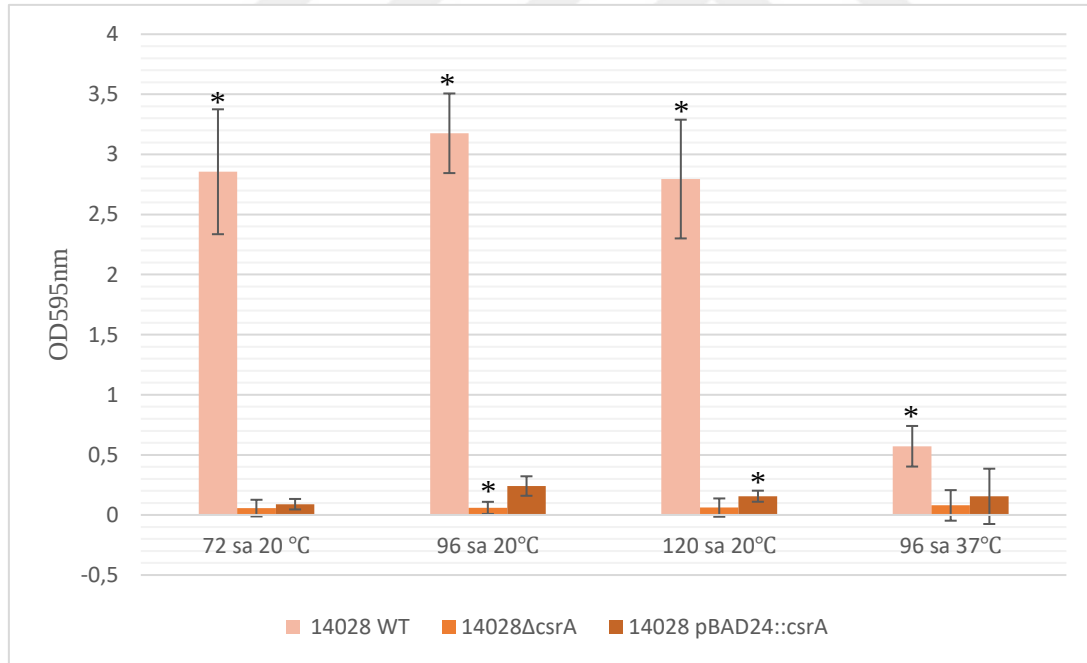
Biyofilm yapısının dispersiyon yüzdesini gösteren grafik incelendiğinde (Şekil 5.18.), 12 saatlik inkübasyon sonucunda % 0,25, % 0,5, % 1 ve % 2 glukoz konsantrasyonlarının *S. Typhimurium* olgun biyofilm yapısının sırasıyla % 33,47, % 38,33, % 29,24 ve % 34,16 oranında dağılımına neden olduğu tespit edildi. 16 saatlik inkübasyon sonucunda ise % 0,25, % 0,5, % 1 ve % 2 glukoz konsantrasyonlarının *S. Typhimurium* olgun biyofilm yapısının sırasıyla % 33,28, % 26,69, % 35,71 ve % 35,38 oranında dağılımına yol açtığı tespit edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra % 0,25, % 0,5, % 1 ve % 2 glukoz konsantrasyonlarının *S. Typhimurium* olgun biyofilm yapısının sırasıyla % 22,63, % 31,57, % 22,03 ve % 35,66 oranında dağılımına neden olduğu gözlemlendi. *S. Typhimurium* 14028 suşunun olgun biyofilm yapısının dispersiyonunu indükleyen en etkili glukoz konsantrasyonu 12 saatlik inkübasyondan sonra % 38,33 oranında biyofilm dispersiyonuna neden olan % 0,5 glukoz olarak belirlendi. Elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p \leq 0.05$).

5.4.1. BİYOFİLM DİSPERSİYONUNU İNDÜKLEYEN OPTİMUM GLUKOZ KONSANTRASYONUNUN *S. TYPHIMURIUM* 14028 Δ *csrA* OLGUN BİYOFİLM ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bir önceki basamakta optimum olduğu belirlenen glukoz konsantrasyonu (% 0,5) kullanılarak, CsrA'nın glukoz ile indüklenen *S. Typhimurium* biyofilm dispersiyonundaki düzenleyici rolünün araştırılması amaçlandı. *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* 14028 suşlarının polistiren üzerinde biyofilm oluşturma amacıyla denemeler gerçekleştirildi. Fakat, *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin de kaybolduğu belirlendi.

5.4.1.1. *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* Suşlarının Biyofilm Üretim Özelliklerinin Belirlenmesi

Doğal tip, MN1830 ve *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşlarının farklı inkübasyon koşullarında mikrodilüsyon plakalarında oluşturduğu biyofilm miktarı Şekil 5.19.'de gösterilmektedir.



Şekil 5.19. Doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve *csrA*'nın aşırı ifade edildiği *S. Typhimurium* suşlarının biyofilm üretim düzeyleri. Grafikte yer alan hata çubukları, üç farklı bağımsız tekrara dayalı standart sapmaları göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0.05$ sembolü olarak gösterildi

Plaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerin ortalaması, negatif kontrol (sadece LB^{-NaCl} içeren kuyular) üzerinde hesaplanan "cut-off" OD (sınır değer, OD_c) ile

karşılaştırılarak suşların ürettikleri biyofilm düzeyleri; "üretici olmayan", "zayıf", "orta" ve "güçlü" olarak sınıflandırıldı. Çizelge 5.1., Çizelge 5.2. ve Çizelge 5.3.'te sırasıyla doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve pBAD24 vektörüne klonlanmış *csrA* genini içeren vektörü taşıyan *S. Typhimurium* suşlarının "cut off" OD değerleri ve OD_{suş} değerleri gösterilmektedir. Çizelge 5.1.'te sunulan verilere göre, test edilen tüm sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde örnek kuyulardan elde edilen OD_{suş} değerlerinin OD_c değerlerinden 4-kat daha yüksek olması nedeniyle doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşu güçlü bir biyofilm üreticisi olarak kabul edildi. Çizelge 5.2. incelendiğinde ise, test edilen tüm sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde OD_c değerlerinin örnek kuyularından elde edilen OD_{suş} değerlerinden daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu nedenle *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* suşunun, biyofilm üreticisi olmadığı anlaşılmaktadır. Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında, *csrA* geninin mutasyonunun *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilm üretim kapasitesini negatif yönde etkilediği düşünülebilir. MN1830 suşunun *csrA* gen ekspresyonunu indükledikten sonra biyofilm üretimi düzeyi incelendiğinde, 20 °C'de 72 saatlik ve 37 °C'de 96 saatlik inkübasyondan sonra zayıf bir biyofilm (OD_c < OD_{suş} ≤ 2xOD_c) ve 20 °C'de 96 saatlik ve 120 saatlik inkübasyondan sonra orta düzeyde bir biyofilm (2xOD_c < OD_{suş} ≤ 4xOD_c) oluşturduğu gözlemlendi (Çizelge 5.3.). Bu sonuçlar, *csrA*'nın aşırı ekspresyonu, *S. Typhimurium*'un biyofilm üretme yeteneğini doğal tip suşun biyofilm üretim seviyesine ulaştırmadığı belirlendi.

Çizelge 5.1. Test edilen sıcaklık ve inkübasyon süreçlerinde doğal tip *S. Typhimurium* 14028 suşun "Cut-off" OD (sınır değer, OD_c) ve OD_{suş} değerleri

İnkübasyon süresi ve sıcaklığı	OD _c değeri	OD _{suş} değeri
72 saat 20 °C	0,0845	2,8555
96 saat 20 °C	0,0777	3,1757
120 saat 20 °C	0,0674	2,7949
96 saat 37 °C	0,0975	0,5714

Çizelge 5.2. Test edilen sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde *S. Typhimurium* 14028 Δ *csrA* suşunun "Cut-off" OD (sınır değer, OD_c) ve OD_{suş} değerleri

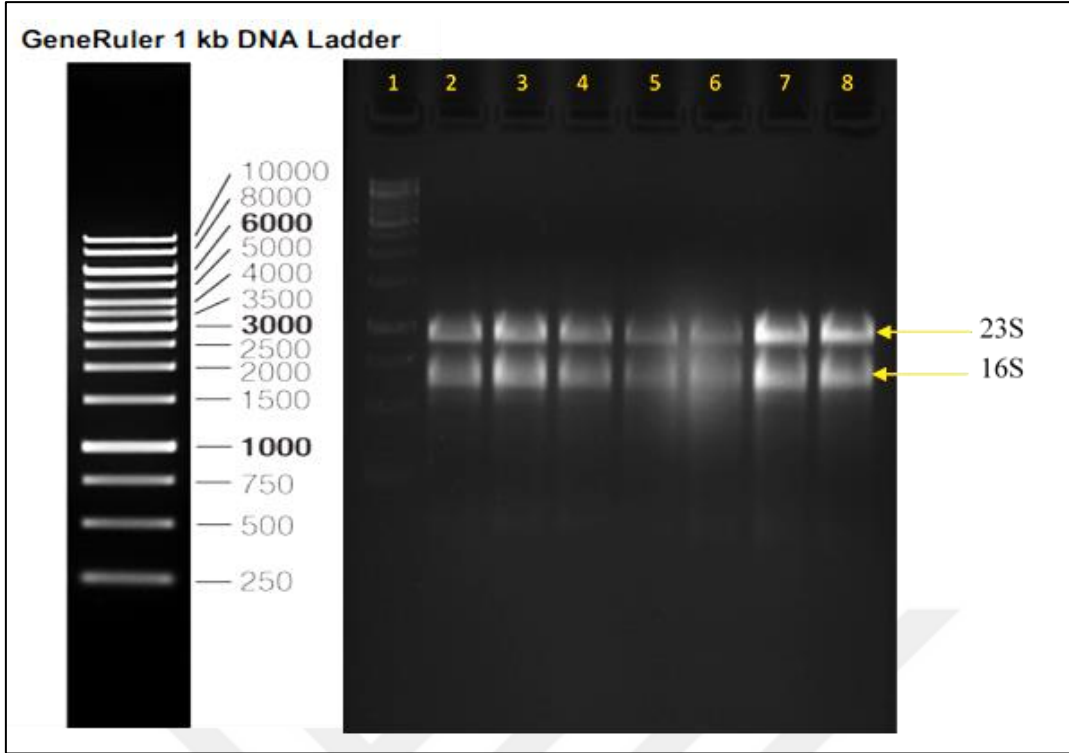
İnkübasyon süresi ve sıcaklığı	OD _c değeri	OD _{suş} değeri
72 saat 20 °C	0,0845	0,0569
96 saat 20 °C	0,0777	0,0586
120 saat 20 °C	0,0674	0,0611
96 saat 37 °C	0,0975	0,0794

Çizelge 5.3. Test edilen sıcaklık ve inkübasyon süreçlerinde MN1830 (pBAD24 vektörüne klonlanmış *csrA* genini içeren vektörü taşıyan *S. Typhimurium* 14028) suşunun "Cut-off" OD (sınır değer, OD_c) ve OD_{suş} değerleri

İnkübasyon süresi ve sıcaklığı	OD _c değeri	OD _{suş} değeri
72 saat 20 °C	0,0845	0,0895
96 saat 20 °C	0,0777	0,2405
120 saat 20 °C	0,0674	0,1558
96 saat 37 °C	0,0975	0,1546

5.5. CsrA’NIN AI-2 SENTEZİNDEN ve HÜCRE İÇİNE ALIMINDAN SORUMLU GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Doğal tip, *csrA* geni bakımından mutant ve *csrA* geni içeren pBAD24 vektörünü taşıyan MN1830 suşlarında *luxS*, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmak amacıyla tüm suşlardan toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Planktonik hücrelerden izole edilen toplam RNA’lar Şekil 5.20.’te verildi. Ancak, çalışmamız kapsamında biyofilm yapısından dağılan hücrelerin toplam RNA’ları elde edilemedi. Bu nedenle, ilgili genlerin ifade düzeyleri yalnızca planktonik hücrelerde araştırıldı.



