

Salmonella'da Çoğunluğu Algılama Sistemlerinin Biyofilm Oluşumu ve Virülans Üzerine Etkisi

Effect of Quorum Sensing Systems on Biofilm Formation and Virulence in Salmonella

Ebru ÖZTAŞ GÜLMÜŞ¹(ID), Nefise AKÇELİK²(ID), Caner ÖZDEMİR¹(ID), Mustafa AKÇELİK¹(ID)

¹ Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Ankara.

¹ Ankara University, Department of Biology, Ankara, Türkiye.

² Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

² Ankara University, Institute of Biotechnology, Ankara, Türkiye.

*Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 224-21L0430014).

Makale Atfı: Öztaş Gülmüş E, Akçelik N, Özdemir C, Akçelik M. Salmonella'da çoğunluğu algılama sistemlerinin biyofilm oluşumu ve virülans üzerine etkisi. Mikrobiyol Bul 2024;58(3):225-238.

ÖZ

Son yıllarda hücreler arasındaki iletişim paradigmasının aydınlatılmasıyla beraber bakterilerin çeşitli hücre dışı sinyallere yanıt olarak gen ekspresyon modellerini değiştirebilmeleri büyük ilgi çekmektedir. Özellikle çoğunluğu algılama [quorum sensing (QS)] olarak adlandırılan bakteri popülasyonları arasındaki hücre içi ve hücreler arası iletişim, fizyolojik ve genetik faaliyetlerin koordinasyonu için önemli bir araç olmaktadır. QS çalışmalarının, özellikle gıda kaynaklı patojenlerdeki enfeksiyöz süreçlerin düzenleyici mekanizmalarını aydınlatmak için önemi büyüktür. Salmonella'da bulunan QS mekanizmalarının aydınlatılması, bu bakteriyelle mücadelede virülans faktörlerini etkisizleştirmek açısından önemlidir. Bu çalışmada Salmonella'nın QS aktivitesinde anahtar rol oynayan luxS geni mutantlarının oluşturulması ve bu mutasyonun bakteride bulunan virülans genlerinin ifadesi üzerine etkisinin ve sentetik N-hekzanoil-homoserin laktin (C6HSL)'ün Salmonella doğal suş ve luxS geni mutantlarının biyofilm oluşumuyla AI-2 sinyali yoluyla etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. luxS geni mutantları, homolog bölge rekombinasyonunu esas alan, kloramfenikol gen kasetiyle söz konusu gen bölgesinin rekombinasyonu yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde elde edilen luxS mutantlarında, Salmonella patojenitesinde önemli rollere sahip sekiz farklı virülans geninin (hilA, invA, inv, glgC, fimF, flf, lpfA, gyrA) ifadesi kantitatif gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-qPCR)] yöntemiyle doğal suşlarla karşılaştırmalı bir şekilde belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, luxS geni bakımından mutant olan suşlarda, incelenen her bir genin ifadesinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Salmonella suşlarının bağlı AI-2 aktivitesi zamana bağlı olarak incelenmiş ve en yüksek aktivitenin dördüncü saatte gerçekleştiği, ayrıca luxS mutantlarının AI-2 aktivitesinin, doğal suşa kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Son olarak, C6HSL'in Salmonella Typhimurium DMC4, SL1344 doğal suşları ve mutantlarının biyofilm aktivitesini en çok 72. saatte arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu bulgularla C6HSL'in tüm suşlarda QS iletişimini uyardığı, buna bağlı olarak da Salmonella'nın biyofilm oluşumunu ve otoindüktör aktivitesini arttırdığına dair güçlü kanıtlar sunulmuştur. Bu durum, Salmonella'nın dış sinyallere karşı QS sistemlerini kullanarak yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca bu patojenin biyofilm oluşumunu önlemeye yönelik stratejilerin geliştirilmesi için türler arası iletişim mekanizmaları hakkında ek bilgi sağlayabilecek araştırmalara katkıda bulunulmuştur.

Anahtar kelimeler: S. Typhimurium; QS; luxS; AHL; C6HSL.

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Mustafa Akçelik, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.

Tel (Phone): +90 (533) 255 9509, E-posta (E-mail): akcelik@science.ankara.edu.tr

ABSTRACT

In recent years, as the paradigm of communication between cells has been clarified, the ability of bacteria to change their gene expression patterns in response to various extracellular signals has attracted great interest. In particular, intracellular and intercellular communication between bacterial populations, called quorum sensing (QS), is essential for coordinating physiological and genetic activities. QS studies are critical, particularly in elucidating the regulatory mechanisms of infectious processes in food-borne pathogens. Elucidating the QS mechanisms in *Salmonella* is effective in silencing the virulence factors in the fight against this bacterium. The aims of this study were; to create *luxS* gene mutants that play a vital role in the QS activity of *Salmonella* and to determine the effect of this mutation on the expression of virulence genes in the bacteria and to determine the impact of synthetic N-hexanoyl-homoserine lactone (C6HSL) on biofilm formation and AI-2 signaling pathway of *Salmonella* wild strain and *luxS* gene mutants. *luxS* gene mutants were constructed by recombining the gene region with the chloramphenicol gene cassette based on homologous region recombination. In the *luxS* mutants obtained in this way, the expression of eight different virulence genes (*hilA*, *invA*, *inv*, *glgC*, *fimF*, *fliF*, *lpfA*, *gyrA*), which have essential roles in *Salmonella* pathogenicity, was determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) method and compared with natural strains. As a result of these studies, it was determined that the expression of each gene examined was significantly reduced in *luxS* mutant strains. The relative AI-2 activities of *Salmonella* strains were analyzed depending on time. It was determined that the highest activity occurred at the fourth hour and the AI-2 activities of *luxS* mutants were reduced compared to the wild strain. Finally, it was determined that C6HSL increased the biofilm activity of *Salmonella* Typhimurium DMC4, SL1344 wild strains, and mutants, mainly at the 72nd hour. In conclusion, our results proved that C6HSL stimulated QS communication in all strains and increased biofilm of *Salmonella* formation and autoinducer activity. This situation determines that *Salmonella* responds to external signals by using QS systems. In addition, this research contributed to provide additional information on interspecies communication mechanisms to develop strategies to prevent biofilm formation of this pathogen.

Keywords: *S. Typhimurium*; QS; *luxS*; AHL; C6HSL.

