

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli* W3110'UN PORİN PROTEİN MUTANTLARINDA BİYOFİLM İLE
İLGİLİ GENLERİN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FIRAT YAVUZ ÖZTÜRK

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2023

10329900

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Escherichia coli* W3110'UN PORİN PROTEİN MUTANTLARINDA BİYOFİLM İLE
İLGİLİ GENLERİN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FIRAT YAVUZ ÖZTÜRK

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2023

10329900

BEYAN

“Escherichia coli W3110’un Porin Protein Mutantlarında Biyofilm ile İlgili Genlerin İfadelerinin Araştırılması” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahriyat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi) X		2022-01.BŞEÜ.04-01	
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/.....	

Fırat Yavuz ÖZTÜRK

31/03/2023

ÖNSÖZ

Akademik kariyerim boyunca kendisini örnek alacağım, çok değerli danışman Hocam Prof. Dr. Cihan DARCAN'a, bana katmış olduğu bilimsel bakış açıları, akademik yönlendirmeleri, yakın ilgisi, şefkati ve teşvikleri için sonsuz teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca, varlıklarını ve desteklerini benden esirgemeyen başta Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ Hocam olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Ardahan ESKİ, Duygu BEKİRCAN ESKİ ve Öğr. Gör. Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN Hocalarıma tek tek sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, burada yazamadığım ve bana çalışmamda katkıda bulunmuş diğer Hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma da teşekkür etmek isterim.

Tez çalışmamın bir kısmının gerçekleştirilmesinde, projeme verdikleri destek için Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi iletiyorum.

2013 senesinden bu yana hayatımda olan ve bana her türlü konuda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, hayata olan bakış açılarımı güzelleştiren ve her ne koşulda olursa olsun yüzümü güldüren yol arkadaşım ve sevgili eşim Şebnem Zeynep ÖZTÜRK'e tüm kalbimle teşekkür ediyorum, iyi ki varsın. Evimizin neşesi ve mutluluklarımızın mimarı küçük oğlumuz Sauron'a, tüm tez yazım sürecimde benimle masa başında beklediği ve beni motive ettiği için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeği olan sevgili anneme, babama ve değerli ağabeyime, sonsuz teşekkürlerimi sunarken, benimle her zaman arkadaşlığını paylaşmış, beni hep desteklemiş, sevgili candan öte dostum Doruk BİLMEN'e hayatımdaki varlığı için teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÖZET

***Escherichia coli* W3110'UN PORİN PROTEİN MUTANTLARINDA BİYOFİLM İLE İLGİLİ GENLERİN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyofilm oluşumu, birçok farklı mekanizmanın ve düzenleyici genlerin dahil olduğu oldukça kapsamlı ve çok hücreli bir oluşumdur. Bu oluşum, besin varlığı, sıcaklık, nem ve pH gibi birçok faktörün varlığından etkilenmektedir. Bu çalışmamızda, *Escherichia coli*'nin sahip olduğu dış zar proteinlerinden *ompA*, *ompC* ve *lamB* porin mutantlarında, biyofilm oluşumunda rol alan genlerin ifade düzeylerindeki değişim araştırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız yabani tip *E. coli* W3110 suşu ve bu suşun *phoE* mutanı, denediğimiz hiçbir koşulda biyofilm oluşturmamakla birlikte, bu suşun *ompA* ve *ompC* mutantları pH 6, 7 ve 8'de, *lamB* mutanı ise sadece pH 7'de biyofilm oluşturmuştur. Mutantlardaki biyofilm mekanizmasının aydınlatılması için pH 6, 7 ve 8'de büyütülen yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının, biyofilmle ilişkili olan genlerinin (*csgD*, *csrA*, *rcsB*, *pgaC*, *qseB*, *qseC*, *sdiA*) ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Buna göre, çalışılan her pH değerinde *ompA* ve *ompC* mutantlarında, *csrA* ve *rcsB* genlerinin azalış gösterdiği, *csgD*, *pgaC* ve *sdiA* genlerinin ise, yabani tipe göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda, *ompA* ve *ompC* mutantlarında, flagellar genlerin düzenleyicisi *qseB* ve *qseC*'nin pH 6 hariç, diğer pH'larda azalış gösterdiği tespit edilmiştir. *qseB* geni pH 6'da her iki mutantta da bir miktar artış gösterirken, *qseC* geni, *ompA* mutantında artış gösterip, *ompC* mutantında azalış göstermiştir. Fazla ekspresyonu biyofilm oluşumunu olumsuz etkileyebilen *qseB* ve *qseC* genlerinin, pH 6'da biraz artış göstermesi, *ompA* ve *ompC* porin mutantlarında biyofilm oluşumunun pH 7 ve 8'e göre biraz azalmasına sebebiyet vermiştir. pH 7'de diğer mutantlarla benzer gen ekspresyonları veren *lamB* mutantında, *qseBC* genlerinin pH 6'da aşırı eksprese olduğu ve pH 8'de ise *csgD* geninin düşük eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bu durumların *lamB* mutantında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Elde edilen ekspresyon verilerinin ışığında, mutantları biyofilm oluşumuna götüren mekanizmalar hakkında görüşler ortaya koyulmuştur. Bu görüşlere göre, *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarının biyofilm oluşturmasında biyofilm ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının biyofilm oluşturmaya uygun şekilde artış ve azalış gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu verilerden biyofilm oluşumunu porinlerin mutant olmasının nasıl indüklediği hususunda henüz bir bilgi elde edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, biyofilm, pH, gen ekspresyonu, porin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EXPRESSIONS OF BIOFILM-RELATED GENES IN PORIN PROTEIN MUTANTS OF *Escherichia coli* W3110

Biofilm formation is a comprehensive and multicellular formation involving many different mechanisms and regulatory genes. This formation is affected by many factors such as nutrient availability, temperature, humidity, and pH. In this study, changes in the expression levels of genes involved in biofilm formation were investigated in *ompA*, *ompC*, and *lamB* porin mutants, which are outer membrane proteins of *Escherichia coli*. The wild-type *E. coli* W3110 strain we used in our study and the *phoE* mutant of this strain did not form biofilms under any of the conditions we tried, but *ompA* and *ompC* mutants of this strain formed biofilms at pH 6, 7, and 8, while the *lamB* mutant only formed biofilm at pH 7. To elucidate the biofilm mechanism in mutants, changes in the expression levels of biofilm-associated genes (*csgD*, *csrA*, *rcsB*, *pgaC*, *qseB*, *qseC*, *sdiA*) of wild-type *E. coli* W3110 and porin mutants grew at pH 6.7 and 8 were investigated. Accordingly, it was determined that *csrA* and *rcsB* genes decreased in *ompA* and *ompC* mutants at every pH value studied, while *csgD*, *pgaC*, and *sdiA* genes increased compared to wild-type. Also, in *ompA* and *ompC* mutants, the regulators of flagellar genes *qseB* and *qseC* decreased at other pHs except pH 6. While the *qseB* gene increased slightly in both mutants at pH 6, the *qseC* gene increased in the *ompA* mutant and decreased in the *ompC* mutant. The overexpression of *qseB* and *qseC* genes, whose overexpression may negatively affect biofilm formation, slightly increased at pH 6, resulting in a slight decrease in biofilm formation in *ompA* and *ompC* porin mutants than at pH 7 and 8. It was determined that in the *lamB* mutant, which gave similar gene expressions with other mutants at pH 7, the *qseBC* genes were overexpressed at pH 6 and the *csgD* gene was underexpressed at pH 8. These conditions were determined to inhibit biofilm formation in the *lamB* mutant. In line with the obtained expression data, opinions about the mechanisms that lead mutants to biofilm formation were put forward. According to these views, it was determined that the expression of biofilm-related genes increased and decreased in the biofilm formation of *ompA*, *ompC*, and *lamB* mutants by biofilm formation. However, from these data, no information has yet been obtained about how the mutant porins induce biofilm formation.