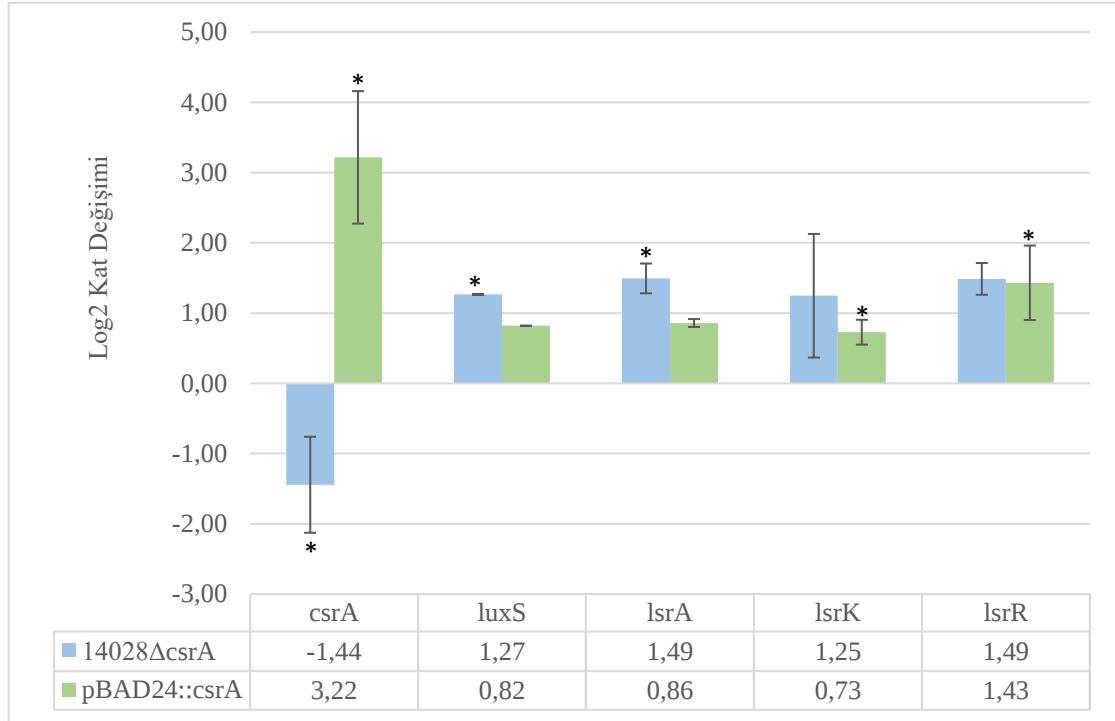
Şekil 5.20. *Salmonella* test gruplarından izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel görüntüsü. Kuyu 1: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD); kuyu 2: *S. Typhimurium* 14028 toplam RNA; kuyu 3: *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* toplam RNA; kuyu 4: MN1830 toplam RNA; kuyu 5: *S. Typhimurium* 14028 + % 0,5 glukoz toplam RNA; kuyu 6: *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* + % 0,5 glukoz toplam RNA; kuyu 7: MN1830 + % 0,5 glukoz toplam RNA; kuyu 8: *S. Typhimurium* 14028Δ*csrA* + % 0,1 L-arabinoz toplam RNA

İzole edilen RNA'ları kullanarak cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra yapılan q-RT-PZR reaksiyonları sonucunda, Livak metodu kullanılarak *csrA* genine bağlı olarak araştırılan genlerin ifade seviyeleri 16S rRNA genine göre normalize edildi. Ardından ifade seviyelerinin doğal tipe göre kat farkı hesaplandı. Elde edilen $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri Çizelge 5.4.'de verildi.

Çizelge 5.4. *Salmonella* suşlarında *csrA* regülasyonuna bağlı olarak araştırılan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı ($2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri)

	<i>csrA</i>	<i>luxS</i>	<i>lsrA</i>	<i>lsrK</i>	<i>lsrR</i>
WT 14028	1	1	1	1	1
14028Δ<i>csrA</i>	0,0359	18,411	31,179	17,661	30,696
pBAD24::<i>csrA</i>	1649,142	6,6001	7,223	5,342	27,002

Araştırılan *Salmonella* suşlarındaki up veya down regüle edilen genleri belirlemek için normalize edilmiş kat farkı verilerine dayanarak logaritma 2 (log2) tabanına göre kat değişimleri belirlendi (Şekil 5.21.).



Şekil 5.21. *csrA* ifadesine bağlı olarak *Salmonella* suşlarında araştırılan genlerin doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. ΔCt değerlerini arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirtmek üzere * $p \leq 0.05$ sembolü kullanıldı.

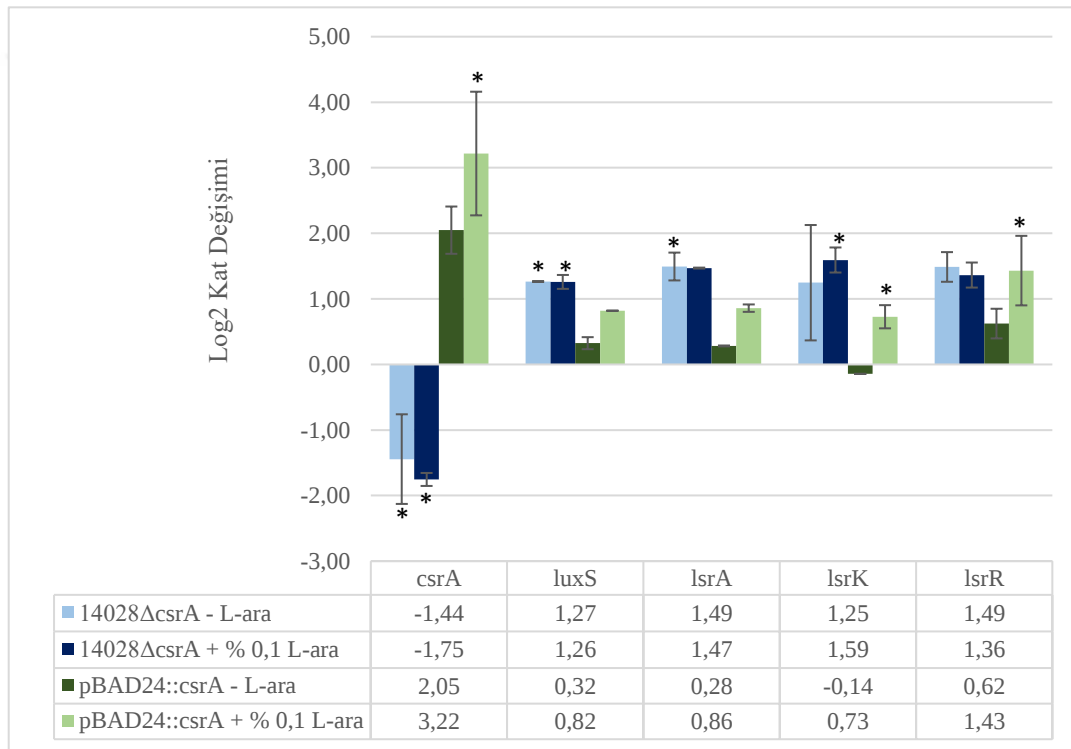
Doğal tip suşa kıyasla, *csrA* genini aşırı ifade eden *Salmonella* suşunda *csrA* ifadesinin artışının (* $p \leq 0.05$) ve *csrA* geni bakımından mutant suşta *csrA* ifadesinin azalmasının (* $p \leq 0.05$) sağlandığı belirlendi (Şekil 5.21.). *csrA* geninin mutasyonu, AI-2 sentezinden sorumlu *luxS* geninin, AI-2 molekülünün hücre içine alımından sorumlu *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyonunun artmasına neden oldu. Ancak *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). *csrA* geninin aşırı ifade edilmesi ise, araştırılan genlerin ekspresyonunun artmasına neden oldu. Ancak *luxS* ve *lsrA* genlerinin ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

MN1830 suşunda *csrA* geninin ifadesi, BAD promotorunun en yüksek düzeyde teşvik edilmesini sağladığını belirlediğimiz % 0,1 oranında L-arabinoz eklenmesi ile indüklendi. Kullanılan arabinoz konsantrasyonunun test gruplarında yer alan genlerin ifadesi üzerindeki

etkisi belirlenmiş olup normalize edilmiş kat farkı verileri Çizelge 5.5.'de gösterildi. Araştırılan genlerin log2 kat değişimleri hesaplanarak Şekil 5.22.'de gösterildi.