GİRİŞ

Yoğunluğu algılama [quorum sensing (QS)] hücre yoğunluğuna bağlı, transkriptomik regölasyon sağlayan hücreler arası iletişim mekanizmasıdır. QS bakterilerde; biyofilm oluşumu, virölans aktivitesi, biyoluminesans, enzim üretimi gibi fenotipik aktivitelerin kontrol mekanizmasıdır. Bu sistem, otoindükleyici [auto inducer (AI)] olarak adlandırılan bir takım sinyal moleküllerini içermektedir. AI'ler kullanılarak gerçekleştirilen bu iletişim sistemleri hem gram-pozitif ve hem de gram-negatif bakterilerde bulunmaktadır^{1,2}. Ayrıca her iki grup da AI-2 adı verilen moleküller sayesinde türler arası iletişim köprüleri kurabilmektedirler. *Salmonella*'da tanımlanmış üç tip QS mekanizması vardır. Bunlardan ilki, AI-I olarak adlandırılan AHL'lerin kullanıldığı sistemdir³⁻⁵. LuxI adı verilen bir protein AHL'leri sentezler ve diğer bakteriler bu sinyal molekölünü algılayarak hücre içine taşır ve gerekli gen ifadesini düzenler^{6,7}. *Salmonella*'nın AI-I sisteminde ise LuxI proteini yoktur ve SdiA adı verilen *luxR* gen ailesinin bir üyesi olan protein AHL'lerin algılanmasında görev almaktadır. Bu nedenle *Salmonella*, AHL sentezleyemez ancak diğer türlerin salgıladığı AHL'leri algılayarak kendi virölans genlerinin ekspresyonunu düzenleyebilmektedir^{8,9}.

Salmonella'da en iyi tanımlanmış QS sistemi AI-2 sistemidir. AI-2 sinyal molekülü, *LuxS* enzimi tarafından sentezlenmektedir¹⁰. Diğer bakteri tarafından algılanan ve hücre içine taşınan AI-2 birtakım genlerin transkripsiyon aşamasında düzenlenmesini sağlar. Yapılan çalışmalarda AI-2 sinyal yolağının, *Salmonella* patojenite adası 1 (PI-1)'de bulunan virülans genlerinin ifadesini etkilediği belirlenmiş ve *luxS* geninde meydana gelen mutasyonların biyofilm oluşumu başta olmak üzere pek çok virülans geninin ifadesini ciddi oranda azalttığı tespit edilmiştir^{11,12}. Yine yapılan çalışmalarda *Salmonella enterica*'da PI-1'de bulunan *hilA*, *invA* ve *invF* gibi virülans genleriyle biyofilm oluşumunun şekillenmesinde görev alan *glgC*, *flfF*, *lpfA* ve *fimF* genlerinin AHL'lerin varlığında pozitif yönde regüle edildiği belirlenmiştir¹³. Bu durum QS sistemlerinin *Salmonella*'da önemli bir global regülatör olduğunu kanıtlamaktadır.

Bu çalışmada, kloramfenikol gen kasetiyle *luxS* geni delesyonu sağlanmış ve bu genin çeşitli virülans genleri üzerindeki ifade etkinliği değerlendirilmiştir. *hilA*, konakçı hücrenin *Salmonella* tarafından istila edilmesiyle ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. *invA*, bakterilerin periplazmik membranındaki bir protein olan *invA*'yı kodlar ve bu protein sayesinde konakçı epitel hücreleri istila edilir. *inv*, *Salmonella*'nın konakçı hücrelere invazyonunda görev almaktadır ve bakteri patojenitesinde etkili bir faktör olan tip III salgı sisteminin aktive olmasını sağlamaktadır. *glgC*, glikojenin üretilmesi için gerekli bir yapı taşı olan ADP-glikozun biyosentezini sağlayan enzimi kodlar. *Salmonella*'da glikojen biyosentezinin düzenlenmesi biyofilm oluşum aşamalarında büyük önem arz etmektedir. Bakterinin hareket mekanizmalarıyla ilişkili genlerden olan *fimF*, tip 1 fimbriaları; *lpfA*, uzun polar fimbria proteinini; *flfF* ise flagellumun bazal gövdesine ait bir proteini kodlamaktadır. *gyrA*, *Salmonella*'da kinolon bileşiklerine karşı direnç sağlayan bir virülans genidir. Bu genler, patojenlerin yüzeylere yapışmasında, biyofilm oluşumunda, konakçı hücrelerine invazyonda ve bakteri-konakçı etkileşimlerindeki süreçte oldukça önemlilerdir. Ayrıca PI-1'de QS ve virülans genlerinin düzenleyici basamakları arasında bir bağlantı olması, *Salmonella*'da AI-2 sinyal yolağının bloke edilmesinin virülanslık ve patojenitede önemli rol oynayan elemanlarının zayıflatılması veya ortadan kaldırılmasında önemli bir korunma stratejisi olabileceğine işaret etmektedir¹³⁻¹⁵.

Bu çalışmada, N-heksanoil-L-homoserin lakton (C6HSL) varlığında *Salmonella typhimurium* DMC4 ve SL1344 suşlarının AI-2 sinyal aktiviteleri ve biyofilm oluşturma kapasitelerini değerlendirmek amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, *Salmonella* enfeksiyonlarında *luxS* geni ve QS mekanizmalarının önemini, etki mekanizmaları ile ortaya koymaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Bakteriler ve Gelişim Koşulları

S.enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium DMC4, tarafımızca tanımlanan bir suş olup kültür koleksiyonumuzdan; *S.enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium

SL1344, American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edildi. Bu suşların *luxS* geni bakımından mutantları ise bu çalışma kapsamında elde edildi. *S.Typhimurium* DMC4 ve SL1344 suşlarının gelişimi için Luria-Bertani Buyyon LB g/L; 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 10 g NaCl), mutant suşlar için 20 mg/mL kloramfenikol antibiyotiği içeren LB-Buyyon besiyeri kullanıldı. Suşlar 37 °C'de 18 saat boyunca 200 rpm'de geliştirildi. Biyofilm çalışmalarında ise tuzsuz LB-Buyyon (LB-NaCl) besiyerleri kullanıldı. *Vibrio harveyi* otoindükleyici biyodeneme (AB) ortamında (pH 7.2 g/L; 17.5 g NaCl, 12.3 g MgSO₄, 2 g casamino asit, 10 ml KH₂PO₄, 10 ml 0.1 M L-Arjinin, 10 ml Gliserol) 30 °C'de 18 saat boyunca geliştirildi¹⁶.