Keywords: *Escherichia coli*, biofilm, pH, gene expression, porin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	2
2.1.1. Tutunma.....	2
2.1.1.1. Dönüşümlü Tutunma.....	2
2.1.1.2. Geri dönüşümsüz Tutunma.....	3
2.1.2. Biyofilm Olgunlaşması.....	5
2.1.3. Biyofilm Dağılması (Ayrılma).....	6
2.2. <i>E. coli</i> Biyofilm Oluşumu.....	7
2.3. <i>E. coli</i> Biyofilmlerinin Oluşumunda Yer Alan Çevresel Sinyaller ve Düzenleyici Ağlar.....	11
2.3.1. Sinyaller.....	11
2.3.1.1. Mekanik Sinyaller.....	11
2.3.1.2. Besin Varlığı ve Metabolik İpuçları.....	12
2.3.1.3. İnorganik Moleküller.....	13
2.3.1.4. Ozmolarite.....	13
2.3.2. İkincil Haberciler ve Küçük Moleküller.....	13
2.3.2.1. Siklik di-GMP.....	14

2.3.2.2. Asetil Fosfat	14
2.3.2.3. Alarmon ppGpp.....	14
2.3.2.4. N-Asetil-Glukozamin ve N-Asetilglukozamin-6-P.....	15
2.3.3. Düzenleyici Ağlar	15
2.3.3.1. İki Bileşenli Düzenleyici CpxRA Sistemi	15
2.3.3.2. İki Bileşenli Düzenleyici Rcs Sistemi	16
2.3.3.3. İki Bileşenli Düzenleyici EnvZ / OmpR Sistemi	16
2.3.3.4. H-NS ve RpoS	16
2.4. Yeterli Çoğunluk Algılama (Quorum Sensing)	16
2.5. <i>E. coli</i> Porin Proteinlerinin Biyofilm Oluşumuyla İlişkisi.....	18
2.6. Çalışmanın Amacı	23
3. MATERYAL METOT	24
3.1. <i>Escherichia coli</i> suşları	24
3.2. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar.....	24
3.2.1. LB agar besiyeri	24
3.2.2. LB broth besiyeri	24
3.2.3. Tris-Borat-EDTA (TBE) elektroforez tamponu	25
3.2.4. Tris-HCl tamponu.....	25
3.2.5. Tris-EDTA (TE) tamponu.....	25
3.2.6. IPTG (izopropil β -D-1-tiyogalaktopironasid) solüsyonu.....	25
3.2.7. pH tamponlarının hazırlanması	25
3.2.7.1. 4-Morfolin etan sülfonik asit (MES) tamponu	25
3.2.7.2. 3-morfolin propan-1-sülfonik asit (MOPS) tamponu	25
3.2.7.3. N-tris (hidroksimetil) metilglisin (tricine) tamponu	26
3.3. Koloni PZR.....	26
3.4. Agaroz jel elektroforezi.....	28

3.5. Biyofilm oluşumunun tespiti (tüp metodu)	28
3.6. Biyofilm ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi	29
3.6.1. Total RNA izolasyonu	29
3.6.2. Total RNA eldesinin kontrolü	30
3.6.3. cDNA sentezi	30
3.6.4. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için primerler tasarlanması	30
3.6.5. Kantitatif gerçek zamanlı PZR	31
3.7. İstatiksel analiz ve sonuçların değerlendirilmesi	32
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	33
4.1. Sonuç	33
4.1.1. Yabani Tip ve Mutant Suşların Doğrulanması	33
4.1.2. pH Değişiminin Yabani Tip ve Mutant Suşların Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	36
4.1.3. Porin Mutantlarında Biyofilm Oluşumunda Rol Alan Genlerin Araştırılması	42
4.2. Tartışma	63
4.2.1. <i>E. coli</i> Suşlarında Biyofilm Oluşumu	65
4.2.2. Porin Mutantlarının Biyofilm Oluşturmasında Biyofilm ile İlgili Genlerin Rollerinin Araştırılması	66
4.2.3. Porin Mutantlarında Biyofilm Oluşumunun Olası Düzenleyici Yolları	72
4.3. Öneriler	75
KAYNAKÇA	77

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar.....	24
Tablo 3.2. Koloni PZR reaksiyon karışımı (1 örneklilik).....	26
Tablo 3.3. PZR (Thermo) döngü koşulları	27
Tablo 3.4. Koloni PZR primerleri	27
Tablo 3.5. Biyofilm oluşumu derecelendirmesi	29
Tablo 3.6. cDNA sentezi inkübasyon koşulları.....	30
Tablo 3.7. Kantitatif gerçek zamanlı PZR’da kullanılan primerlerin dizileri	31
Tablo 3.8. Kantitatif gerçek zamanlı PZR bileşenleri ve miktarları.....	32
Tablo 3.9. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sıcaklık döngüsü.....	32
Tablo 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 6’da inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki pH değişimleri.....	37
Tablo 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 7’de 24 inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki pH değişimleri.....	39
Tablo 4.3. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 8’de inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki pH değişimleri.....	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları	7
Şekil 2.2. <i>E. coli</i> 'de biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde rol oynayan anahtar genler ve ürünleri	18
Şekil 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve gen mutantlarının ileri ve geri primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ın jel elektroforez görüntüsü	33
Şekil 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve gen mutantlarının ileri ve K1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ın jel elektroforez görüntüsü	34
Şekil 4.3. W3110 pLATE51 mutantlarının ileri ve geri primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ın jel elektroforez görüntüsü.....	35
Şekil 4.4. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların pH 6 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu	36
Şekil 4.5. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 7 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu	38
Şekil 4.6. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 8 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu	40
Şekil 4.7. pH 7'de biyofilm oluşturan porin mutantlarında biyofilm ile ilişkili genlerin ifadeleri	72
Şekil 4.8. MarA üzerinden biyofilm oluşumunun kontrolü	74