Çizelge 5.5. Kullanılan arabinoz konsantrasyonuna bağlı olarak test gruplarında yer alan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı ($2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri)

	<i>csrA</i>	<i>luxS</i>	<i>lsrA</i>	<i>lsrK</i>	<i>lsrR</i>
14028Δ<i>csrA</i> - L-ara	0,0359	18,411	31,179	17,661	30,696
14028Δ<i>csrA</i> + % 0,1 L-ara	0,01761	18,158	29,497	39,192	23,103
pBAD24::<i>csrA</i> - L-ara	111,7528	2,110	1,9152	0,718	4,199
pBAD24::<i>csrA</i> + % 0,1 L-ara	1649,142	6,6001	7,223	5,342	27,002



Şekil 5.22. Arabinoz varlığında ve yokluğunda *Salmonella* test gruplarında ifadesi araştırılan genlerin log2 kat değişim grafiği. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. ΔCt değerlerini arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirtmek üzere $*p \leq 0.05$ sembolü kullanıldı

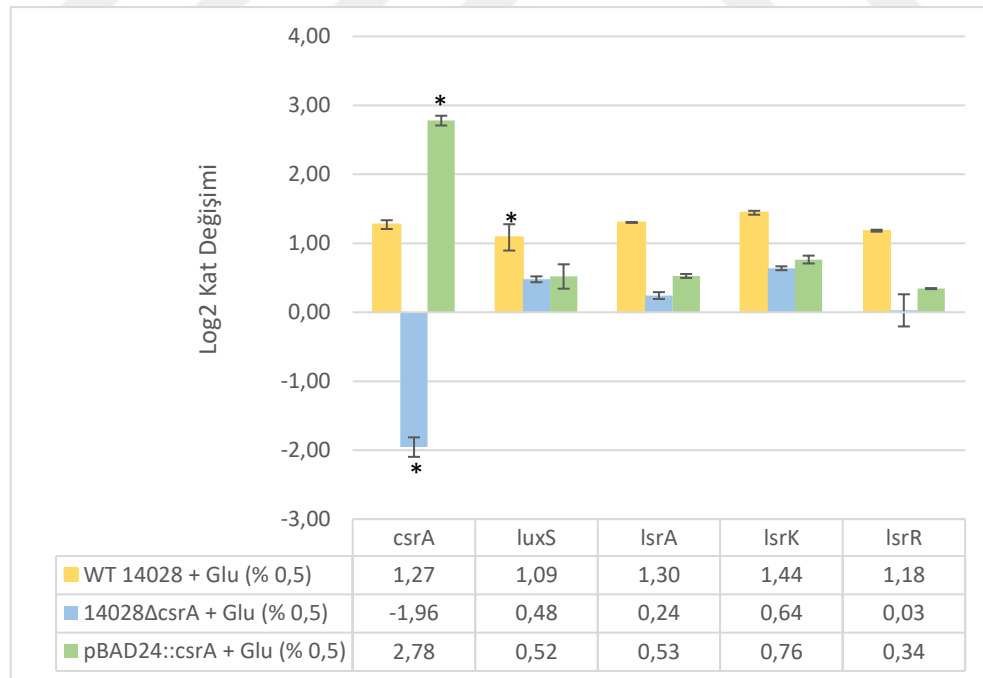
Şekil 5.22., *csrA* geni bakımından mutant *Salmonella* suşundaki genlerin ekspresyon seviyesindeki değişikliğin L-arabinoz ilavesinden etkilenmediğini gösterdi. İndüklenebilir promotor arkasında *csrA* genini over eksprese eden suşta ise, ortama arabinoz eklenmediğinde *csrA*'nın BAD promotor sızıntısından kaynaklı ekspresyonu oldukça düşük olmakla birlikte bu bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Araştırılan diğer genler üzerinde önemli bir etkisi olmadığı tespit edildi. Tüm bu sonuçlara göre,

arabinoz konsantrasyonunun yalnızca *csrA* ekspresyonu üzerinde bir etkisinin olduğu kanıtlandı.

Glukoz ile indüklenen dispersiyonun araştırılması amacıyla *Salmonella* suşlarında, dispersiyon için optimum olan glukoz konsantrasyonuna (% 0,5) ve inkübasyon süresine (12 saat) bağlı olarak *csrA*, *luxS*, *lrrA*, *lrrK* ve *lrrR* genlerinin ifade düzeyleri araştırıldı. 16S rRNA genine göre normalize edilmiş kat farkı verileri Çizelge 5.6.'de verildi. Ardından, araştırılan genlerin log2 kat değişimleri hesaplanarak Şekil 5.23.'de grafiksel olarak gösterildi.

Çizelge 5.6. Dispersiyon için optimum olan glukoz konsantrasyonuna (% 0,5) ve inkübasyon süresine (12 saat) bağlı olarak araştırılan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı ($2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri)

	<i>csrA</i>	<i>luxS</i>	<i>lrrA</i>	<i>lrrK</i>	<i>lrrR</i>
WT 14028 + Glu (% 0,5)	18,668	12,188	20,077	27,713	15,242
14028Δ<i>csrA</i> + Glu (% 0,5)	0,011	3,009	1,746	4,344	1,066
pBAD24::<i>csrA</i> + Glu (% 0,5)	602,228	3,304	3,3616	5,813	2,206



Şekil 5.23. *Salmonella* suşlarında glukozla bağılı olarak dispersiyon için optimum olan koşullarda araştırılan genlerin glukoz eklenmemiş doğal tip suşa kıyasla log2 kat değişim grafiği. Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. ΔCt değerleri arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirtmek üzere $*p \leq 0.05$ sembolü kullanıldı

Şekil 5.23.'de, glukoz molekülünün hem *csrA* geninin ekspresyonu hem de QS sinyalizasyonunu sağlayan AI-2 moleküllerinin sentezinden ve hücre içine alımından sorumlu genlerin ekspresyonu üzerinde pozitif etkilediği gösterildi, ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Salmonella Typhimurium biyofilm yapılarının sağlık ve endüstriyel ortamlarda neden olduğu hasarların ciddiyeti ve bu yapılar ile mücadeleden kaynaklı yüksek maliyetler göz önüne alındığında, patojenik biyofilm oluşturan bakterilere karşı yeni etkili yaklaşımlar geliştirme ihtiyacı acil bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (11). Biyofilm dağılımının indüklenmesi, biyofilm yapısından dağılan hücrelerin ve kalan biyofilm hücrelerinin daha savunmasız hale geçişi sonucunu doğurmaktadır. Bu tespit, antimikrobiyallerin terapötik etkisini artırarak biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarla mücadele için potansiyel bir yaklaşımdır (13, 99). Biyofilm yapısının dispersiyon sürecinde rol alan regülasyon basamakları aydınlatmak, dispersiyona dayalı yeni anti-biyofilm stratejilerin geliştirilmesi için bilgi birikimi sağlayacaktır. Aktif biyofilm dağılımı; besin yokluğu veya bolluğu gibi çeşitli çevresel değişikliklerin, farklı global düzenleyici proteinlerin ve hücresel sinyal yollarının da dahil olduğu çok karmaşık bir süreçtir (71). Bu tez çalışmasında, *S. Typhimurium* biyofilm dağılımında yer alan global karbon depolama düzenleyicisi olan CsrA'nın (15), Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasındaki evrensel iletişim sinyal molekülü olan AI-2'nin (18) sentezi ve hücre içine alımı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu etkinin, *S. Typhimurium* biyofilm oluşumunda inhibitör rol oynayan CsrA proteininin aktivitesini teşvik ettiği bilinen glukoz molekülünün varlığında değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, *csrA* açık okuma çerçevesinin (ORF) silinmesi ve bunun yerine kloramfenikol direnç gen kaseti insersiyonu ile *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşu oluşturulmuştur. Mutant suş tarafından sergilenen en belirgin fenotip, doğal tipe kıyasla, üremenin gecikmesidir. Bu gözlem, literatür verileri ile uyumluluk göstermektedir. *E. coli* suşlarının aksine, *csrA* mutasyonunun *S. Typhimurium*'un üremesini olumsuz etkilediği yönündeki bilgiler literatürde mevcuttur (84, 129). Bu durumun iki olası açıklaması olabilir. İlk açıklamada, *csrA*'nın kontrolüne giren başka genlerin olduğu ve bu genlerin *csrA* mutasyonu sonucu uygun olmayan ekspresyonunun üremeyi baskıladığı öne sürülmüştür. İkinci olarak, baskılayıcı mutasyonların birikiminin bu üreme gecikmesine neden olabileceği da önerilmiştir. Bu öneri, *csrA* mutantlarının farklı biyolojik replikalarının üreme hızı açısından büyük farklılıklar gösterdiğinin belirlenmesine dayandırılmıştır (129). Teplitski vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, bölge dışı (off-site) mutasyonlarının birikmesine neden olmadan *csrA* mutasyonu taklit edilmeye

çalışılmıştır. Bu amaçla, *csrB* veya *csrC* genleri, CsrA fonksiyonunu inhibe etmek için *Salmonella*'da rekombinant plazmitten aşırı eksprese edilmiştir. Ancak, *csrB* veya *csrC* genlerini aşırı eksprese eden *S. Typhimurium* suşları, *csrA* mutantlarına benzer şekilde doğal tipe kıyasla çok daha yavaş üreme göstermiştir. Bu sonuç, *csrA*'nın *Salmonella* üremesi için gerekli olan bazı genlerin ekspresyonunu düzenleyebileceği yönündeki ilk öneriyi desteklemektedir (86). Bu çalışmada *csrA* geni bakımından mutant suşlar ile gerçekleştirdiğimiz denemelerde, doğal tip ile mutant suş arasındaki biyofilm oluşum seviyesi, AI-2 aktivitesi ve gen ekspresyon seviyesindeki farklılıkların *csrA*'dan ziyade üreme hızı farklılıklarından kaynaklanma olasılığını ortadan kaldırmak için, öncelikle OD₆₀₀ optimizasyonları gerçekleştirilmiştir.

CsrA regülasyonunun AI-2 molekülü üzerindeki etkisini glukozla indüklenen *S. Typhimurium* biyofilm dispersiyonu esnasında incelemek için, *S. Typhimurium* biyofilm dispersiyonu için optimum glukoz molekülünün konsantrasyonu belirlenmiştir. Leng vd. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, glukoz varlığı CsrB/C'nin degradasyonuna yol açarak CsrA seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada CsrA seviyesindeki artışın da hücre hareketliliğinin artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (16). Ancak ne bu çalışmada, ne de diğer literatür kaynaklarında *S. Typhimurium* biyofilm dispersiyonun indüklenmesinde etkin optimum glukoz konsantrasyonuna dair bir veri yer almamaktadır. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen dispersiyon denemelerinin sonucunda, *S. Typhimurium* 14028 suşunun olgun biyofilm yapısının dispersiyonunu indükleyen en etkili glukoz konsantrasyonu; 12 saatlik inkübasyondan sonra % 38,33 oranında biyofilm dispersiyonunu sağlayan % 0,5 glukoz olarak belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Glukozun *Salmonella* biyofilmlerini inhibe ettiği literatürde farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Bialucha vd. (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, polistiren yüzey üzerinde *S. enterica*'nın klinik suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği üzerinde glukozun etkisi değerlendirilmiştir. İncelenen suşların çoğunun, glukoz içermeyen ortama göre % 0,5 konsantrasyonda glukoz ilave edilen ortamda daha zayıf biyofilm oluşturduğu ve % 1,0 ve % 2,0 glukoz içeren ortamlarda biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir (136). Bu sonuçlar % 0,5 glukozun hem *S. Enterica*'nın biyofilm oluşumunu engellediği hem de olgun biyofilmlerini dağıttığı yönündeki bulgularımızı desteklemektedir. Jackson vd. (2002), *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* ve *S. Typhimurium* üreme ortamlarında % 0,2 konsantrasyonda glukoz varlığının 24 saat inkübasyon süresi sonucunda biyofilm oluşumunu önemli ölçüde düşürdüğünü belirlemişlerdir (137). Benzer şekilde, Roy vd. (2021), *Salmonella enterica* serotip

Kentucky'nin biyofilm oluşumu üzerine % 0,025, % 0,05 ve % 0,4 glukoz ilavesinin etkisini araştırmış ve biyofilm oluşumunun % 0,025 glukoz eklenmesiyle indüklendiğini ancak % 0,4 glukoz içeren ortamlarda inhibe edildiğini göstermişlerlerdir (138). Ayrıca glukozun, diğer bazı bakteri türlerinde biyofilm dağılımına neden olduğu da tanımlanmıştır. Sauer vd. (2004), 20 mM glukoz ilavesinin *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biyofilmlerinin % 54'ünün dağılmasına yol açtığını bildirmişlerdir (139). Marks vd. (2013), epitel hücrelerinde ve farelerin nazofarenksinde *in vivo* olarak oluşturulan 48 saatlik *Streptococcus pneumoniae* biyofilmine 1 M glukozun eklenmesinin, yüzeye bağlı biyofilm topluluklarının dağılımına neden olduğunu saptamıştır (140).