S.Typhimurium DMC4 ve SL1344'ün *luxS* Geni Bakımından Mutantlarının Eldesi

luxS geninin lambda red rekombinaz sistemiyle insersiyonal inaktivasyonu gerçekleştirildi. Elli nükleotit uzunluğunda primerler kullanılarak kloramfenikol direnç kaseti, pKD3 plazmidinden sağlandı (Tablo I). *luxS* genine homolog kollar içeren kloramfenikol direnç gen kaseti Touchdown PCR yöntemi kullanılarak elde edildi (Thermal Cycler Bio-Rad, ABD). PCR ürünü, pKD46 plazmidini taşıyan suşa transforme edildi ve mutantlar, spesifik primerlerle yapılan PCR ile doğrulandı¹⁷.

S.Typhimurium'da AI-2 Aktivitesinin Tespiti

Doğal suşların ve onların *luxS* geni bakımından mutantlarının aktif kültürleri 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpertenantlar 0.22 µm por çaplı filtreden geçirildi. *V.harveyi* BB170 pozitif kontrol olarak kullanıldı. *V.harveyi* BB170 kültürleri 1:5000 oranında seyreltildikten sonra 90 µl'lik porsiyonlar halinde, 96 kuyucuklu lüminesans mikropoplaklara (Nunc™F96 MicroWell™, Danimarka) dağıtıldı. *Salmonella* süpertenantından 10 µl eklenerek plaklar, dört saat 30 °C, 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı ve Perkin-Elmer Victor V3 cihazı kullanılarak lüminometrik ölçümleri alındı. AI-2 sinyalleme aktivitesinin yüzdesi, aşağıdaki formülle RLU (Relative Light Unit-Bağlı Işık Ünitesi) cinsinden hesaplandı¹⁸:

$$\%AI-2 \text{ sinyali aktivitesi} = [RLU_{Salmonella} / RLU \text{ pozitif kontrol}] \times 100$$

Salmonella'da Biyofilm ve Virülans İlişkili Genlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Öncelikle *Salmonella* suşlarından GeneAll Hybrid-R RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapıldı. RNA örneklerinden cDNA sentezi "A.B.T. cDNA Synthesis Kit

Tablo I. *luxS* Mutantlarının Oluşturulması için Kullanılan Primerler¹³

Primerler	Diziler
<i>luxS</i> F (Cm ^R)	5'-ACT AAA TGC CAT TAT TAG ATA GCT TCG CAG TCG ATC ATA CCC GGA TGC AAG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C -3'
<i>luxS</i> R (Cm ^R)	5'-ATG CAG TTC CTG CAG TTT TTC TTT CGG CAG CGC CAG CTC TTT ATT GCT GTA TGG GAA TTA GCC ATG GTC C -3'

with Rnase Inhibitör (Türkiye)" kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İfade düzeyleri belirle-
necek genlerin primer dizileri Campos Galvao ve arkadaşlarının¹³ 2015 yılında yapmış
oldukları çalışmadan alındı. Genlerin amplifikasyonları A.B.T.TM 2X qPCR SYBR-Green
MasterMix kiti kullanılarak, 96 kuyucuklu pleytlerde, Light Cyclers 480 (Roche, ABD) ci-
hazıyla gerçekleştirildi.

rRT-qPCR verilerini analiz etmek amacıyla öncelikle örnek grupları belirlendi.
S.Typhimurium DMC4 ve SL1344 doğal suşları kontrol grubu, bu suşların *luxS* geni ba-
kımından mutantları da çalışma (test) grubu olarak ifade edildi. Verilerin normalizasyon
işlemi için 16S referans geni kullanıldı. Genlerin ifade seviyeleri Livak Metoduna (2- $\Delta\Delta Ct$)
göre hesaplandı [$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(CtH-CtR)K-(CtH-CtR)T}$ (K: Kontrol grubu, T: Test grubu,
CtH: Hedef genin ortalama Ct değeri, CtR: Referans genin ortalama Ct değeri)]¹⁹.

C6HSL'un Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

C6HSL 10 mM asetonitril (Asco) içerisinde çözüldürülerek konsantrasyonu 10 μM
olarak ayarlandı ve kontrol olarak, konsantrasyonu besiyerinin %1'ini geçmeyecek şekil-
de asetonitril uygulaması yapıldı³. Biyofilm denemelerine polistiren plak kuyucuklarına
100 μl LB-NaCl ile 30 μl aktif bakteri kültürü ve 50 nM C6HSL ilave edildi. C6HSL içermeyen
plaklar negatif kontrol, sadece asetonitril içeren plaklar pozitif kontrol olarak kullanıldı.
Plaklar statik koşullarda 20 °C'de 24, 48, 72 saat inkübe edildi ve akabinde kuyucuklar
üç defa steril fizyolojik serum (%0.85 NaCl) ile yıkanarak planktonik hücreler ortamdaki
uzaklaştırıldı. Kuyulara %95 metanol eklendi ve 15 dakika inkübasyona bırakıldı, ardın-
dan kuyulara 130 μl %0.1 kristal viyole aktarıldı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında
tutuldu. Plaklar steril suyla üç kez yıkandı ve kuyucuklara 130 μl %33 glasiyal asetik asit
ilave edildi, ardından 45 dakika oda sıcaklığında beklendi. Çözünen kristal viyole, OD595
nm'de ELISA okuyucuda (Biorad, ABD) ölçüldü¹³.