GRAFİKLER LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 6'da inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki biyofilm oluşumları.....	37
Grafik 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 7'de inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki biyofilm oluşumları.....	39
Grafik 4.3. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 8'de inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki biyofilm oluşumları.....	41
Grafik 4.4. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>csrA</i> geninin ekspresyon seviyesi	43
Grafik 4.5. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>csrA</i> geninin ekspresyon seviyesi	44
Grafik 4.6. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>csrA</i> geninin ekspresyon seviyesi	45
Grafik 4.7. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>rcsB</i> geninin ekspresyon seviyesi	46
Grafik 4.8. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>rcsB</i> geninin ekspresyon seviyesi	47
Grafik 4.9. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>rcsB</i> geninin ekspresyon seviyesi	48
Grafik 4.10. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>sdiA</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	49
Grafik 4.11. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>sdiA</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	50
Grafik 4.12. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>sdiA</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	51
Grafik 4.13. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>qseB</i> geninin ekspresyon seviyesi	52
Grafik 4.14. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>qseB</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	53
Grafik 4.15. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>qseB</i> geninin ekspresyon seviyesi	54
Grafik 4.16. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>qseC</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	55
Grafik 4.17. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>qseC</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	56
Grafik 4.18. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>qseC</i> geninin ekspresyon seviyesi.....	57
Grafik 4.19. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>pgaC</i> geninin ekspresyon seviyesi	58
Grafik 4.20. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>pgaC</i> geninin ekspresyon seviyesi	59
Grafik 4.21. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>pgaC</i> geninin ekspresyon seviyesi	60
Grafik 4.22. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>csqD</i> geninin ekspresyon seviyesi	61

Grafik 4.23. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *cs**gD* geninin ekspresyon seviyesi 62

Grafik 4.24. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *cs**gD* geninin ekspresyon seviyesi 63

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
AcP	: Asetil fosfat
AdrA	: Antibiyotik bağımlı düzenleyici A
Ag43	: Antijen 43
AHL	: Açıl Homoserin Lakton
AI	: Otoindükleyici
AI-1	: Otoindükleyici 2
AI-2	: Otoindükleyici 1
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
BamA	: Dış zar montaj faktörü A
BcsA	: Selüloz Sentaz A
BcsB	: Selüloz Sentaz B
CA	: Kataliz yardımcısı
c-di-GMP	: Siklik-diguanilik asit
cDNA	: Komplementer deoksiribo nükleik asit
CpxA	: Hücre zarfı stres yanıtı A
CpxR	: Hücre zarfı stres yanıtı R
CpxRA	: CpxA ve CpxR'den oluşan iki bileşenli düzenleyici
CsgA	: Curliye özgü gen A
CsgB	: Curliye özgü gen B
CsgD	: Curliye özgü gen D
CsrA	: Karbon depolama regülatörü A
DEPC'li dH₂O	: Dietil pirokarbonat ile işlenmiş

dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EnvZ	: Ozmolarite sensör proteini
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
EPI	: Epinefrin
EtBr	: Etidyum bromür
F Pilus	: Konjugatif pili
f	: Forward (ileri)
<i>flhDC</i>	: Flagella genlerinin ana operonu
f-r primerleri	: İleri-geri primerleri
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	: Gram
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopironasid
Km	: Kanamisin
L	: Litre
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
LamB	: Maltoporin
LB	: Luria Bertani
LPS	: Lipopolisakkaritler
MDB	: Membran tuz giderme tamponu
MES	: 4-Morfolin etan sülfonik asit

mg	: Miligram
Mg⁺²	: Magnezyum
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mol	: Moleküler ağırlık birimi
MOPS	: 3-morfolin propan-1-sülfonik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
mV	: Milivolt
NaCl	: Sodyum klorür
NagC	: <i>N</i> -asetilglukosamin, transkripsiyonel ikili düzenleyici
NE	: Norepinefrin
OD	: Optik dansite
OM	: Dış zar (outer membrane)
OmpA	: Dış membran proteini A
OmpC	: Dış membran proteini C
OmpF	: Dış membran proteini F
OmpG	: Dış membran proteini G
OmpR	: Dış membran proteini R
OmpT	: Dış membran proteini T
OmpX	: Dış membran proteini X
OsmB	: Ozmotik olarak indüklenebilir lipoprotein B
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PGA	: 1,6- <i>N</i> -asetil-D-glukozamin polimeri
PgaA	: 1,6- <i>N</i> -asetil-D-glukozamin polimeri taşıyıcı 1
PgaB	: 1,6- <i>N</i> -asetil-D-glukozamin polimeri taşıyıcı 2

PgaC	: 1,6- <i>N</i> -asetil-D-glukozamin sentaz
pH	: Potansiyel hidrojen iyonu
PhoE	: Dış zar fosfopirin
PIA	: Polisakkarit hücreler arası adezinler
PNAG	: Poli- <i>N</i> -asetil- β -(1-6)-glukozamin
ppGpp	: Guanozin 5'-difosfat 3'-difosfat
pppGpp	: Guanozin 5'-trifosfat 3'-difosfat
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
QS	: Çoğunluk algılama (quorum sensing)
QseB	: Yeterli çoğunluk algılama düzenleyici B
QseC	: Yeterli çoğunluk algılama düzenleyici C
RcsA	: Kapsül sentezi düzenleyicisi A
RcsB	: Kapsül sentezi düzenleyicisi B
RcsC	: Kapsül sentezi düzenleyicisi C
RcsD	: Kapsül sentezi düzenleyicisi D
RcsF	: Kapsül sentezi düzenleyicisi F
rDNase	: Rekombinant deoksirboznükleaz
RNase	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SdiA	: Otoindükleyici yanıt düzenleyicisi homologu
TA	: Teikoik asit
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TibA	: Adezin ototransportör proteini

Tricine	: Tris (hidroksimetil) metilglisin
TRIS	: Tris (hidroksimetil) aminometan
Tris-HCl	: Tris hidroklorik asit
UDP	: Üridin difosfat
UDP-Glc	: Üridin difosfat – aktif glikoz
<i>uidA</i>	: Beta-glukuronidaz
UPEC	: Üropatojenik <i>E. coli</i>
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Biyofilmler, kendi ürettiği polimerik matriks içerisinde gömülmüş şekilde bulunan ve canlı veya cansız yüzeyler ile ilişkili mikroorganizma topluluklarıdır (Costerton vd., 1995; Costerton vd., 1999; Kostakioti vd., 2013). Biyofilm içerisinde yer alan bakteriler, yapılandırılmış, birlikte hareket eden, işlevsel topluluklar oluşturan yüksek düzeyde bir organizasyona sahip biyolojik çok hücreli, koordine bir sistem oluştururlar (O'Toole vd., 2000). Popülasyondaki organizmaların ve hücre dışı polimerik maddelerin oluşturduğu matriks homojen veya heterojen olabilmektedir. Bu matriks yapısının içerisinde bulunan organizmalar, biyofilmin kendilerine sağladığı pek çok koruyucu avantajdan da faydalanırlar. Serbest yüzen bakterilerle karşılaştırıldığında, biyofilm içerisindeki bakteriler fagositoza, besin yoksunluğuna, pH değişikliklerine, biyositlere ve antimikrobiyalere karşı daha dayanıklı ve daha kararlı olarak varlıklarını sürdürürler (Costerton vd., 1995; Costerton vd., 1999).