Çalışmamızda, ön denemelerle belirlediğimiz optimum glukoz dispersiyon konsantrasyonunda (% 0,5), CsrA'nın glukoz ile indüklenen *S. Typhimurium* biyofilm dispersiyonundaki düzenleyici rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Fakat, *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium* suşlarının test edilen koşullarda biyofilm oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu bulgu, literatür verileri ile zıtlık göstermektedir. Teplitski vd. (2006), *S. Typhimurium* *csrA* geni bakımından mutant suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini araştırmaya başladıklarında öngörüler, söz konusu mutantlarda biyofilm üretme yeteneğinin önemli ölçüde artacağı yönündeydi (86). Tahminlerinin arkasındaki nedenler ise, CsrA'nın flagella regülunu olan FlhDC'nin ana aktivatörü olması yanında, *S. Typhimurium* suşlarının hareketliliğini artırması ve biyofilm oluşumunu engellemesi gibi literatür verilerine dayanmakaydı (15). Bu nedenle, *csrA* bakımından mutant suşun, *flhDC* mutantlarına ve *E. coli* *csrA* mutantlarına benzer bir fenotip (141) olan daha güçlü biyofilmler oluşturacağı beklenmişti. Ancak Teplitski vd. (2006), şaşırtıcı bir şekilde *csrA* mutant suşun biyofilm oluşum seviyesi açısından doğal tipe benzer olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu sonuçların *S. Typhimurium* suşlarında *csrA* mutasyonunun neden olduğu üreme gecikmesiyle bağlantılı olmadığını saptamışlardır (86). Bizim sonuçlarımız, *csrA* mutasyonunun test edilen koşullarda *S. Typhimurium* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini olumsuz etkilediğine işaret etmiştir. Bu sonuç, düzenleyici biyofilm oluşumu ağının karmaşıklığı ile açıklanabilir. Sterzenbach vd. (2013), CsrA'nın, *pefACDEF* transkriptinin 5'-UTR'sine bağlanarak plazmit kodlu fimbriya (Pef) ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediğini ve bu transkripte *csrA* bağlanmasının, CsrA'nın aktivitesini antagonize eden CsrB ve CsrC sRNA'ları tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir (142). Ayrıca, Ledeböer vd. (2006), Pef üretemeyen *S. Typhimurium* mutantlarının plastik yüzey üzerinde biyofilm oluşturamadıklarını ve Hep-2 doku kültürü hücrelerinde ve tavuk bağırsak epitel

hücrelerinde daha zayıf biyofilmler oluşturduklarını belirlemişlerdir (143). Bu veriler dikkate alındığında; çalışmamızda saptadığımız *S. Typhimurium*'un *csrA* mutantlarında biyofilm oluşturma yeteneğinin kaybının, bu genin (*csrA*) aynı zamanda biyofilm oluşumu için gerekli olan bu Pef fimbriyaların ekspresyonunun pozitif regülatörü olduğu gerçeği ile açıklanması mümkündür. Ancak çalışmamızda, *csrA* gen ekspresyonu indüklendikten sonra, suşların zayıf ila orta derecede bir biyofilm oluşturduğunun belirlenmesi, *csrA* geni bakımından mutant *S. Typhimurium*'un biyofilm oluşturma yeteneğinin kaybının sadece *csrA* ile bağlantılı olmayabileceği ve diğer düzenleyicilerin bu sürece dahil olabileceğine işaret etmektedir. Nitekim *csrA* mutasyonunun *S. Typhimurium* genomunda baskılayıcı birikimine yol açtığı da bilinmektedir (129). Bu nedenle, rastgele meydana gelen bu baskılayıcılardan birinin *csrA* mutantlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin kaybına neden olduğu ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır .

Çalışmamızın diğer aşamasında, CsrA'nın *Salmonella*'da QS sinyal molekülü olan AI-2 aktivitesi üzerindeki etkisi, raportör suş olan *Vibrio harveyi* BB170'in lüminesans bazlı tepkisi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, orta-eksponansiyel üreme fazında (3 saatlik inkübasyondan sonra), doğal tip *S. Typhimurium*'da hücre dışı AI-2 aktivitesinin, *csrA* geni bakımından mutant suşa göre daha yüksek olduğu ve *csrA* mutasyonunun, AI-2'nin hücre dışı birikimini önemli ölçüde azalttığı ($p \leq 0.05$) belirlenmiştir. Bu azalma, indüklenebilir rekombinant plazmitten (pBAD24+*csrA*) *csrA*'nın ektopik ekspresyonu ile tamamlanmıştır ($p \leq 0.05$). Sonuçlar, Mitra vd. (2016) tarafından *E. coli*'de metabolik sinyallerin AI-2 üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladıkları çalışmanın sonuçlarıyla tutarlı değildir. Bahsedilen çalışmada, CsrA'nın hücre dışı AI-2 birikimini negatif olarak düzenlediği ileri sürülmüştür (144). Fakat, bu etki, orta-eksponansiyel üreme fazında hücre dışı AI-2 aktivitesi üzerinde CsrA'nın pozitif bir etkisi olduğunu gösteren sonuçlarımızın aksine, durağan fazın girişinde tanımlanmıştır. CsrA'nın hücre dışı AI-2 aktivitesi üzerindeki bu olumlu etkisi, AI-2 sentezinin pozitif düzenlenmesi veya AI-2'nin hücre dışı birikimine neden olan hücrelerde AI-2 alımının negatif düzenlenmesi ile açıklanabilir. Bu sonuçları açıklamak için, *csrA*'nın AI-2 sentezinden sorumlu olan *luxS* geni ve AI-2 hücre içine alımında rol alan *lsrA*, *lsrK*, ve *lsrR* genlerinin ekspresyon seviyelerinin üzerindeki etkisi araştırılmıştır. ATP bağlayıcı kaset (ABC) olan Lsr taşıyıcı aracılığıyla AI-2 molekülü bakterilere aktarılabilir. *lsrA*, AI-2 taşıyıcısının bileşenlerini kodlarken, *lsrK* geni, Lsr taşıyıcısı yoluyla içe aktarıldıktan sonra AI-2'yi fosforile eden bir sitoplazmik kinazı kodlar. *lsrR* ise, *lsr* transkripsiyonunun bir baskılayıcısıdır. Özetle, *lsrA* ve *lsrK*, AI-

2'nin hücre içine alımını olumlu yönde etkilerken, *lsrR*, AI-2'nin alımını olumsuz yönde etkiler. Ek olarak, Fosfo-AI-2, LsrR proteinini inaktive ederek *lsr* operonunun transkripsiyonunu indükler (21). Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz qRT-PZR denemelerinin sonuçları, *csrA* geninin mutasyonunun, *luxS*, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ekspresyonunun artmasına neden olduğunu göstermiştir. Buna göre, *csrA* mutasyonunun AI-2 sentezi üzerinde olumlu bir etkisi olduğu ileri sürülebilir, ancak kanımızca *csrA* mutasyonunun AI-2 alımı üzerindeki etkisi daha karmaşık bir yolla gerçekleşmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan hareketle bu etkiyi açıklayan yeni bir regülasyon modeli öneriyoruz. Bu modele göre; *csrA* mutasyonu, *lsrA* genini up-regüle ederek, *lsr* operonunun ifadesinin artmasına neden olmakta ve hücreye daha fazla AI-2 transfer edilmesine yol açmaktadır. *lsrK*'nin up-regülasyonu, doğal olarak AI-2 fosforilasyonunu artırmakta ve fosfo-AI-2'nin, LsrR'ye bağlanarak onu etkisiz hale getirmek suretiyle *lsrR*'nin up-regülasyonunu kompanse etmektedir. Sonuç olarak, önerilen bu regülasyon modeline göre *csrA* mutasyonunun hücre içine AI-2 taşınması üzerinde olumlu bir etkisi olabilir. Bu öneri, biyoluminesans denemelerinden elde edilen sonuçları destekleyebilir ve şu şekilde açıklanabilir: *csrA* mutasyonunun AI-2 sentezi üzerindeki olumlu etkisi, hücre içine alımı üzerindeki olumlu etki ile kompanse edilebilir ve bu da *csrA* mutantında hücre dışı AI-2 seviyesinde azalmaya yol açabilir.

Diğer yandan çalışmamızda, *csrA* geninin aşırı ifade edilmesinin, araştırılan genlerin ekspresyonunun umulmayan bir şekilde artmasına neden olmuştur. Bu durumda ikinci bir regülasyon modeli önerilmesi gereksinimi doğmuştur. Buna göre; öncelikle *csrA*, *luxS* genini up-regüle ederek, AI-2 sentezini pozitif olarak düzenlemektedir. Öte yandan, *lsrA* geninin *csrA* tarafından up-regülasyonu, *lsr* taşıyıcısının ekspresyonunun artmasına neden olmakta ve AI-2 hücreye aktarılmaktadır. Sonuçta *lsrK*'nin up-regülasyonu tetiklenmekte ve AI-2 fosforilasyonu artmaktadır. Bununla birlikte, bu modelde, *lsrR*'nin up-regülasyonu, fosfo-AI-2 miktarına erişemez ve LsrR seviyesi, *lsr* operonuna bağlanarak onu baskılamak için yeterince yüksek olabilir. Bu model *csrA*'nın AI-2'nin hücrelere taşınması üzerinde olumsuz bir etki göstererek AI-2'nin hücrelere alımını azalttığı yönündeki görüşümüzü açıklamada en güçlü yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bu öneri, biyoluminesans deneylerinden elde edilen sonuçları da anlamlı hale getirmektedir. Buna göre, *csrA*'nın AI-2 sentezi üzerindeki olumlu, ancak hücre içine alımı üzerindeki olumsuz etkileri, hücre dışı AI-2 seviyesinin artmasına neden olabilmektedir. Özetle her iki regülasyon modelinde de, CsrA'nın AI-2

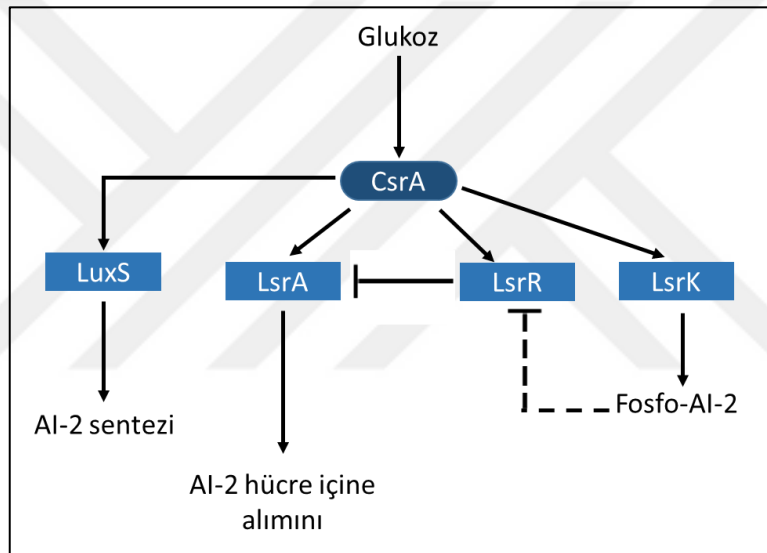
sentezini pozitif olarak ve AI-2'nin hücreye taşınmasını negatif olarak düzenleyebileceğini önermekteyiz.