Salmonella suşlarının biyofilm üretim kapasiteleri, negatif kontrol üzerinden cut-off
OD [sınır eşik (ODc)] değeri hesaplandıktan sonra dört kategoride değerlendirildi. Suşlar,
ODc değerine göre ürettikleri biyofilm düzeyi bakımından "üretici olmayan", "zayıf",
"orta" ve "güçlü" olmak üzere belirlendi. Tüm çalışmalar üç tekrar olarak yapıldı ve so-
nuçların ortalaması alındı. Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan
"cut-off" dönüşümleri aşağıdaki şekilde belirlendi²⁰;

OD \leq ODc; üretici değil

ODc < OD \leq 2xODc; zayıf üretici

2xODc < OD \leq 4xODc; orta düzey üretici

4xODc < OD; güçlü üretici

C6HSL'un AI-2 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Salmonella suşları 5 ml LB besiyerinde (mutantlar, kloramfenikol içeren LB) 18 saat
37 °C'de, aktifleştirildikten sonra kültürler, 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi

ve süperantlar 0.22 µm por çaplı filtreden geçirildi. *V.harveyi* BB170 suşu 18 saat 30 °C'de AB-broth besiyerinde geliştirilerek 1:5000 oranında seyreltildi ve 96 kuyucuklu lüminesan mikropoplaklara doksanar µl olarak dağıtıldı. Kuyulara *Salmonella* suşlarından 10 µl, C6HSL'dan 50 nM konsantrasyonda ilave edildi. Kontrol olarak; yalnızca asetonitril ve yalnızca AB besiyeri içeren kuyular hazırlanarak dört saat boyunca 30 °C'de 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar Perkin-Elmer Victor V3 lüminometre cihazı ile ölçüldü¹⁹.

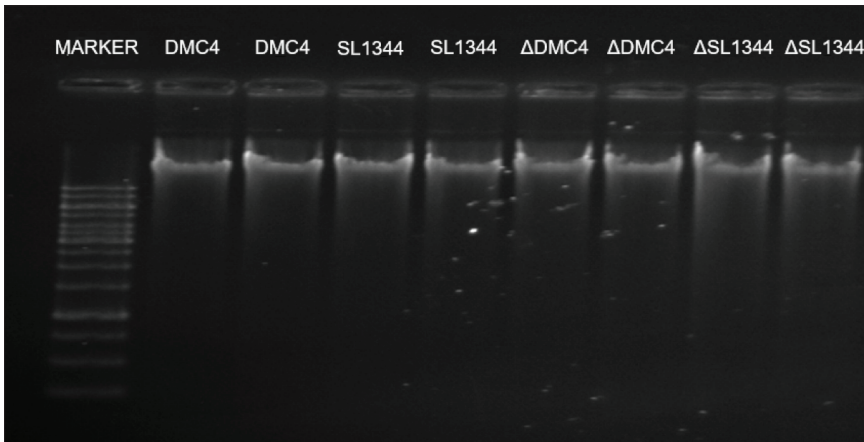
İstatistiksel Analiz

Çalışmada uygulanan tüm deneyler üç bağımsız zamanda, üç paralel tekrar olarak yapıldı. Biyofilm bulgularının ve AI-2 aktivite tespitinin istatistiksel değerlendirilmesinde kümelenmiş tekrarlayan varyans analizi (nested repeated measures ANOVA), gen ifadesinin istatistiksel analizi için ise ANOVA ve Student's t testi kullanıldı.

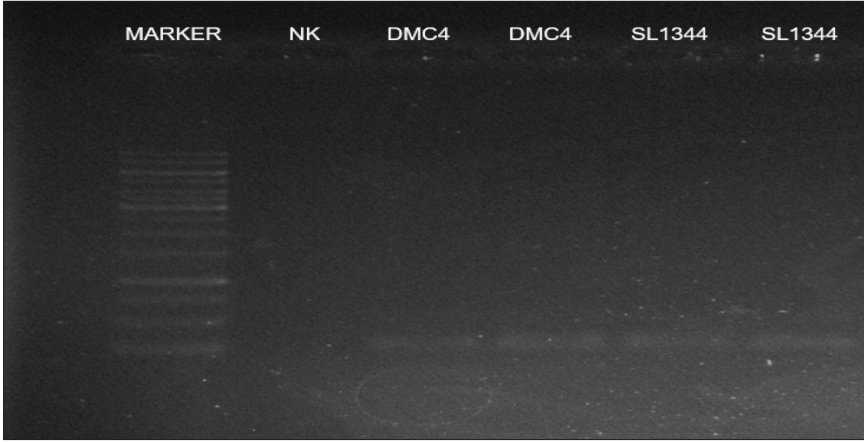
BULGULAR

Kloramfenikol direnç kaseti içeren pKD3 plazmidi, *Escherichia coli* MZ2997 suşundan ve pKD46 plazmidi, *E.coli* DH5α suşundan izole edilmiştir pKD46 plazmidi, *S.Typhimurium* DMC4 ve SL1344 suşlarına elektroporasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Transformantlar, ampisilin (100 µl/mL) içeren Luria-Bertani Agar (LBA) besiyerinde seçilmiştir.

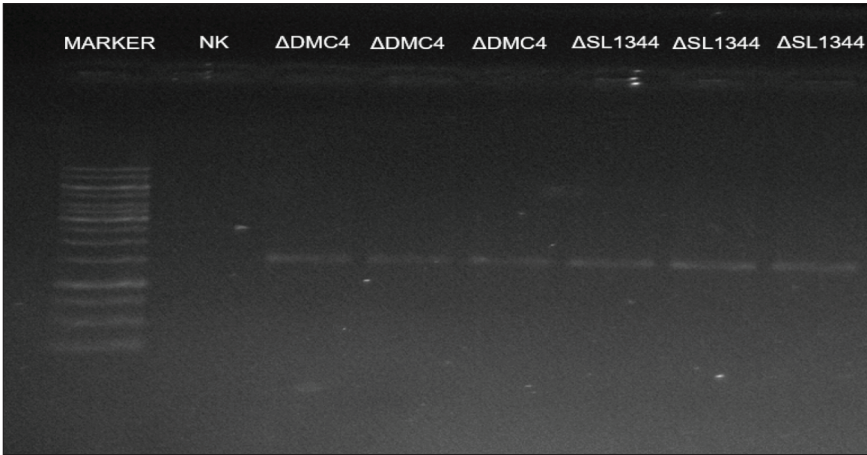
Kloramfenikol direnç kasetinin oluşturulması için pKD3 kalıp olarak kullanılmıştır. Touchdown PCR ile *luxS* gen bölgesine homoloji gösteren primerlere sahip kloramfenikol gen kaseti elde edilmiştir. Kloramfenikol direnç kaseti, pKD46 plazmidini içeren suşlara aktarılmış ve *luxS* geni bakımından mutant suşlar ($\Delta luxS$) elde edilmiştir. Mutant hücrelerde kloramfenikol kasetinin varlığı, *luxS* genine ait doğrulama primerleri kullanılarak kontrol edilmiştir (Şekil 1-3).