Bakteriyel biyofilmler birçok çevrede yaygın olarak bulunur ve birçok endüstriyel aktivitede önemli roller oynar (Satpathy vd., 2016). Süt endüstrisinde biyofilm oluşumu, gıdaların ve ekipmanların bozulması nedeniyle ciddi hijyen sorunlarına ve ekonomik kayıplara yol açabilmektedir (Mazaheri vd., 2021). Gıda ile temas eden yüzeylerde oluşan biyofilmlere katılan gıda kaynaklı bazı patojenlerin kalıcılığı gıda ürünlerinin kalitesini, miktarını ve güvenliğini etkilemektedir. Tıbbi açıdan bakıldığında, kateterler, protez kalp kapağı ve kontakt lensler gibi birçok farklı tıbbi implant üzerinde biyofilm oluşumu gözlenebilir. Bu enfeksiyonların tedavisi genellikle sadece implantın çıkarılmasıyla sağlanabilmektedir. Bu durum hastanın sağlığını etkilediği gibi hastalığın tedavi maliyetinin de artmasına neden olmaktadır (Satpathy vd., 2016). Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar, boru hatlarında ve tanklarda metallerin korozyona uğramasına neden olan kimyasal ve biyolojik reaksiyonları katalize ederler. Biyofilmlerin plakalı ısı eşanjörlerinde ve boru hatlarında kalınlaşması, ısı transfer verimliliğinin önemli ölçüde azalmasına neden olarak ısı değişim tesislerinin maliyetlerini arttırmaktadır (Pinel vd., 2021).

Biyofilmler, sebep oldukları birçok olumsuz etkiye rağmen ekolojide ve doğanın sürdürülebilirliğinde önemli bir role sahiptir. Atık suların arıtılması, bitki koruma ve büyüme teşviği, petrol ve benzin sızıntılarının temizlenmesi (biyoremediasyon), altın gibi değerli metallerin çıkarılması ve korozyonun önlenmesi ve kontrolü gibi birçok faydalı yönleri bulunmaktadır (Muhammad vd., 2020).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu 3 ana aşamada gerçekleşmektedir. (i) tutunma, (ii) olgunlaşma, (iii) ayrılma. Tutunma aşaması, iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta, tutunma gerçekleşir, tutunan hücrelerin yüzeye olan bağlantıları zayıftır ve yüzeyden ayrılabilirler (tersine çevrilebilir). Tutunmanın ikinci basamağında ise yüzeyden ayrılmayan bakteriler, biyofilm yapısının erken gelişimini gerçekleştirmektedir. Bu basamakta mikrokoloni oluşumu gözlemlenir ve bu basamak geri döndürülemez. Bir sonraki aşamada, mikrokoloni gelişip olgunlaşır ve biyofilm olgun bir hal alır. Son olarak, ortamın sıcaklığının değişmesi, besin maddelerinin azalması ve oksijen eksikliği gibi durumların oluşması hücrelerin planktonik formlarına geri dönmesine neden olabilir bu durumda da biyofilm oluşumunun üçüncü aşaması yani biyofilmin dağılması gerçekleşir (Kostakioti vd., 2013; Rabin vd., 2015; Sharma vd., 2016; Öztürk vd., 2022).

2.1.1. Tutunma

Tutunma adımı, iki aşamalı bir süreç olarak kategorize edilmektedir: dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma. Geri dönüşümsüz tutunma aşamasındaki biyofilm, daha güçlü fiziksel veya kimyasal kaydırıcı kuvvetleri tolere edebilmektedir (Rabin vd., 2015; Yin vd., 2019).

2.1.1.1. Dönüşümlü Tutunma

Biyofilm, uygun besin koşullarına sahip herhangi bir ortamda oluşabilir. Hücrelerin tutunma yüzeyleri metal, cam, plastik, tıbbi implantlar, paslanmaz çelik gibi abiyotik veya epitel hücreleri, insan derisi ve hayvan dokuları gibi biyotik olabilir. Ortamın sıcaklık, pH ve iyonik kuvveti gibi çevresel koşulların dışında, sıvı bir ortamda biyofilm oluşumunu engelleyen itici elektrostatik ve hidrodinamik kuvvetler bulunmaktadır (Sharma vd., 2016). Aynı zamanda bakteri yüzeyinin bileşenleri de bakterinin yüzeyden uzaklaşmasını veya yakınlaşmasını etkileyen başka bir faktördür (Kostakioti vd., 2013). Yüzeye bağlanmak için mikroorganizmaların bu itici kuvvetlerin üstesinden gelmesi gerekmektedir (Sharma vd., 2016). Mikroorganizmalar yüzeye tersine çevrilebilir bir şekilde bağlanırken, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve EPS'nin yapışkan doğası gibi fiziksel kuvvetlerden faydalanırlar (van Wolferen vd., 2018; Rodrigo-Navarro vd., 2021). Bakteriyel hareketi sağlayan kamçı benzeri ipliksi bir uzantı olan flagella, hücre-yüzey etkileşimlerini engelleyebilecek itici kuvvetlerin üstesinden gelerek hücrelerin yüzeylere yapışmasını

sağlayabilmektedir (Haiko ve Westerlund-Wikström, 2013). Kostakioti ve arkadaşları (2013), hareketli bakterilerin hidrodinamik ve itici kuvvetleri, flagellası olmayan bakterilere nazaran daha kolay aştığını tespit etmiştir. Flagellar motilitenin ilk bağlanma için önemli olduğu, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* ve *E. coli*'de dahil birçok patojende gösterilmiştir (O'Toole ve Kolter, 1998; Shi vd., 2018; Lai vd., 2020; Thi vd., 2020; Mazaheri vd., 2021; Ozer vd., 2021). *L. monocytogenes*'in flagellası olmayan mutantları, kısa süreli inkübe edildiklerinde yüzey yapışmaları bozulmaktadır. Bununla birlikte, daha uzun süre inkübe edilen, flagellası olmayan mutant hücreler, flagellalı hücreler ile neredeyse aynı seviyede bir yüzey kaplamasına ulaşmaktadır. Bu durum, flagella varlığının ilk ve erken bağlanma için çok önemli olduğunu göstermektedir (Guan vd., 2023). *L. monocytogenes* üzerine yapılan çalışmada da görüldüğü üzere, motilite, yapışma için önemli bir faktördür, ancak hareketsiz bakteriler de sağlam yapışma faktörlerinin ifadesiyle yüzeylere yapışabilmektedir (Sharma vd., 2016). Flagella, *E. coli*'nin aktif hareketliliği için bir mekanizma görevi görür ve *E. coli* ile yüzey arasındaki etkileşimi artırır. Böylece yapışma için ilk hücre-yüzey temasının sağlanmasında görev alır (Beloïn vd., 2008). Ancak "ilk bağlanma" dinamik ve geri dönüşümlüdür, bu sırada bakteriler hidrodinamik kuvvetler, itici kuvvetler veya besin mevcudiyetine yanıt olarak ayrılabilir ve planktonik popülasyona yeniden katılabilirler (Cohen vd., 2019; Lin vd., 2021; Li vd., 2023).