Leng vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, glukoz varlığının membran taşıyıcılarına bağlanan EIIA^{Glc}'nin defosforilasyonuna yol açtığı saptanmıştır. Defosforile olan EIIA^{Glc} daha sonra CsrD'nin EAL bölgesine bağlanmakta ve RNaz E aracılığıyla CsrB/C'yi degrade ederek serbest CsrA seviyesini artırmaktadır (16). Bu tez çalışmasında, *Salmonella* suşlarında glukoz ile indüklenebilir biyofilm dağılma koşullarında (% 0,5 glukoz konsantrasyonu ve 12 saat inkübasyon süresi) *csrA*'nın AI-2 düzenlenmesinde glukozun rolünün belirlenmesi hedeflemiştir. Dispersiyon için optimum olan glukoz konsantrasyonuna (% 0,5) ve inkübasyon süresine (12 saat) bağlı olarak *csrA*, *luxS*, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerinin ifade düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Leng vd. (2015) tarafından önerilen ve glukozun serbest CsrA'nın artışına yol açtığını öne süren modele (16) dayanarak glukozun *csrA* gen ekspresyonu üzerindeki pozitif etkisi beklenmiştir. Ancak, sonuçlarımızla tutarsız bir şekilde, Jackson vd. (2002), glukozun CsrA tarafından indüklenen biyofilm dağılımını *E. coli*'de bloke ettiğini bildirmişlerdir (14). CsrA regülasyonundaki bu farklılık, *Salmonella* ve *E. coli* arasındaki *csrA* düzenlemesinde saptanan farklılığa bağlı olabilir. Lowhon vd. (2003), CsrA homologlarının *S. Typhimurium*'da bulunduğunu fakat *S. Typhimurium*'da düzenlediği işlevlerin birçoğunun *E. coli*'de mevcut olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, *Salmonella*'da *csrA* geninin, glikojen biyosentezinde *E. coli* ile özdeş bir rol oynamadığı ve karbon metabolizması üzerindeki etkisinin daha az belirgin olduğu bilinmektedir (84). Üstelik, Jonas ve vd. (2010) tarafından *Salmonella*'da Csr ve c-di-GMP sinyalizasyonu arasındaki bağlantının, *E. coli*'den önemli ölçüde farklılık gösterdiğini saptamıştır (15).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, % 0,5 konsantrasyondaki glukozun *luxS*, *lsrA*, *lsrK* ve *lsrR* genlerini pozitif olarak regüle ettiğini göstermektedir. Jesudhasan vd. (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da, *S. Typhimurium*'da % 0.5 konsantrasyondaki glukoz varlığında, hücre dışı AI-2 seviyesinin arttığı ve glukoz yokluğunda ise azaldığı ileri sürülmüştür (22). Bu literatür verisi ve bizim sonuçlarımız birlikte ele alındığında, glukozun da; AI-2'nin hücre içine alınması üzerine CsrA'nın olumsuz etkisini açıklamak için önerdiğimiz ikinci düzenleme modeline uygun rol oynadığını söylemek olasıdır. Kısaca glukoz, *luxS* genini up-regüle ederek AI-2 sentezinin artışına ve hücre dışı ortama salgılanmasına ve *lsr* taşıyıcısının ekspresyonunun artmasına ve hücreye AI-2 taşınmasının artmasına yol çmaktadır. *lsrK*'nin up-regülasyonu ise AI-2 fosforilasyonunun artışını

tetiklemektedir. Bununla birlikte, *lsrR*'nin up-regülasyonu, fosfo-AI-2 miktarından daha fazla olduğu için, bu yüksek LsrR seviyesi, *lsr* transkripsiyonunu baskılamaktadır. Bu modele göre hücre içine alınan AI-2 miktarı azalır ve glukoz, AI-2'nin hücre dışı seviyesinde artışına neden olur. Bu açıklama ile uygun bir şekilde, *E. coli*'de bulunan cAMP'nin, *lsr* transkripsiyonunu aktive ederek hücre dışı AI-2 seviyesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Glukoz yokluğunda ise cAMP seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (89).

Tüm bu sonuçları ve önerilen modelleri bir araya getirdiğimizde (Şekil 6.1.); glukozun *csrA* ekspresyonunu aktive ettiği, *csrA* geninin *luxS* genini up-regüle ederek AI-2 sentezini pozitif olarak, ve *lsr* regülasyonu yoluyla hücre içine AI-2 taşınmasını negatif olarak regüle ettiği, ilk kez bu tez çalışmasının sonuçlarına dayanılarak önerilmektedir.



Şekil 6.1. Bu çalışmada önerilen *S. Typhimurium*'da glukoz molekülü, CsrA ve AI-2 molekülleri kapsayan regülasyon modeli. Glukoz, *csrA* genini up-regüle eder. *csrA*, *luxS* genini up-regüle ederek AI-2 sentezinin artışına ve hücre dışı ortama salgılanmasına neden olur. *lsrA* geninin *csrA* tarafından up-regülasyonu, *lsr* taşıyıcısının ekspresyonunun artmasına neden olmakta ve AI-2 hücre içine alınmaktadır. *lsrK*'nin up-regülasyonu ise AI-2 fosforilasyonunun artışını tetiklemektedir. Fakat, *lsrR*'nin up-regülasyonu, fosfo-AI-2 miktarına erişemez (Kesikli ok ile gösterildi) ve yüksek LsrR seviyesi, *lsr* transkripsiyonunu baskılamaktadır. Oklar, pozitif regülasyonu ve düz başlı oklar negatif regülasyonu temsil etmektedir

Daha önce bahsedildiği üzere, *flhDC*'nin pozitif düzenlenmesi yoluyla flagella biyosentezinin bir aktivatörü olmasının yanı sıra, CsrA, c-di-GMP seviyelerini ve dolayısıyla *S. Typhimurium*'daki biyofilm dağılmasını da regüle etmektedir (15). Jonas vd. (2010), *S. Typhimurium*'da *csrA*'nın mutasyonunun, GGDEF ve/veya EAL bölgelerini içeren bazı proteinlerin mRNA seviyelerinin değişmesine neden olduğunu saptamıştır (15). Öte yandan, Jesudhasan vd. (2010), *S. Typhimurium*'da *luxS* geni ve AI-2 molekülünün

flhDC dahil olmak üzere motilite genlerinin ekspresyonunu negatif olarak düzenlediğini göstermiştir. Aynı çalışmada, *luxS* mutantlarının hem glukoz varlığında hem de yokluğunda biyofilm oluşturmadağı da saptanmıştır. Araştırmacılar bu verileri esas alarak, *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumu için AI-2'nin gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir (22). Sonuç olarak, CsrA ve AI-2, motiliteyi ve biyofilm oluşumunu farklı şekilde düzenlemektedir.

İlk çalışmalar, AI-2'nin hücre içine alımının, bakterilerde AI-2 kontrolü altındaki fenotipleri sonlandırmak için bir mekanizma olarak ve/veya AI-2 sinyali farklı bir sitoplazmik sinyale dönüştürmek için kullanılabileceğini öne sürmüştür (21). Fakat, son zamanlarda AI-2 taşıma sisteminin rolü daha detaylı bir şekilde aydınlatılmaya başlanmıştır. Gonzalez Barrios vd. (2006) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, AI-2 ilavesinin *E. coli*'de hem biyofilm kütlelerini hem de kalınlığını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. AI-2'nin biyofilm oluşumu üzerindeki bu olumlu etkisi, AI-2'nin *lrrK* geni bakımından mutant suşlarda biyofilm oluşumu indüklenmediğinden, doğrudan taşınmasıyla ilişkilendirilmiştir. *E. coli*'de biyofilm oluşumunu indüklemek için Lrr tarafından AI-2 taşınmasının gerekli olduğunun belirlenmesi bu tespiti doğrulamaktadır (145). Choi vd. (2012), *S. Typhimurium*'da, LrrR'nin SPI-1 ve flagellar gen ekspresyonlarını negatif olarak kontrol ettiğini ve dolayısıyla *Salmonella*'nın epitel hücrelerine invazyonunun bozulmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, *S. Typhimurium*'da da AI-2'nin hücre içine Lrr aracılı taşınmasının, genlerin AI-2 düzenlenmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (146).

Sonuç olarak, AI-2 tarafından genlerin uygun şekilde düzenlenmesinin, AI-2'nin hücreye alınmasını gerektirmesi ve CsrA ve AI-2'nin biyofilm oluşumunu ve hareketliliğini *S. Typhimurium*'da zıt şekillerde düzenlemesi, CsrA'nın AI-2'nin hücre içine alımını neden negatif olarak düzenleyebileceğini açıklamaktadır. Bu bulgu, *Salmonella*'nın biyofilm yapılarına karşı yeni mücadele stratejilerinin tasarımına ve yeni hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabileceği için çok önemlidir. Daha ileri çalışmalarda, *lrrR* ve *lrrK* genleri bakımından mutant *Salmonella* suşları kullanılarak CsrA'nın AI-2'nin hücre içine alımı üzerindeki etkisi incelenebilir. Aynı zamanda mikrodizin analizleri kullanılarak AI-2 taşınmasının biyofilm dağılımına etkisinin araştırılmasını önermekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22. doi: 10.1126/science.284.5418.1318. PubMed PMID: 10334980.
2. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108. doi: 10.1038/nrmicro821. PubMed PMID: 15040259.
3. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79. Epub 2000/10/06. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49. PubMed PMID: 11018124.
4. Davey ME, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):847-67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000. PubMed PMID: 11104821; PubMed Central PMCID: PMC99016.
5. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063. PubMed PMID: 12194761; PubMed Central PMCID: PMC2732559.
6. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9(1):34-9. Epub 2001/02/13. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2. PubMed PMID: 11166241.
7. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PubMed PMID: 11932229; PubMed Central PMCID: PMC118068.
8. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114-22. doi: 10.1038/nrd1008. PubMed PMID: 12563302.
9. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001;64(3):367-72. Epub 2001/04/11. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00466-9. PubMed PMID: 11294359.