Şekil 1. Doğal tip ve mutant suşlardan genomik DNA izolasyonu. 1. kuyu: Moleküler belirteç 1kb DNA; 2. ve 3. kuyu: *S.Typhimurium* DMC4; 4. ve 5. kuyu: *S.Typhimurium* SL1344; 6. ve 7. kuyu: $\Delta luxS$ DMC4; 8. ve 9. kuyu: $\Delta luxS$ SL1344.

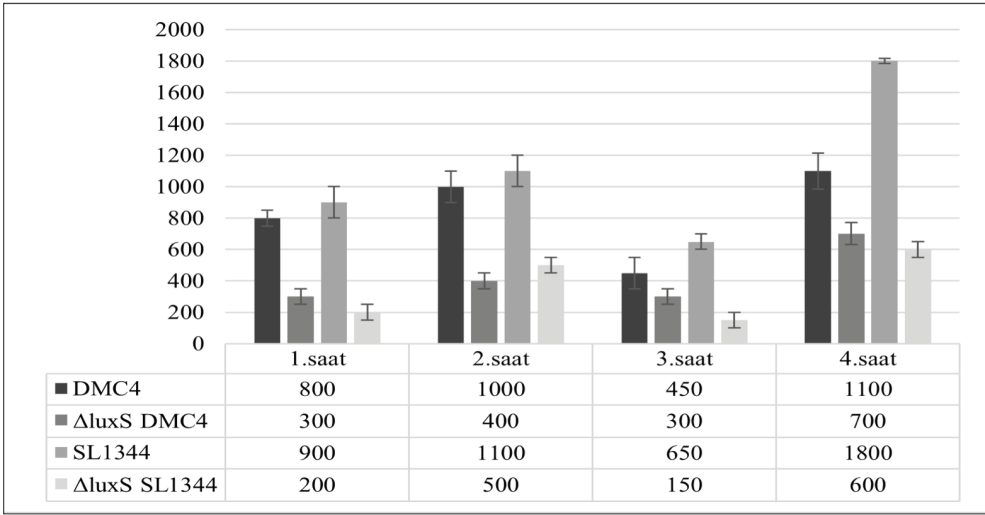


Şekil 2. Doğal tip suşların PCR ürünü [517 baz çifti (bp)]. 1. kuyu: Moleküler belirteç: 1 kb DNA; 2. kuyu: NK: Negatif kontrol; 3. ve 4. kuyu: *S.Typhimurium* DMC4; 5. ve 6. kuyu: *S.Typhimurium* SL1344.



Şekil 3. Mutant suşların PCR ürünü (1104 bp-kloramfenikol gen kaseti). 1. kuyu: Moleküler belirteç: 1 kb DNA; 2. kuyu: NK: Negatif kontrol; 3, 4 ve 5. kuyu: $\Delta luxS$ DMC; 4, 6, 7 ve 8. kuyu: $\Delta luxS$ SL1344.

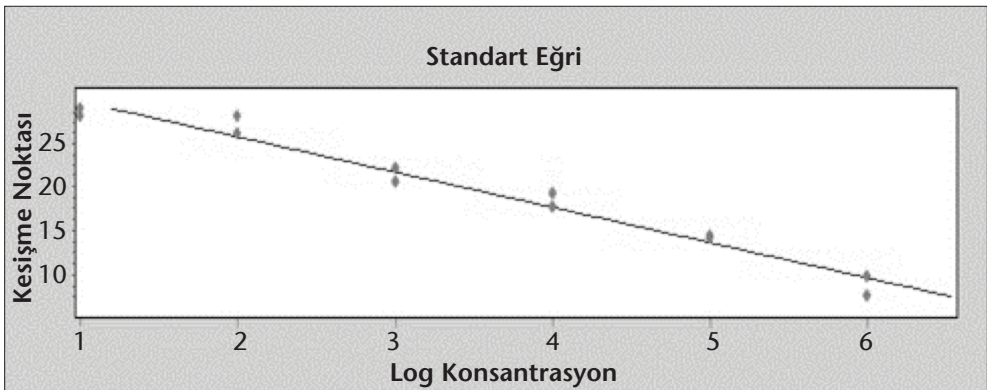
Salmonella suşlarının AI-2 aktivitesi bağımlı ışık ünitesi (Relative Light Unit-RLU) cinsinden saptanmıştır. Mutant suşlarda doğal suşlara kıyasla AI-2 aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 4). Suşların bağımlı otoindüktör aktivitesinin istatistiksel anlamlılığını incelemek için iç içe kümelenmeden dolayı tekrarlayan varyans analizi modeli (nested repeated measures ANOVA) kurulmuştur. Bu analize göre gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak 0.01 güven seviyesinde anlamlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4. Salmonella suşlarının bağlı Al-2 aktivitesi.

S. Typhimurium DMC4, SL1344 ve bu suşların mutantlarından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılmış ve *hilA*, *invA*, *inv*, *glgC*, *fimF*, *fljF*, *lpfA* ve *gyrA* genlerinin ifade seviyeleri rRT-qPCR ile belirlenmiştir. cDNA seri dilüsyonları hazırlanmış ve 16S housekeeping genine ait standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 5).

rRT-qPCR sonucu elde edilen döngü eşik [cycle threshold (Ct)] değerlerinden genlerin mutantlardaki ifadesinde azalmalar olduğu belirlenmiştir. Üç farklı zamanda üç paralel tekrar olarak gerçekleştirilen deneylerin sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). rRT-qPCR veri analizinde Livak metodu kullanılmış, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri belirlenmiştir (Tablo II). Mutant suşların ifade değerlerine "1.00" verilerek normalize edilmiştir. *hilA* geni, DMC4 suşunda mutantına kıyasla 1488.87 kat, SL1344 suşunda



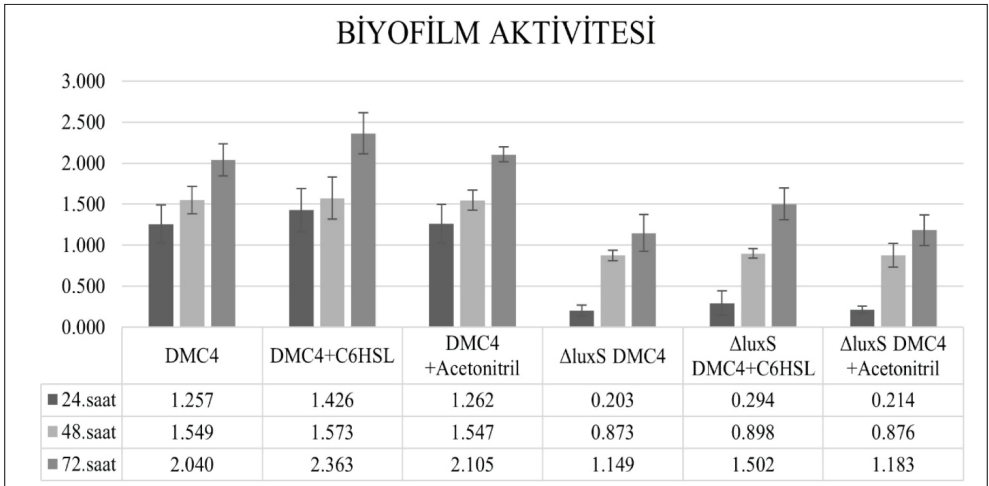
Şekil 5. 16S standart eğri.