2.1.1.2. Geri dönüşümsüz Tutunma

Geri dönüşümsüz bağlanma, dipol-dipol etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlara ek olarak bakteriyel yüzey bileşenlerinin ve adezinlerinin katılımıyla gerçekleşmektedir (Arciola vd., 2018; Reddy vd., 2019). Bakteri hücreleri genellikle negatif yüklüdür ve bu nedenle zıt yüklü yüzeylerde itici kuvvetlerin üstesinden gelip kolonizasyon oluşturma şansları daha yüksektir. Kolonizasyona aracılık eden bir başka faktör olan bakteri yüzey bileşenleri ise bakteriden bakteriye değişiklik göstermektedir (Arciola vd., 2018). Gram-negatif bakterilerin dış zarlarında, O-antijen, çekirdek ve lipid A olmak üzere üç kısma ayrılan lipopolisakkaritler (LPS) bulunmaktadır. Teikoik asit (TA) ise Gram-pozitif bakterilerin hücre duvar yapılarında yer almaktadır. Bakterilerin dış yüzeyinde bulunan LPS ve TA sayesinde, hücrelerin yüzeylere yapışmasına ve bu sayede biyofilm oluşturulmasına yardımcı olan yükler oluşturulur (Ruhail ve Kataria, 2021). Bakterilerin yüzeyinde, hücre yüzeyinden hücre dışı ortama uzanan farklı adezinler bulunmaktadır. Şimdiye kadar, flagella, pili/fimbriae ve fimbriyal olmayan adezinler dahil olmak üzere bakterilerin adezin yapılarının biyofilmlerin gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir (Berne vd., 2015). Bu yüzey organellerinin varlığı,

bakteri hücrelerinin substratlarla ilk fiziksel teması kurmasına yardımcı olmaktadır (Petrova vd., 2012; Berne vd., 2015; Carniello vd., 2018). Hücre yüzey adezinlerinden pili/fimbria, bakterilerin birbirine bağlanmasını ve erken hücre yüzey bağlantılarının oluşmasını sağlayan filamentli uzantılardır (Maldarelli vd., 2016; Lam vd., 2019). *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus agalactiae*'de pili, yüzeylere erken bağlanmalarda önemli roller oynamaktadır (Maldarelli vd., 2016; Pakharukova vd., 2018; Gori vd., 2020). *E. coli*'nin yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanmasında önemli bir rol oynayan curli fimbriae, antijen 43 ve tip 1 fimbria'nın ilk yüzey yapışmasını arttırdığı bulunmuştur (Heras vd., 2014; Carter vd., 2016). Ayrıca, bazı bakterilerdeki farklı adezinler, kalıcı yüzey tutunmasına aracılık etmektedir. Buna örnek olarak, *Caulobacter crescentus*'ta ilk katmanın oluşumuna holdfast adı verilen güçlü bir yapışkan polisakkarit aracılık etmektedir. *S. epidermidis* tarafından üretilen polisakkarit hücreler arası adezinler (PIA) ise hücreden hücreye bağlanma ve ardından biyofilm gelişimi için gereklidir (Karatan ve Watnick, 2009).

Çoğunluk algılama (Quorum Sensing=QS) adı verilen bir hücreden hücreye sinyal mekanizması, bakteriyel biyofilm oluşumunu başlatmak için hücreleri tek tek koordine etmektedir (Abraham, 2016). Bakteriler QS mekanizması sayesinde, popülasyon içerisinde hücreden hücreye iletişimi sağlayan kimyasal sinyaller (otoindükleyiciler, AI'ler) gibi ilk habercileri sentezler ve bu ilk habercileri hücre dışarısına bırakırlar (Li ve Tian, 2012; Pappenfort ve Bassler, 2016). Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler, biyofilm oluşumunu düzenlemek için hücreden hücreye sinyal mekanizmalarından yararlanırlar. Gram-negatif bakteriler esas olarak açil homoserin laktonları (AHL'ler) kullanırken, Gram-pozitif bakteriler hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler tarafından kullanılabilen evrensel AI'ler olan oligopeptidleri kullanırlar (Muhammad vd., 2020).

Geri dönüşümsüz tutunma, tutunmuş bakteri hücrelerinin QS'si tarafından düzenlenen EPS üretimi sayesinde gelişir. Biyofilm hücre dışı matriksinin önemli bir bileşeni olan EPS, bakteriler tarafından sentezlendikten sonra hücre dışarısına salgılanır. Hücre dışına salgılanan EPS, iyon köprüleme etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler yoluyla bakterilerin birbirine yapışmasını sağladığı gibi, bakterilerin yüzeylere de yapışmasını kolaylaştırmaktadır (Fahs vd., 2014; Costa vd., 2018). Genel olarak EPS, yüzeylere yapışma, hücre-hücre tanıma, biyofilm oluşumu, biyofilm yapısı, suyun tutulması, sinyalleşme, hücrelerin korunması ve genetik değişimlerde kritik rollere sahiptir (Muhammad vd., 2020).

Polisakkaritler, proteinler, DNA'lar, lipidler ve diğer polimerik bileşikler dahil olmak üzere, EPS'nin ana bileşenleri bakteri türlerine ve çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Muhammad vd., 2020). EPS matrisinin önemli bir bileşeni olan polisakkaritler, birçok bakterinin biyofilm gelişiminde ve büyümesinde önem arz etmektedir (Flemming, 2016).

2.1.2. Biyofilm Olgunlaşması

Geri dönüşümsüz tutunmadan sonra, tutunan bakteri hücreleri bölünerek çoğalırlar ve artan EPS üretimiyle birlikte mikrokolonilerin oluşumu gerçekleşir (Trebino vd., 2021). Mikrokoloni oluşumuyla eş zamanlı olarak, hücre dışı matrisin oluşumunda rol oynayan genlerin ekspresyonları da tetiklenir ve biyofilm oluşumuna katılan hücre dışı matriks elemanları düzenlenir (Kostakioti vd., 2013; Trebino vd., 2021). Hücre dışı elemanların düzenlenmesiyle, hücre dışı matriksin oluşumu gerçekleşir ve devamında biyofilmin üç boyutlu yapısı şekillenir (Sharma vd., 2016). Matris oluşumunu, dolaşım sistemleri gibi davranan, besinleri hücre topluluklarına taşıyan ve istenmeyen ürünleri uzaklaştıran su dolu kanalların oluşumu izler (Corsini vd., 2022). Biyofilmin ilk tabakası oluşturulduğunda, aynı türün veya diğer türlerin hücreleri biyofilm yapısına dahil olurlar. Bu sayede, biyofilm, ince bir tabakadan "mantar" veya "kule" şeklinde bir yapı oluşturacak şekilde büyür (Rabin vd., 2015).