10. Galie S, Garcia-Gutierrez C, Miguelez EM, Villar CJ, Lombo F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol.* 2018;9:898. Epub 20180507. doi: 10.3389/fmicb.2018.00898. PubMed PMID: 29867809; PubMed Central PMCID: PMC5949339.
11. Fabrega A, Vila J. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):308-41. doi: 10.1128/CMR.00066-12. PubMed PMID: 23554419; PubMed Central PMCID: PMC3623383.
12. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms.* 2017;5(2). Epub 20170401. doi: 10.3390/microorganisms5020015. PubMed PMID: 28368320; PubMed Central PMCID: PMC5488086.
13. Wille J, Coenye T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm.* 2020;2:100027. Epub 20200601. doi: 10.1016/j.biofilm.2020.100027. PubMed PMID: 33447812; PubMed Central PMCID: PMC7798462.
14. Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2002;184(1):290-301. doi: 10.1128/JB.184.1.290-301.2002. PubMed PMID: 11741870; PubMed Central PMCID: PMC134780.
15. Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Romling U, Melefors O. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of Salmonella Typhimurium. *Environ Microbiol.* 2010;12(2):524-40. Epub 2009/11/19. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02097.x. PubMed PMID: 19919539; PubMed Central PMCID: PMC2888478.
16. Leng Y, Vakulskas CA, Zere TR, Pickering BS, Watnick PI, Babitzke P, et al. Regulation of CsrB/C sRNA decay by EIIA(Glc) of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Mol Microbiol.* 2016;99(4):627-39. Epub 2015/10/29. doi: 10.1111/mmi.13259. PubMed PMID: 26507976; PubMed Central PMCID: PMC4888959.

17. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-46. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001. PubMed PMID: 16212498.
18. Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(2):156-81. Epub 20120716. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x. PubMed PMID: 22712853.
19. Anderson JK, Huang JY, Wreden C, Sweeney EG, Goers J, Remington SJ, et al. Chemorepulsion from the Quorum Signal Autoinducer-2 Promotes *Helicobacter pylori* Biofilm Dispersal. *mBio.* 2015;6(4):e00379. Epub 2015/07/15. doi: 10.1128/mBio.00379-15. PubMed PMID: 26152582; PubMed Central PMCID: PMC4488943.
20. Kim SM, Park JH, Lee HS, Kim WB, Ryu JM, Han HJ, et al. LuxR homologue SmcR is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells. *Infect Immun.* 2013;81(10):3721-30. Epub 20130729. doi: 10.1128/IAI.00561-13. PubMed PMID: 23897607; PubMed Central PMCID: PMC3811769.
21. Taga ME, Miller ST, Bassler BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2003;50(4):1411-27. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03781.x. PubMed PMID: 14622426.
22. Jesudhasan PR, Cepeda ML, Widmer K, Dowd SE, Soni KA, Hume ME, et al. Transcriptome analysis of genes controlled by luxS/autoinducer-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(4):399-410. doi: 10.1089/fpd.2009.0372. PubMed PMID: 19909098; PubMed Central PMCID: PMC3132110.
23. Hardie KR, Cooksley C, Green AD, Winzer K. Autoinducer 2 activity in *Escherichia coli* culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS. *Microbiology (Reading).* 2003;149(Pt 3):715-28. doi: 10.1099/mic.0.25853-0. PubMed PMID: 12634340.
24. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):112-8. Epub 20061205. doi: 10.1038/sj.icb.7100007. PubMed PMID: 17146467.

25. A Novel Data-Mining Approach Systematically Links Genes to Traits. *PLoS Biol.* 2005;3(5): e166. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030166>.
26. Ohl ME, Miller SI. Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med.* 2001;52:259-74. doi: 10.1146/annurev.med.52.1.259. PubMed PMID: 11160778.
27. Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Hart CA. Characterisation of community acquired non-typhoidal Salmonella from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiol.* 2006;6:101. Epub 20061215. doi: 10.1186/1471-2180-6-101. PubMed PMID: 17173674; PubMed Central PMCID: PMC1764016.
28. Kozak GK, MacDonald D, Landry L, Farber JM. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *J Food Prot.* 2013;76(1):173-83. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-126. PubMed PMID: 23317873.
29. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2000;2(2):145-56. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00273-2. PubMed PMID: 10742687.
30. Olsen JE, Brown DJ, Thomsen LE, Platt DJ, Chadfield MS. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. *Microb Pathog.* 2004;36(6):337-47. doi: 10.1016/j.micpath.2004.02.005. PubMed PMID: 15120160.
31. Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:270. Epub 20190731. doi: 10.3389/fcimb.2019.00270. PubMed PMID: 31428589; PubMed Central PMCID: PMC6689963.
32. Kuhle V, Hensel M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(22):2812-26. doi: 10.1007/s00018-004-4248-z. PubMed PMID: 15558211.

33. Barth S, Bauerfeind R. [Virulence plasmids of *Salmonella enterica*--incidence and properties]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2005;118(1-2):8-23. PubMed PMID: 15690632.
34. Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun.* 2004;72(7):4138-50. doi: 10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004. PubMed PMID: 15213159; PubMed Central PMCID: PMC427403.
35. Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 1996;64(5):1862-5. doi: 10.1128/iai.64.5.1862-1865.1996. PubMed PMID: 8613405; PubMed Central PMCID: PMC174006.
36. Rehman T, Yin L, Latif MB, Chen J, Wang K, Geng Y, et al. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microb Pathog.* 2019;137:103748. Epub 20190912. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103748. PubMed PMID: 31521802.
37. Boddicker JD, Ledebor NA, Jagnow J, Jones BD, Clegg S. Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the fimH gene of the fim gene cluster. *Mol Microbiol.* 2002;45(5):1255-65. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03121.x. PubMed PMID: 12207694.
38. Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):247-60. doi: 10.1038/s41579-019-0158-9. PubMed PMID: 30760902.
39. Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012;7(9):1061-72. doi: 10.2217/fmb.12.76. PubMed PMID: 22953707.
40. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology.* 2010;8(9):623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415. PubMed PMID: WOS:000280855500009.
41. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr.* 2015;3(3). doi:

10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014. PubMed PMID: 26185074; PubMed Central PMCID: PMC4657554.

42. Fong JNC, Yildiz FH. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014. PubMed PMID: 26104709; PubMed Central PMCID: PMC4480581.

43. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(3):341-52. Epub 20131204. doi: 10.3109/1040841X.2013.841639. PubMed PMID: 24303798.

44. Taylor PK, Yeung AT, Hancock RE. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol*. 2014;191:121-30. Epub 20140918. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.003. PubMed PMID: 25240440.

45. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:76. Epub 20190516. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3. PubMed PMID: 31131107; PubMed Central PMCID: PMC6524306.

46. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2015;7(1):1-7. Epub 20150323. doi: 10.1038/ijos.2014.65. PubMed PMID: 25504208; PubMed Central PMCID: PMC4817533.

47. Carmen JC, Roeder BL, Nelson JL, Ogilvie RL, Robison RA, Schaalje GB, et al. Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. *Am J Infect Control*. 2005;33(2):78-82. doi: 10.1016/j.ajic.2004.08.002. PubMed PMID: 15761406; PubMed Central PMCID: PMC1361257.

48. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol*. 2010;5(11):1663-74. doi: 10.2217/fmb.10.125. PubMed PMID: 21133688.

49. Abu Khweek A, Fernandez Davila NS, Caution K, Akhter A, Abdulrahman BA, Tazi M, et al. Biofilm-derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:18. Epub 20130527. doi:

10.3389/fcimb.2013.00018. PubMed PMID: 23750338; PubMed Central PMCID: PMC3664316.

50. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2018;6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018. PubMed PMID: 30117414; PubMed Central PMCID: PMC6282163.

51. Bai X, Liu D, Xu L, Tenguria S, Drolia R, Gallina NLF, et al. Biofilm-isolated *Listeria monocytogenes* exhibits reduced systemic dissemination at the early (12-24 h) stage of infection in a mouse model. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021;7(1):18. Epub 20210208. doi: 10.1038/s41522-021-00189-5. PubMed PMID: 33558519; PubMed Central PMCID: PMC7870835.

52. Lagha R, Ben Abdallah F, Al-Sarhan BO, Al-Sodany Y. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules.* 2019;24(6). Epub 20190323. doi: 10.3390/molecules24061161. PubMed PMID: 30909573; PubMed Central PMCID: PMC6471185.

53. Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, et al. Salmonella Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:624622. Epub 20210202. doi: 10.3389/fcimb.2020.624622. PubMed PMID: 33604308; PubMed Central PMCID: PMC7885405.

54. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004330. Epub 20160204. doi: 10.1371/journal.pntd.0004330. PubMed PMID: 26845681; PubMed Central PMCID: PMC4741415.

55. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018;82(2). Epub 20180509. doi: 10.1128/MMBR.00001-18. PubMed PMID: 29743338; PubMed Central PMCID: PMC5968456.

56. Han Q, Song X, Zhang Z, Fu J, Wang X, Malakar PK, et al. Removal of Foodborne Pathogen Biofilms by Acidic Electrolyzed Water. *Front Microbiol.* 2017;8:988. Epub 20170607. doi: 10.3389/fmicb.2017.00988. PubMed PMID: 28638370; PubMed Central PMCID: PMC5461821.

57. Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.* 2004;134(1):320-31. Epub 20031230. doi: 10.1104/pp.103.027888. PubMed PMID: 14701912; PubMed Central PMCID: PMC316311.
58. Dobretsov S, Abed RM, Teplitski M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling.* 2013;29(4):423-41. doi: 10.1080/08927014.2013.776042. PubMed PMID: 23574279.
59. Demirel YK, Uzun D, Zhang Y, Fang HC, Day AH, Turan O. Effect of barnacle fouling on ship resistance and powering. *Biofouling.* 2017;33(10):819-34. Epub 20171005. doi: 10.1080/08927014.2017.1373279. PubMed PMID: 28980835.
60. Castro MC, Fileman TW, Hall-Spencer JM. Invasive species in the Northeastern and Southwestern Atlantic Ocean: A review. *Mar Pollut Bull.* 2017;116(1-2):41-7. Epub 20170124. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.048. PubMed PMID: 28126398.
61. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):MB-0001-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014. PubMed PMID: 26104692.
62. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;261:1-14. Epub 20181024. doi: 10.1016/j.cis.2018.10.005. PubMed PMID: 30376953.
63. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23(2):179-230. doi: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x. PubMed PMID: 10234844.
64. Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun YV. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015. PubMed PMID: 26350310; PubMed Central PMCID: PMC4566860.
65. Wood TK. Precedence for the structural role of flagella in biofilms. *mBio.* 2013;4(2):e00225-13. Epub 20130423. doi: 10.1128/mBio.00225-13. PubMed PMID: 23611910; PubMed Central PMCID: PMC3631614.