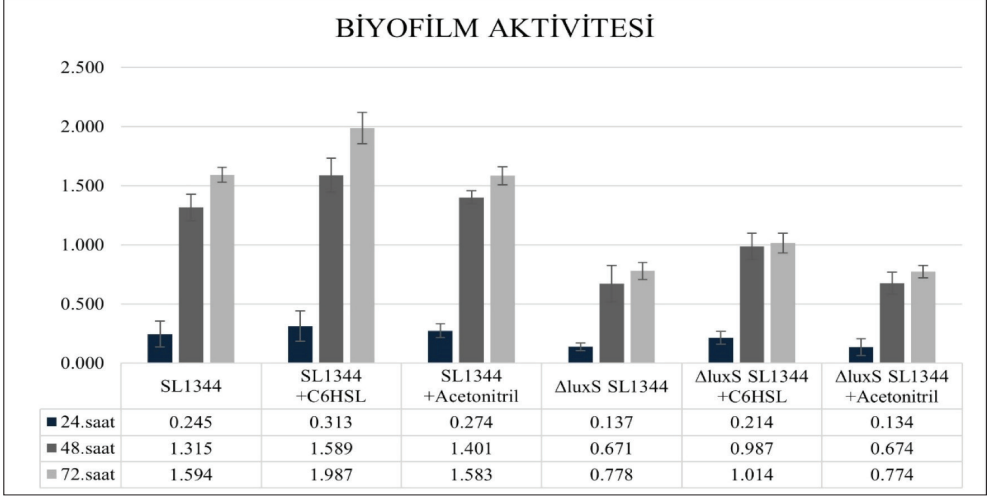
Tablo II. *Biyofilm ve Virülans Genlerinin İfade Seviyelerinin Normalize Edilmiş Kat Farkı (2-ΔΔCt) Değerleri*

Kat Farkı	<i>hilA</i>	<i>inv</i>	<i>invA</i>	<i>flfF</i>	<i>fimF</i>	<i>glgC</i>	<i>lpfA</i>	<i>gyrA</i>
DMC4 WT	1488.87	657.11	2418.67	3104.19	144.01	302.33	418.76	494.56
DMC4 Δ <i>luxS</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SL1344 WT	7858.29	14462.21	112533.9	262144	21769.19	21027.65	13124.73	168.9
SL1344 Δ <i>luxS</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

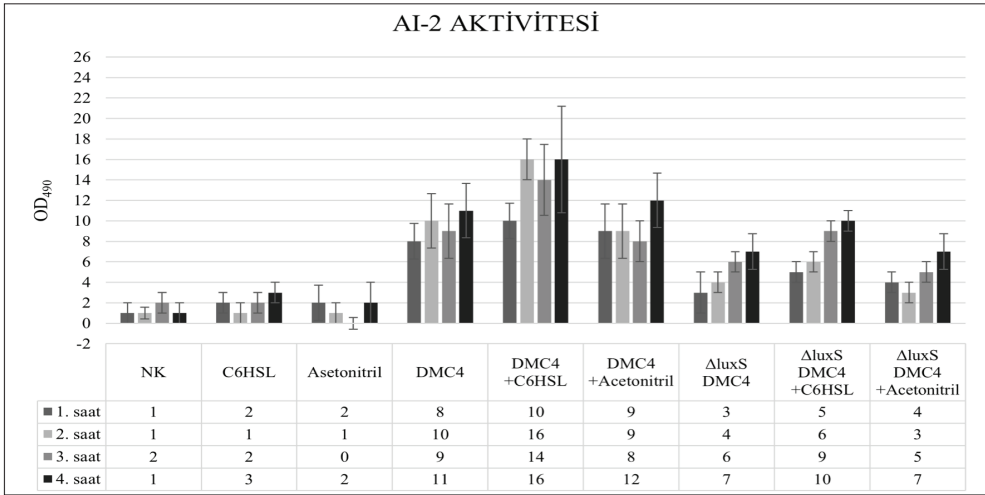
mutantına kıyasla 7858.29 kat daha fazla tespit edilmiştir. DMC4 suşunda mutantına kıyasla, *inv* geni 657.11; *invA* geni 2418.67; *flfF* geni 3104.19; *fimF* geni 144.01; *glgC* geni 302.33; *lpfA* geni 418.76; *gyrA* geni 494.56 kat daha fazla saptanmıştır. SL1344 suşu, mutant suşa kıyasla, *inv* geni, 14462.21; *invA* geni 112533; *flfF* geni 262144; *fimF* geni 21769.19; *glgC* geni 21027.65; *lpfA* geni 13124.73; *gyrA* geni 168.9 kat daha fazla tespit edilmiştir.

S.Typhimurium DMC4 ve mutant suşunun biyofilm oluşumuna C6HSL'un etkisi incelendiğinde, her iki suşta da özellikle 72. saatte bu artışın daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 6). *S.Typhimurium* SL1344 suşunda ise C6HSL etkisiyle biyofilm üretimi 48 ve 72. saatlerde 24. saate oranla daha yüksek düzeyde indüklenmiştir (Şekil 7). Üç farklı zamanda üç tekrarlı olarak yapılan çalışmada, iç içe kümelenmiş varyans analizi (nested repeated measures ANOVA) yapılmıştır. Bu analize göre suşların biyofilm oluşumlarına C6HSL'un etkisi 0.01 güven seviyesinde anlamlı bulunmuştur. *S.Typhimurium* SL1344 suşunun *luxS* geni bakımından mutanti, 24. saatte biyofilm oluşturma kapasitesi bakımından orta düzeyde bulunmuştur. Diğer suşların tamamı ise güçlü biyofilm üreticileri olarak değerlendirilmiştir. Çözücü olarak kullanılan asetonitril biyofilm oluşumunda etkili bulunmamıştır.