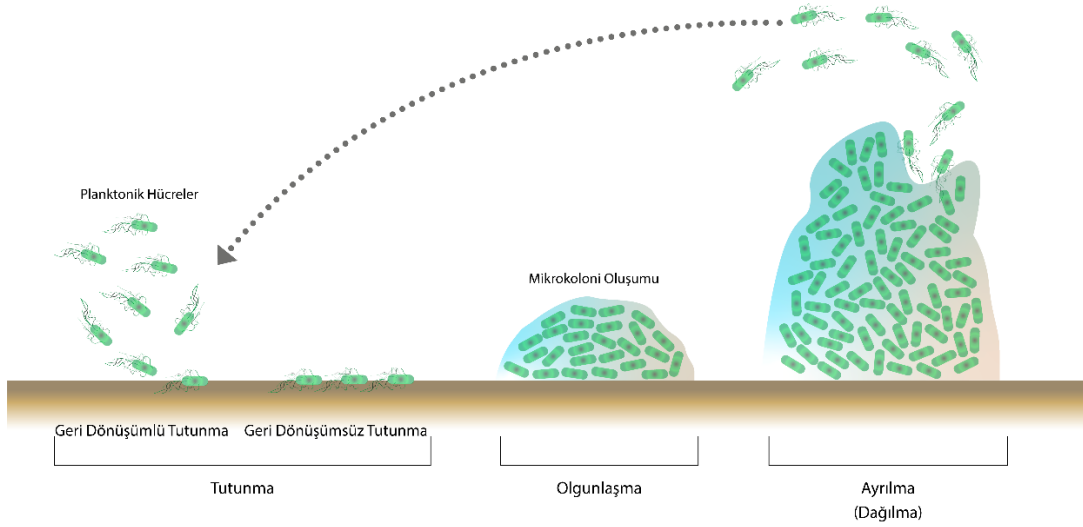
Biyofilm yapısı, çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, biyofilm çalışmalarında model olarak kullanılan *P. aeruginosa*, oksik koşullar altında çubuk şekilli hücrelerle makrokoloniler oluşturur ve makrokolonilerin arasında oluşan kanallar, mantar şeklinde bir yapı oluşturur. Diğer bir yandan, *P. aeruginosa*, anoksik koşullar altında uzun filamentli hücreleriyle makrokoloniler oluşturur ve oluşan bu makrokolonilerin arasında kalan kanallar, üç boyutlu ağ benzeri bir yapı meydana getirir (Yawata vd., 2008; Toyofuku vd., 2016). Biyofilm içerisindeki bu morfolojik değişiklikler, biyofilm içerisinde maddelerin yayılabilirliğini değiştirir. Bu sayede besin ve atık ürünlerin değişimi optimize edilerek oksik veya anoksik koşullar altında metabolik adaptasyon sağlanmış olur (Toyofuku vd., 2016).

Kalın bir biyofilimde, bakteriler metabolizmalarına ve oksijen toleranslarına göre konumlanırlar. Örneğin anaerobik bakteriler oksijene maruz kalmamak için daha derin katmanlara yerleşirler. Biyofilm toplulukları içinde bulunan bakteriler birbirleriyle iletişim halinde olurlar ve her bir bakteri biyofilm içerisinde özel bir işlevi yerine getirir. Biyofilm olgunlaştıkça, proteinler, DNA, polisakkaritler vb. gibi daha fazla biyofilm yapı elemanı, tutunan bakteriler tarafından biyofilmin içerisine salınır (Rabin vd., 2015).

2.1.3. Biyofilm Dağılması (Ayrılma)

Biyofilm oluşumunun bu son adımı, bakterilerin olgun biyofilmden ayrılarak dağılmasını, yani bakterilerin başka bölgelerde yeniden biyofilm oluşturabilen planktonik forma geçmesini ifade etmektedir (Sharma vd., 2016). Bu biyofilm evresi, bakteri hücrelerinin belirli fizyolojik veya çevresel koşullara yanıt olarak diğer taze substratlar üzerinde yeni mikrokoloniler oluşturabildiği doğal bir süreci ifade etmektedir (Díaz-Salazar vd., 2017). Besin eksikliği, yoğun rekabet, biyofilm matrisinin ve QS'nin enzimatik bozunması, oksijen tükenmesi, büyümüş popülasyon vb. gibi sayısız faktör biyofilmin dağılmasını etkilemektedir (Ballén vd., 2022). Dağılmaya dahil olan çevresel sinyaller, sinyal iletim yolları ve efektörler süreci kompleks bir hale getirmektedir (Kaplan, 2010). Dağılma, biyofilm oluşumunun tamamında meydana gelebildiği gibi sadece bir kısmında da gerçekleşebilir (Rabin vd., 2015).

Bakterilerdeki dağılma mekanizması 3 ortak aşamada gerçekleşmektedir: ilk olarak hücreler mikrokolonilerden ayrılır, hücre yeni bir substrata hareket eder ve hücre yeni substrata yapışarak, yeni bir biyofilm oluşum sürecine geçiş yapar (Kaplan, 2010; Shen vd., 2018). Ayrılma, biyofilmlerdeki hücrelerin antimikrobiyal stres, matrisin yapısını bozan enzimler ve besin açlığı gibi çevrelerindeki değişikliklere yanıt olarak gerçekleşebildiği gibi, kesme kuvvetleri gibi dış etkenlerin etkisiyle pasif olarak da gerçekleşebilmektedir (Kaplan, 2010; Fleming ve Rumbaugh, 2017; K. Lee ve S. S. Yoon, 2017). Aktif dağılım gerçekleşirken, kamçı sentezi ve EPS bozunması gibi hücre hareketliliğiyle ilgili olan genlerin ekspresyonu yukarı regüle edilirken, EPS üretimi, tutunma ve fimbriae sentezi ile ilgili genlerin ekspresyonu ise genellikle aşağı regüle edilir (Kostakioti vd., 2013). Aktif ayrılmanın en bilinen örneği, mikrokolonilerin veya planktonik hücrelerin biyofilmin merkezinden hızlı bir şekilde serbest bırakılmasıyla gerçekleşen tohumlama (seeding) dağılımıdır. Bu ayrılma sonrasında, biyofilm üzerinde boş oyuklar oluşur. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* ve *Staphylococcus aureus* gibi birçok bakterinin biyofilmlerinde tohum dağılımı gözlemlenmektedir (Kaplan, 2010; K. Lee ve S. S. Yoon, 2017; Muhammad vd., 2020). Pasif olarak gerçekleşen ayrılmalar, kabuk ayrılması (sloughing) ve erozyon şeklinde olabilmektedir. Kabuk ayrılması, biyofilmin büyük bir bölümünün aniden ayrılmasını ifade ederken, erozyon, az miktarda bakterinin biyofilmden ayrılmasını ifade etmektedir (Kaplan, 2010; Lee ve Yoon, 2017). Aktif veya pasif, iki ayrılma tipinde de ortama planktonik bakterilerin salınması, diğer bölgelerde yeni biyofilmlerin başlamasını teşvik eder (Rabin vd., 2015).