66. Maldarelli GA, Piepenbrink KH, Scott AJ, Freiberg JA, Song Y, Achermann Y, et al. Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Pathog Dis*. 2016;74(6). Epub 20160630. doi: 10.1093/femspd/ftw061. PubMed PMID: 27369898; PubMed Central PMCID: PMC5985507.
67. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563-75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94. PubMed PMID: 27510863.
68. Jonas K, Melefors O, Romling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol*. 2009;4(3):341-58. doi: 10.2217/Fmb.09.7. PubMed PMID: WOS:000265342700011.
69. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(3):228-33. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00318-x. PubMed PMID: 12180097.
70. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(10):571-86. Epub 20200612. doi: 10.1038/s41579-020-0385-0. PubMed PMID: 32533131; PubMed Central PMCID: PMC8564779.
71. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 2010;89(3):205-18. Epub 20100205. doi: 10.1177/0022034509359403. PubMed PMID: 20139339; PubMed Central PMCID: PMC3318030.
72. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem*. 2019;7:824. Epub 20191128. doi: 10.3389/fchem.2019.00824. PubMed PMID: 31850313; PubMed Central PMCID: PMC6893625.
73. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 2012;45(2):502-31. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.038. PubMed PMID: WOS:000302032200005.

74. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol.* 2001;39(6):1452-63. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x. PubMed PMID: 11260463.
75. Maruzani R, Sutton G, Nocerino P, Marvasi M. Exopolymeric substances (EPS) from *Salmonella enterica*: polymers, proteins and their interactions with plants and abiotic surfaces. *J Microbiol.* 2019;57(1):1-8. Epub 20180906. doi: 10.1007/s12275-019-8353-y. PubMed PMID: 30552630.
76. Wang H, Huang Y, Wu SY, Li YY, Ye Y, Zheng YJ, et al. Extracellular DNA Inhibits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *S. enterica* Serovar Typhi Biofilm Development on Abiotic Surfaces. *Curr Microbiol.* 2014;68(2):262-8. doi: 10.1007/s00284-013-0468-5. PubMed PMID: WOS:000329994500020.
77. Dubois-Brissonnet F. Adaptation of *Salmonella* to Antimicrobials. *Food-Processing Environments* 2012.
78. Simm R, Ahmad I, Rhen M, Le Guyon S, Romling U. Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Future Microbiol.* 2014;9(11):1261-82. doi: 10.2217/fmb.14.88. PubMed PMID: 25437188.
79. Gerstel U, Romling U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* 2003;154(10):659-67. doi: 10.1016/j.resmic.2003.08.005. PubMed PMID: 14643403.
80. Jonas K, Melefors O, Romling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol.* 2009;4(3):341-58. Epub 2009/03/31. doi: 10.2217/fmb.09.7. PubMed PMID: 19327118.
81. Ahmad I, Cimdins A, Beske T, Romling U. Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of *csgD* expression in *Salmonella typhimurium*. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):27. Epub 20170202. doi: 10.1186/s12866-017-0934-5. PubMed PMID: 28148244; PubMed Central PMCID: PMC5289004.

82. Babitzke P, Romeo T. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(2):156-63. Epub 20070323. doi: 10.1016/j.mib.2007.03.007. PubMed PMID: 17383221.
83. Martinez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the Salmonella SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol.* 2011;80(6):1637-56. Epub 2011/04/27. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x. PubMed PMID: 21518393; PubMed Central PMCID: PMC3116662.
84. Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. Global regulation by CsrA in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol.* 2003;48(6):1633-45. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03535.x. PubMed PMID: 12791144.
85. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, et al. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol.* 2002;43(3):793-808. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x. PubMed PMID: 11929533.
86. Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BMM. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading).* 2006;152(Pt 11):3411-24. doi: 10.1099/mic.0.29118-0. PubMed PMID: 17074910.
87. Perez-Morales D, Bustamante VH. The global regulatory system Csr senses glucose through the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Mol Microbiol.* 2016;99(4):623-6. Epub 20151222. doi: 10.1111/mmi.13285. PubMed PMID: 26593223.
88. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest.* 2003;112(9):1291-9. doi: 10.1172/JCI20195. PubMed PMID: 14597753; PubMed Central PMCID: PMC228483.
89. Xavier KB, Bassler BL. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2005;187(1):238-48. doi: 10.1128/JB.187.1.238-248.2005. PubMed PMID: 15601708; PubMed Central PMCID: PMC538819.

90. Dror N, Mandel M, Hazan Z, Lavie G. Advances in microbial biofilm prevention on indwelling medical devices with emphasis on usage of acoustic energy. *Sensors (Basel)*. 2009;9(4):2538-54. Epub 20090414. doi: 10.3390/s90402538. PubMed PMID: 22574031; PubMed Central PMCID: PMC3348827.
91. Ramos ER, Reitzel R, Jiang Y, Hachem RY, Chaftari AM, Chemaly RF, et al. Clinical effectiveness and risk of emerging resistance associated with prolonged use of antibiotic-impregnated catheters: more than 0.5 million catheter days and 7 years of clinical experience. *Crit Care Med*. 2011;39(2):245-51. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181feb83e. PubMed PMID: 21057308.
92. Zhu Y, Jin F, Yang S, Li J, Hu D, Liao L. Pre-treatment with EDTA-gallium prevents the formation of biofilms on surfaces. *Exp Ther Med*. 2013;5(4):1001-4. Epub 20130205. doi: 10.3892/etm.2013.946. PubMed PMID: 23596464; PubMed Central PMCID: PMC3627445.
93. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(6):1636-53. Epub 20121217. doi: 10.1002/anie.201205923. PubMed PMID: 23255416.
94. Secinti KD, Ozalp H, Attar A, Sargon MF. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J Clin Neurosci*. 2011;18(3):391-5. Epub 20110120. doi: 10.1016/j.jocn.2010.06.022. PubMed PMID: 21256031.
95. Jansen B, Kohnen W. Prevention of biofilm formation by polymer modification. *J Ind Microbiol*. 1995;15(4):391-6. doi: 10.1007/BF01569996. PubMed PMID: 8605077.
96. John T, Rajpurkar A, Smith G, Fairfax M, Triest J. Antibiotic pretreatment of hydrogel ureteral stent. *J Endourol*. 2007;21(10):1211-6. doi: 10.1089/end.2007.9904. PubMed PMID: 17949328.
97. Freebairn D, Linton D, Harkin-Jones E, Jones DS, Gilmore BF, Gorman SP. Electrical methods of controlling bacterial adhesion and biofilm on device surfaces. *Expert Rev Med Devices*. 2013;10(1):85-103. doi: 10.1586/erd.12.70. PubMed PMID: 23278226.

98. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist.* 2014;7:343-63. Epub 20141212. doi: 10.2147/IDR.S51388. PubMed PMID: 25548523; PubMed Central PMCID: PMC4271721.
99. Jiang Y, Geng M, Bai L. Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms.* 2020;8(8). Epub 20200811. doi: 10.3390/microorganisms8081222. PubMed PMID: 32796745; PubMed Central PMCID: PMC7465149.
100. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol.* 2007;189(22):7945-7. Epub 20070803. doi: 10.1128/JB.00858-07. PubMed PMID: 17675377; PubMed Central PMCID: PMC2168682.
101. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biot.* 2007;75(1):125-32. doi: 10.1007/s00253-006-0790-y. PubMed PMID: WOS:000246094200015.
102. Nguyen UT, Burrows LL. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol.* 2014;187:26-32. Epub 20140704. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025. PubMed PMID: 25043896.
103. Christensen DG, Marsden AE, Hodge-Hanson K, Essock-Burns T, Visick KL. LapG mediates biofilm dispersal in *Vibrio fischeri* by controlling maintenance of the VCBS-containing adhesin LapV. *Mol Microbiol.* 2020;114(5):742-61. Epub 20200803. doi: 10.1111/mmi.14573. PubMed PMID: 32654271; PubMed Central PMCID: PMC7704791.
104. Baker P, Hill PJ, Snarr BD, Alnabelseya N, Pestrak MJ, Lee MJ, et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci Adv.* 2016;2(5). doi: ARTN e1501632
10.1126/sciadv.1501632. PubMed PMID: WOS:000380073000013.
105. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(3):341-52. doi: 10.3109/1040841x.2013.841639. PubMed PMID: WOS:000359360900005.

106. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):224-45. Epub 20121109. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004. PubMed PMID: 23142623.
107. Mukherji R, Prabhune A. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in quorum sensing inhibition and as antibiofilm agents. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:890709. Epub 20140114. doi: 10.1155/2014/890709. PubMed PMID: 24558341; PubMed Central PMCID: PMC3914375.
108. Rajkumari J, Borkotoky S, Murali A, Suchiang K, Mohanty SK, Busi S. Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biotechnol Lett.* 2018;40(7):1087-100. Epub 20180421. doi: 10.1007/s10529-018-2557-9. PubMed PMID: 29680931.
109. Shukla V, Bhathena Z. Broad Spectrum Anti-Quorum Sensing Activity of Tannin-Rich Crude Extracts of Indian Medicinal Plants. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:5823013. Epub 20160414. doi: 10.1155/2016/5823013. PubMed PMID: 27190686; PubMed Central PMCID: PMC4848445.
110. Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, Skinderso ME, Givskov M, Nielsen J. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem.* 2005;3(2):253-62. Epub 20041201. doi: 10.1039/b415761c. PubMed PMID: 15632967.
111. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(23):7116-21. Epub 20130913. doi: 10.1128/AEM.02636-13. PubMed PMID: 24038684; PubMed Central PMCID: PMC3837759.
112. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 2008;76(9):4176-82. Epub 20080630. doi: 10.1128/IAI.00318-08. PubMed PMID: 18591225; PubMed Central PMCID: PMC2519444.
113. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(1):39-50. Epub 20111128. doi: 10.1038/nrmicro2695. PubMed PMID: 22120588.