**Şekil 6.** C6HSL'un, *S.Typhimurium* DMC4 ve Δ*luxS* suşunun biyofilm aktivitesi üzerine etkisi.



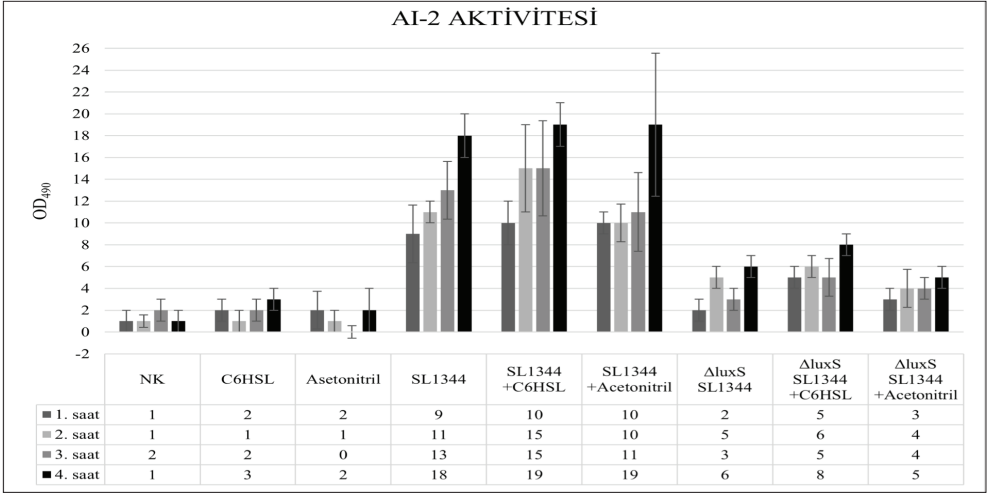
Şekil 7. C6HSL'un, *S.Typhimurium* SL1344 ve $\Delta luxS$ suşunun biyofilm aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 8. C6HSL'un *S.Typhimurium* DMC4 ve $\Delta luxS$ suşlarının AI-2 aktivitesi üzerine etkisi.

C6HSL'un, *S.Typhimurium* DMC4 suşunun otoindüktör aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Artış uygulamanın ikinci saatinde en yüksek seviyede meydana gelmiştir. Bu suşun *luxS* mutantında ise en yüksek artışın 3 ve 4. saatlerde gerçekleştiği saptanmıştır. Çözücü olarak kullanılan asetonitril ise etkisiz bulunmuştur (Şekil 8).

S.Typhimurium SL1344 ve $\Delta luxS$ suşunun C6HSL varlığında, otoindüktör aktivitelerinde artışların meydana geldiği tespit edilmiştir. Doğal suшта bu artış, ikinci saatte en yüksek değere ulaşmıştır. Mutant suшта ise en yüksek otoindüktör aktivite artışı birinci saatte saptanmıştır (Şekil 9). C6HSL'un suşların AI-2 aktivitesine etkileri kümelenmiş tek-



Şekil 9. C6HSL'un, *S.Typhimurium* SL1344 ve $\Delta luxS$ suşlarının AI-2 aktivitesi üzerine etkisi.

rarlayan varyans analizi (nested repeated measures ANOVA) ile incelenmiştir. Sonuçlar 0.01 güven düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

TARTIŞMA

S.Typhimurium, oluşturduğu biyofilm yapısı ile tıbbi, endüstriyel ve çevresel ölçekte ciddi sorunlara yol açmaktadır²¹. Bu sorunlarla mücadelenin oldukça zorlu ve maliyetli olması nedeniyle biyofilm yapılarına karşı daha etkili yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteriyel iletişimin önemli elemanı olan QS mekanizması aydınlatıldıkça, bu sistemde bulunan genlerin aynı zamanda bakterilerin virülans genleriyle düzenli bir ilişkide olduğu görülmüştür²². *luxS* geni, *Salmonella*'da AI-2 adı verilen sinyal moleküllerinin sentezini gerçekleştirir. Bugüne kadar yürütülen birçok araştırmada *luxS* geninin, *S.Typhimurium*, *E.coli* ve *V.harveyi*'de otoindüktör sentezi ve QS iletişimi için gerekli olduğu saptanmıştır²³⁻²⁵.

E.coli ve *S.Typhimurium* ile yapılan çalışmalar AI-2'nin bakterilerin çevreye uyumunu, osmolaritesini, pH dengesini ve karbonhidrat kaynaklarına ulaşım mekanizmasını etkilediğini, bu sayede bu bakterilerin patojenitesinden büyük ölçüde sorumlu olduğunu göstermiştir²⁵. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada mutant *luxS* geninin P1'de bulunan bir takım virülans genlerinin ekspresyon seviyesine etkisine bakılmış ve yapılan rRT-qPCR sonucunda QS için oldukça önemli olan *inv* ve *hilA* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ciddi bir azalma tespit edilmiştir¹². 2023 yılında yapılan bir çalışmada *Salmonella*'nın antibiyotiğe duyarlı bir suşu ile *luxS* mutantında AI-2 aktivitesinin ilaç direnci üzerine olan düzenleyici etkisi rRT-qPCR ile incelenmiş ve AI-2 aktivitesi bakımından yetersiz olan mutant suşların florokinolon antibiyotiklerine dört kat daha hassas oldukları belirlenmiştir²³.

Bu literatür verileri ışığında tasarlanan çalışmada *luxS* geninin, *S.Typhimurium*'da AI-2 sinyal aktivitesi ve PI-kodlanan ve biyofilm oluşumundan, glikoz katabolizmasından, flajella ve fimbria sentezinden ve invazyondan sorumlu genlerin ifade seviyeleri üzerinde yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. *luxS* mutantlarında AI-2 aktivitesinin ve incelenen tüm genlerin transkripsiyon seviyelerinin önemli ölçüde düşmesi ($p < 0.01$), bu genin kodladığı proteinin *S.Typhimurium*'da AI-2 ve PI-I genlerini ve dolayısıyla patojeniteyi pozitif yönde regüle eden global bir regülatör olduğunun net kanıtlarıdır. Özellikle *luxS* geninin *S.Typhimurium*'da PI-II'nin global bir regülatörü olduğuna dair bulgularımız, bu konuda elde edilen ilk bulgulardır.