Şekil 2.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Kaynak: (Öztürk vd., 2022: 260)

2.2. *E. coli* Biyofilm Oluşumu

E. coli hücrelerinin yüzeye ilk teması, diğer bakteri türlerinde olduğu gibi fizikokimyasal ve elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak gerçekleşmektedir (Markova vd., 2018). Bakteriler ve yüzeyin itici çekici kuvvetleri arasındaki denge kırılmaya başladığında *E. coli* hücreleri yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlantı kurar. Bu bağlantı, kimi zaman bakterinin hareketinden kimi zaman ise sıvı akışı gibi nedenlerden dolayı bozulabilir, bu gibi durumlarda bakteriler tekrardan planktonik faza dahil olurlar (Beloin vd., 2008). Flagella, bakterinin itme kuvvetinin üstesinden gelmesini ve substrat yüzeyi boyunca yayılmasını sağlar ve bu sayede hücrelerin yüzeye ilk temasını destekler (Friedlander vd., 2015; Besharova vd., 2016). Flagellar motilite, adezyon için önemli bir faktör olmasına rağmen zorunlu bir gereklilik değildir. Flagellasız bulunmayan bakteriler de sağlam adezyon faktörlerinin ifadesi ile yüzeylere tutunabilmektedir (Beloin vd., 2008).

E. coli hücrelerinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunması sırasında hücreler hareketsiz hale gelir, flagella sentezi baskılanır. Siklik-diguanyilik asit (c-di-GMP) dahil birkaç küçük molekül sayesinde planktonik durumdan biyofilm formuna geçiş gerçekleşir. Planktonik formdayken düşük olan c-di-GMP konsantrasyonu, biyofilm oluşumu sırasında artış gösterir (Sharma vd., 2016). Yüzey adezinleri olan Tip 1 fimbriae/pili ve curli, geri dönüşümsüz bağlanmanın gerçekleşmesinde kilit rol oynar (Markova vd., 2018).

E. coli'de bulunan tip 1 fimbriae veya pili, ökaryotik hücre yüzeylerindeki çeşitli reseptör moleküllerine ve abiyotik yüzeylere ilk bağlanmanın gerçekleşebilmesi için önemlidir (Beloin vd., 2008; Sharma vd., 2016). Tip 1 fimbriae, *fimAICDFGH* genlerinden oluşan *fim* operonu tarafından kodlanır. Ana fimbrial alt birim FimA, *fimA* geni tarafından kodlanırken, tip 1 fimbriaların mannoz reseptörlerine bağlanmasına aracılık eden bir adezin olan FimH, *fimH* geni tarafından kodlanmaktadır (Štaudová vd., 2015). Biyofilm oluşumunun başlangıcı ve ilk gelişimiyle birlikte *fim* genlerinin ekspresyonu indüklenir (Sharma vd., 2016). Tip 1 fimbriae, dış zarda bulunan OmpA, OmpX, Slp ve TolC dahil birçok proteinin miktarının azalmasına aracılık ederek bakteri yüzeyinin fizikokimyasal özelliklerinin değişmesine neden olur. Bu durumdan yüzey yapışması da etkilenir (Marouf vd., 2022). Tip 1 fimbriae aracılı yüzey temasları, OmpX miktarını azaltan fizyolojik bir adaptasyon sinyalidir (Zhou vd., 2023). OmpX'in yokluğunda, tip 1 fimbriae ve ekzopolisakkarit üretimi artar, bakteri hareketliliği azalır (Beloin vd., 2008; Marouf vd., 2022). Birçok Enterobacteriaceae familya üyesi tarafından üretilen ve ince agregatif fimbria olarak da adlandırılan, diğer bir yüzey adezini ise curli fimbriae'dır (Beloin vd., 2008). Curli fimbriae, *csgBAC-csgDEFG* operonları tarafından kodlanmaktadır ve bu operonlar biyofilmle ilgili birçok genin ana düzenleyicisi olan CsgD tarafından kontrol edilmektedir (Liu vd., 2014). Curli'nin yapısal bileşenleri (CsgB ve CsgA), *csgBAC* operonu tarafından kodlanırken, curli dışa aktarım mekanizması (CsgE-G) ve CsgD, *csgDEFG* operonu tarafından kodlanmaktadır (Beloin vd., 2008; Gaviria-Cantin vd., 2022). Curli ifadesinin düzenlenmesinde ise, EnvZ/OmpR iki bileşenli sistemle birlikte, sıcaklık, ozmolarite, pH ve oksijenasyon gibi farklı çevresel ve stres koşullarına yanıt veren birkaç transkripsiyonel düzenleyici (Crl, CpxR, H-NS, RcsCDB, IHF, RpoS, MlrA) yer alır. Curli fimbriae, ilk hücre yüzey etkileşimlerini ve hücre-hücre etkileşimlerini artırır, bu sayede abiyotik yüzeylerde oluşan biyofilmi destekler (Beloin vd., 2008).

Tip 1 fimbriae ve curli fimbriae dışında, bakteri hücre yüzey etkileşimlerini güçlendirmede rol oynayan bir başka fimbriae de konjugatif pili (F-Pilus)'dir (Beloin vd., 2008). Gram negatif bakterilerde bulunan F-Pilus, bakteri hücreleri arasında konjugasyon köprüsünü kurarak genetik materyal aktarımını gerçekleştirmesinin yanı sıra, abiyotik yüzeylere rastgele bağlanmayı ve biyofilmin yapısını stabilize eden hücreden hücreye temas yoluyla ilk yapışmayı ve biyofilm olgunlaşmasını destekler (Beloin vd., 2008; Hu vd., 2019).

Geri dönüşümsüz olarak yüzeye tutunan bakteri hücreleri, hücre-hücre etkileşimlerinin etkisiyle bir araya gelmeye başlarlar. Hücrelerin bir araya gelmesiyle, hücre dışı matriks de üretilmeye başlar, matriks biyofilmin üç boyutlu yapısını oluşturarak biyofilmin olgunlaşmasını

sağlar (Sharma vd., 2016). Biyofilmin olgunlaşması aşaması, ototransportörlerin ve EPS'nin (Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler) katılımıyla sağlanır (Sharma vd., 2016).