114. Barraud N, Kelso MJ, Rice SA, Kjelleberg S. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Curr Pharm Des.* 2015;21(1):31-42. doi: 10.2174/1381612820666140905112822. PubMed PMID: 25189865.
115. Davies DG, Marques CN. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol.* 2009;191(5):1393-403. Epub 20081212. doi: 10.1128/JB.01214-08. PubMed PMID: 19074399; PubMed Central PMCID: PMC2648214.
116. Estrela C, Costa ESR, Urban RC, Goncalves PJ, Silva JA, Estrela CRA, et al. Demetallization of *Enterococcus faecalis* biofilm: a preliminary study. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170374. Epub 20180208. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0374. PubMed PMID: 29451651; PubMed Central PMCID: PMC5815357.
117. Fleming D, Rumbaugh K. The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci Rep-Uk.* 2018;8. doi: ARTN 10738
10.1038/s41598-018-29121-2. PubMed PMID: WOS:000438679100043.
118. Marvasi M, Chen C, Carrazana M, Durie IA, Teplitski M. Systematic analysis of the ability of Nitric Oxide donors to dislodge biofilms formed by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *AMB Express.* 2014;4:42. Epub 20140605. doi: 10.1186/s13568-014-0042-y. PubMed PMID: 24995149; PubMed Central PMCID: PMC4070026.
119. Marvasi M, Durie IA, Henriquez T, Satkute A, Matuszewska M, Prado RC. Dispersal of human and plant pathogens biofilms via nitric oxide donors at 4 degrees C. *AMB Express.* 2016;6(1):49. Epub 20160726. doi: 10.1186/s13568-016-0220-1. PubMed PMID: 27457245; PubMed Central PMCID: PMC4960098.
120. Marvasi M, Durie IA, McLamore ES, Vanegas DC, Chaturvedi P. *Salmonella enterica* biofilm-mediated dispersal by nitric oxide donors in association with cellulose nanocrystal hydrogels. *AMB Express.* 2015;5:28. Epub 20150523. doi: 10.1186/s13568-015-0114-7. PubMed PMID: 26020015; PubMed Central PMCID: PMC4441645.
121. Islam M, Durie I, Ramadan R, Purchase D, Marvasi M. Exploitation of nitric oxide donors to control bacterial adhesion on ready-to-eat vegetables and dispersal of pathogenic biofilm from polypropylene. *J Sci Food Agric.* 2020;100(7):3078-86. Epub 20200302. doi: 10.1002/jsfa.10340. PubMed PMID: 32077490.

122. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004152. Epub 20140522. doi: 10.1371/journal.ppat.1004152. PubMed PMID: 24852171; PubMed Central PMCID: PMC4031209.
123. Sepehr S, Rahmani-Badi A, Babaie-Naiej H, Soudi MR. Unsaturated fatty acid, cis-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria. *PLoS One.* 2014;9(7):e101677. Epub 20140707. doi: 10.1371/journal.pone.0101677. PubMed PMID: 25000301; PubMed Central PMCID: PMC4084997.
124. Yuksel FN, Buzrul S, Akcelik M, Akcelik N. Inhibition and eradication of *Salmonella Typhimurium* biofilm using P22 bacteriophage, EDTA and nisin. *Biofouling.* 2018;34(9):1046-54. Epub 20190108. doi: 10.1080/08927014.2018.1538412. PubMed PMID: 30621457.
125. Xu X, Peng Q, Zhang Y, Tian D, Zhang P, Huang Y, et al. Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut and the antibiofilm activity of its exopolysaccharides. *Food Funct.* 2020;11(5):4697-706. Epub 20200514. doi: 10.1039/d0fo00905a. PubMed PMID: 32406901.
126. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(12):6640-5. Epub 2000/06/01. doi: 10.1073/pnas.120163297. PubMed PMID: 10829079; PubMed Central PMCID: PMC18686.
127. CGSC *EcGRaY*. pKD46 plasmid [cited 2022 14/04]. Available from: https://cgsc.biology.yale.edu/CGSCPlasmids/pKD46_Map.pdf.
128. addgene.org. pKD3 plasmid map [15/04/2022]. Available from: <https://www.addgene.org/browse/sequence/292564>.
129. Altier C, Suyemoto M, Lawhon SD. Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun.* 2000;68(12):6790-7. doi: 10.1128/IAI.68.12.6790-6797.2000. PubMed PMID: 11083797; PubMed Central PMCID: PMC97782.

130. addgene.org. pBAD24 plasmid [15/04/2022]. Available from: <https://www.addgene.org/vector-database/1845/>.
131. Lu L, Hume ME, Pillai SD. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. *J Food Prot.* 2004;67(7):1457-62. doi: 10.4315/0362-028x-67.7.1457. PubMed PMID: 15270501.
132. Woodward MJ, Sojka M, Sprigings KA, Humphrey TJ. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J Med Microbiol.* 2000;49(5):481-7. Epub 2000/05/08. doi: 10.1099/0022-1317-49-5-481. PubMed PMID: 10798562.
133. Jadhav SS, Rohan & Bhavne, Mrinal & Palombo, Enzo. . Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* Planktonic cells and biofilms. . *Food Control.* 2013;29:125-30. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.071.
134. Chua SL, Hultqvist LD, Yuan M, Rybtke M, Nielsen TE, Givskov M, et al. In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-dispersed cells via c-di-GMP manipulation. *Nat Protoc.* 2015;10(8):1165-80. Epub 2015/07/15. doi: 10.1038/nprot.2015.067. PubMed PMID: 26158442.
135. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
136. Bialucha A, Gospodarek-Komkowska E, Kwiecinska-Pirog J, Skowron K. Influence of Selected Factors on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Strains. *Microorganisms.* 2020;9(1). Epub 20201225. doi: 10.3390/microorganisms9010043. PubMed PMID: 33375734; PubMed Central PMCID: PMC7824446.
137. Jackson DW, Simecka JW, Romeo T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol.* 2002;184(12):3406-10. doi: 10.1128/JB.184.12.3406-3410.2002. PubMed PMID: 12029060; PubMed Central PMCID: PMC135108.
138. Roy PK, Ha AJ, Mizan MFR, Hossain MI, Ashrafudoulla M, Tushik SH, et al. Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poult Sci.*

2021;100(7):101209. Epub 20210421. doi: 10.1016/j.psj.2021.101209. PubMed PMID: 34089933; PubMed Central PMCID: PMC8182266.

139. Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol.* 2004;186(21):7312-26. doi: 10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004. PubMed PMID: 15489443; PubMed Central PMCID: PMC523207.

140. Marks LR, Davidson BA, Knight PR, Hakansson AP. Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *mBio.* 2013;4(4). Epub 20130723. doi: 10.1128/mBio.00438-13. PubMed PMID: 23882016; PubMed Central PMCID: PMC3735180.

141. Weillbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, et al. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2003;48(3):657-70. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03459.x. PubMed PMID: 12694612.

142. Sterzenbach T, Nguyen KT, Nuccio SP, Winter MG, Vakulskas CA, Clegg S, et al. A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* 2013;32(21):2872-83. Epub 20130920. doi: 10.1038/emboj.2013.206. PubMed PMID: 24056837; PubMed Central PMCID: PMC3817462.

143. Ledeboer NA, Frye JG, McClelland M, Jones BD. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun.* 2006;74(6):3156-69. doi: 10.1128/IAI.01428-05. PubMed PMID: 16714543; PubMed Central PMCID: PMC1479237.

144. Mitra A, Herren CD, Patel IR, Coleman A, Mukhopadhyay S. Integration of AI-2 Based Cell-Cell Signaling with Metabolic Cues in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157532. Epub 20160630. doi: 10.1371/journal.pone.0157532. PubMed PMID: 27362507; PubMed Central PMCID: PMC4928848.

145. Gonzalez Barrios AF, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility

quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J Bacteriol.* 2006;188(1):305-16. doi: 10.1128/JB.188.1.305-316.2006. PubMed PMID: 16352847; PubMed Central PMCID: PMC1317603.

146. Choi J, Shin D, Kim M, Park J, Lim S, Ryu S. LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of *Salmonella typhimurium* by regulating SPI-1 and flagella genes. *PLoS One.* 2012;7(5):e37059. Epub 20120518. doi: 10.1371/journal.pone.0037059. PubMed PMID: 22623980; PubMed Central PMCID: PMC3356404.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nasrine BEKHEDDA

Eğitim Durumu

Lise: Yaich Boudjemaa Lisesi, Bechar, Cezayir [2012 – 2015]

Lisans: Tahri Mohamed Bechar Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümü [2015 – 2018]

Yayınlar

Bildiriler

- 4. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı

Salmonella biofilm dispersal: an approach for biofilm control

[Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum), 24/11/2021 – 26/11/2021]

Bekhedda N., Asan M., Akcelik M., Akcelik N.

- 4. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı

Salmonella cinsinde iki bileşenli düzenleyici sistemlerin rolleri

[Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum), 24/11/2021 – 26/11/2021]

Aşan M., Bekhedda N., Akcelik M., Akcelik N.

- 4. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı

Effects of CsgD regulation on autoinducer-2 activity in *Salmonella* Typhimurium

[Ankara, Türkiye (Poster Sunumu), 24/11/2021 – 26/11/2021]

Aşan M., Bekhedda N., Akcelik N.

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Bekhedda N., Asan M., Akcelik M., Akcelik N.“ *Salmonella* biofilm dispersal: an approach for biofilm control “. 4. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı.

Kasım 24-26, 2021 Ankara, Türkiye (Sözlü Sunum)





**4th INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON
BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES**

**24 - 26 November 2021
Ankara / Turkey**

(EurasianBioChem 2021)

www.eurasianbiochem.org

PROCEEDING BOOK

(Abstracts and Full-Text Papers)



EurasianBioChem



ISBN : 978-625-00-9586-7

➤ ORAL PRESENTATION

***Salmonella* biofilm dispersal: an approach for biofilm control**

Nasrine Bekhedda¹ (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4426-1803>), Melih Aşan¹ (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3366-8109>), Mustafa Akçelik² (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1227-2324>), Nefise Akçelik^{1*} (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5541-1681>)

¹Ankara University, Biotechnology Institute, Department of Basic Biotechnology, Ankara, Turkey

²Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey

*Corresponding author e-mail: nakcelik@ankara.edu.tr

Abstract

Salmonella enterica is a biofilm-forming pathogen causing foodborne disease outbreaks worldwide. Biofilms are cell populations attached to a surface and encased in a protective self-produced polymeric matrix (EPS). Biofilm formation enables these pathogens to tolerate high concentrations of antibiotics and persist in harsh environmental conditions, making the treatment of biofilm-related *Salmonella* infections a significant challenge in healthcare. Efforts to develop novel combat strategies focus on two avenues: i) The inhibition of biofilm formation, and ii) The removal of mature biofilms. Dispersion is a vital stage in the biofilm life cycle and it results in releasing more vulnerable cells. Therefore, and given that dispersed cells are more susceptible to antimicrobial agents, biofilm dispersal is a potential strategy for biofilm eradication. Biofilm-embedded cells undergo dispersion either passively by mechanical action or actively as a response to external signals. Studies showed that dispersion can be achieved by targeting the extracellular polymeric substance (EPS) matrix, the QS system or/and the dormant cells, using enzymes, antibiofilm peptides and/or dispersal molecules. Dispersal agents are usually combined with antibiotics for an efficient removal of dispersed cells and the remaining biofilms. In *Salmonella enterica*, the low levels of the bacterial second messenger cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) lead to the transition from sessile to motile lifestyle. Research revealed that dispersal molecules such as cis-2-decenoic acid (CDA), Nitric oxide donors and chelating agents in addition to antibiofilm peptides and antibiofilm exopolysaccharides could be used to disperse *Salmonella* biofilms. Nevertheless, more research should be conducted to both elucidate the genetic and metabolic pathways behind the dispersal events and determine the *in vivo* effectiveness of the combination of dispersal agents with antibiotics.

Keywords: *Salmonella*, Dispersion, Biofilm control, c-di-GMP.