Salmonella'da QS mekanizmasında üç farklı otoindüktörün işlev gördüğü saptanmıştır. AI-I adı verilen sistemde *Salmonella*, otoindüktör (AHL) sentezi yapamaz ancak SdiA adı verilen AI-I reseptörü bulunur. Bu sayede *Salmonella*, diğer bakterilerden gelen sinyalleri algılayabilmektedir. Bu sinyallerin algılanması sonucu *Salmonella*'nın, biyofilm oluşumunu ve virülans gen ifadesini düzenlediği, değişik araştırmalarda saptanmıştır⁴. Ancak bu çalışmalar çoğu kez AHL sentezleyen bakterilerle birlikte yürütüldüğünden, söz konusu etkinin AHL üreten bakterilerin diğer metabolitleri ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada ise, C6HSL'un dışarıdan tatbiki ile *Salmonella*'nın doğal suş ve *luxS* mutantlarının biyofilm aktivitesinde ve AI-2 sinyal molekülünün sentezinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bakterilerin biyofilm oluşumları değerlendirildiğinde ortamda bulunan C6HSL'un doğal ve mutant suşların biyofilm aktivitelerinde önemli bir artış oluşturduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Ayrıca bu çalışmada, C6HSL'un *S.Typhimurium* DMC4 ve SL1344'ün hem doğal hem *luxS* mutantlarında AI-2 sinyal aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. C6HSL'un, AI-2 sinyal aktivitesini artırarak QS sistemlerinin regülasyonuna katıldığına işaret eden bu bulgu, alanındaki ilk bulgudur ve *Salmonella*'da QS sistemlerinin çevresel uyarıcılara karşı yanıt oluşturmada oynadığı rolün detaylı bir şekilde anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 224-21L0430014 kodlu "Çoğunluğu Algılama Sinyal Yolağının Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Bloke Edilmesinin, *Salmonella*'da Biyofilm Oluşumu ve Virülanslık Üzerine Etkileri" isimli proje kapsamında finansal olarak desteklenmiştir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Almeida FAD, Pimentel-Filho NDJ, Pinto UM, Mantovani HC, Oliveira LLD, Vanetti MCD. Acyl-homoserine-lactone-based quorum-sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella enteritidis* in anaerobic conditions. *Archives Microbiol* 2017; 199: 475-86. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1313-6>
2. Karaboz İ, Sukatar A. Bakterilerde sosyal davranışlar (bakterilerde iletişim mekanizmaları). *Orlab Online Mikrobiyoloji Derg* 2004; 2(5): 23-32.
3. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
4. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum-sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; 77: 73-111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>
5. Akçelik N, Akçelik M. What makes another life possible in bacteria? Global regulators as architects of bacterial biofilms. *World J Microbiol Biotech* 2022; 38(12): 236. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03376-4>
6. Shrout JD, Nerenberg R. Monitoring bacterial twitter: Does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? *Envir Sci Tech* 2012; 46(4): 1995-2005. <https://doi.org/10.1021/es203933h>
7. Huang J, Shi Y, Zeng G, Gu Y, Chen G, Shi L, et al. Acyl-homoserine-lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere* 2016; 157: 137-51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.032>
8. Mina G, Chbib C. Recent progresses on synthesized *luxS* inhibitors: A minireview. *Bioorganic Med Chem* 2019; 27(1): 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.026>
9. Carneiro DG, Almeida FA, Aguiar AP, Vieira NM, Pinto UM, Mendes TA, et al. *Salmonella enterica* optimizes metabolism after addition of acyl-homoserine-lactone under anaerobic conditions. *Front Microbiol* 2020; 11: 1459. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01459>
10. Minamino T, Kinoshita M, Morimoto YV, Namba K. The FlgN-chaperone activates the Na⁺-driven engine of the *Salmonella flagellar* protein export apparatus. *Commun Biol* 2021; 4: 335. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01865-0>
11. Karavolos MH, Bulmer DM, Winzer K. *LuxS* affects flagellar phase variation independently of quorum-sensing in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 2008; 190: 769-71. <https://doi.org/10.1128/JB.01253-07>
12. 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. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0372>
13. Campos-Galvão ME, Ribon AO, Araujo EF, Vanetti MCD. Changes in the *Salmonella enterica* Enteritidis phenotypes in presence of acyl homoserine lactone quorum sensing signals. *Basic Microbiol* 2015; 56: 493-501. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500471>
14. Siriken B. *Salmonella* patojenite adaları. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 181-8. <https://doi.org/10.5578/mb.4138>
15. Has EG, Akçelik N, Akçelik M. Comparative global gene expression analysis of biofilm forms of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and its *seqA* mutant. *Gene* 2023; 853: 147094. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147094>
16. Choi J, Shin D, Ryu S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: The *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. *Infect Immun* 2007; 75(10): 4885-90. <https://doi.org/10.1128/IAI.01942-06>
17. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 2000; 97: 6640-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
18. Sivakumar KK, Jesudhasan PR, Pillai SD. Detection of autoinducer (AI-2)-like activity in food samples. In: Rumbaugh K. (eds). *Quorum sensing. Methods in Molecular Biology*, Humana Press 2011; vol 692. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-971-0_6

19. 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. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
21. Dolapçı İ, Tekeli A, Şahin F, Erdem B. Türkiye'de insanlardan izole edilen *Salmonella enterica* serovar typhimurium suşlarının moleküler özellikleri. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(4): 502-12. <https://doi.org/10.5578/mb.9940>
22. Gao S, Quan Y, Jin W, Shen Y, Yuan S, Wang Y. Al-2 quorum sensing system contributes fluoroquinolones resistance of *Salmonella typhimurium* by regulating metabolism 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3177798/v1>
23. Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1639-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1639>
24. Xavier KB, Bassler BL. *LuxS* quorum sensing: More than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6(2): 191-7. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00028-6)
25. Cao J, Wang L, Sun Z, Kong Q, Wu Z. Transcriptional analysis reveals the relativity of acid tolerance and antimicrobial peptide resistance of *Salmonella*, *Microb Pathog* 2019; 136: 103701. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103701>