Ototransportörler, dış zara lokalize olurken yardımcı proteinlere ihtiyaç duymayan proteinlerdir (Beloin vd., 2008). Birçok *E. coli*'de bulunan, ana dış zar proteini olan ve *flu* geni tarafından kodlanan antijen 43 (Ag43), hücreden hücreye yapışmayı destekleyen, kendi kendini tanıyan bir yüzey ototransportör proteini. Ag43, sıvı kültürlerde otoagregasyonu ve hücre kümelenmesini sağlayarak biyofilmin üç boyutlu gelişimine katkıda bulunur (Heras vd., 2014). Aynı zamanda Ag43, farklı türlerdeki bakterilerde de ifade edildiğinden dolayı, *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi bakterilerin karışık biyofilm oluşumunu teşvik etmektedir. Abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda ve biyofilm olgunlaşmasında, Ag43 miktarının artışı önemli bir role sahiptir (Beloin vd., 2008).

Biyofilm oluşumunda yer alan diğer ototransportör proteinler ise AidA ve TibA'dır. Bu proteinler genellikle *E. coli*'nin virülan suşları ile ilişkilidir ve bu proteinlerin ekspresyonu, abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunu destekler ve otoagregasyonu sağlar (Vogeleer vd., 2014). Ag43, AidA ve TibA, hücre agregasyonuna neden olan ve biyofilm oluşumunu artıran, kendiliğinden birleşen proteinlerdir. Bu proteinler, birbirleriyle heterolog etkileşimler kurabildikleri gibi karışık bakteri kümelerinin oluşumunu da teşvik edebilirler (Beloin vd., 2008; Vogeleer vd., 2014).

Ototransportörlerin ekspresyonuyla birlikte matriks polisakkaritlerinin ekspresyonu sayesinde biyofilm olgunlaşması için gerekli olan biyofilm matriksinin oluşumu gerçekleşir (Beloin vd., 2008). Biyofilm matriksi, içerisinde bulunan bakterileri, dış etkilerden ve olumsuz koşullardan (kuruma, biyositler, antimikrobiyaller, metalik katyonlar, ultraviyole radyasyon, protozoalar ve konakçı bağışıklık savunması gibi) koruyan bir ortam oluşturur (Flemming ve Wingender, 2010).

Matrikste salgılanan polisakkaritler, biyofilme şekil verir ve aynı zamanda da biyofilme yapısal destek sağlarlar. *E. coli* biyofilmlerinde üç temel ekzopolisakkarit bulunmaktadır; β -1,6-N-asetil-D-glukozamin polimeri (PGA), selüloz ve kolanik asit. Ve bu polisakkaritlere ek olarak hücre yüzey polisakkaritlerinden lipopolisakkarit ve kapsüller de *E. coli* biyofilm oluşumuna dahil olan önemli faktörlerdir (Flemming ve Wingender, 2010; Sharma vd., 2016). PGA, hücre-hücre yapışmasında hücrelerin yüzeylere bağlanmasında rol oynamasına ek olarak, *E. coli* biyofilmini stabilize eden bir adezin olarak da işlev görür. *E. coli* *pgaABCD* (veya *ycdSRQP*) operonu, PGA polimerinin sentezinde, taşınmasında ve lokalizasyonunda yer alan

proteinleri kodlar (Beloin vd., 2008; Sharma vd., 2016). PgaA ve PgaB, PGA taşınması için gerekliken, PGA sentezi için PgaC glikosiltransferaz ve PgaD gereklidir. Genellikle birçok bakteriyel ekzopolisakkaritte olduğu gibi, PGA sentezi c-di-GMP tarafından allosterik olarak aktive edilmektedir (Echeverez vd., 2017).

Biyofilm oluşumunun hava-sıvı ara yüzünde, sert ve katı bir şekilde gerçekleşmesini diğer bir ekzopolisakkarit olan selüloz sağlamaktadır (Beloin vd., 2008; Sharma vd., 2016). Mikrobiyal selüloz, β -(1,4) bağlarla bağlanmış doğrusal bir glikoz polimeri olarak üretilir (McNamara vd., 2015). Selüloz, *bcsABZC* ve *bcsEFG* operonları tarafından kodlanmaktadır. *E. coli* selüloz sentaz kompleksi, yedisi iç zarda lokalize olmak üzere dokuz alt birimden oluşmaktadır (Acheson vd., 2021). Selüloz sentaz kompleksinde BcsA ve BcsB yer almaktadır. BcsA, zara gömülü bir glikosiltransferaz, BcsB ise periplazmik iç membran bağlantılı bir proteindir (McNamara vd., 2015; Acheson vd., 2021; Manan vd., 2022). Temel katalitik olarak aktif selüloz sentaz alt birimi olan BcsA, üridin difosfat (UDP) ile aktive olan glikozu (UDP-Glc) hücre içi bir glikoziltransferaz domaini sayesinde, selüloza polimerize eder ve bir transmembran kanalı yoluyla bu polimeri salgılar (McNamara vd., 2015). BcsA selüloz sentaz proteini, c-di-GMP bağlanmasıyla allosterik olarak kontrol edilir (Römling ve Galperin, 2015).

E. coli biyofilmlerinde bulunan üç ana ekzopolisakkaritin sonuncusu ise kolanik asittir. Kolanik asit, çevresel koşullar altında bakteri hücresi etrafında koruyucu bir kapsül oluşturan negatif yüklü bir glikoz, galaktoz, fukoz ve glukuronik asit polimeridir. Çoğu kapsül türünden farklı olarak, üretilen kolanik asidin önemli bir kısmı hücre dışı ortama salınır (Beloin vd., 2008). Kolanik asitin biyosentezi, *wca* olarak adlandırılan 20 genlik (*cpsB*, *cpsG*, *gmd*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *wcaG*, *wcaH*, *wcaI*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wcaM* ve *wzxC*) bir gen kümesi tarafından kodlanan enzimler tarafından gerçekleştirilir (Wang vd., 2020). Bu gen kümesi, transkripsiyon regülatörü RcsA varlığında, üç bileşenli sistem RcsC / RcsD / RcsB tarafından indüklenmektedir. Kolanik asit, ilk bakteri bağlanmasını bozabilir ancak, biyofilm oluşumunun ileri aşamalarında, yukarı regüle edilir ve üretimi olgun biyofilm yapısının gelişiminde rol oynar (Beloin vd., 2008). Buna ek olarak, bazı çalışmalarda, kolanik asit kapsülünün ekspresyonunun, Ag43 ve AidA gibi ototransporter adezinleri maskeleyerek *E. coli* suşlarının biyofilm oluşumunu inhibe edebileceği gösterilmiştir (Vogeleer vd., 2014).

Bakteri hücreleri ve çevresi arasındaki etkileşimlerin artmasını sağlayan hücre yüzey polisakkaritleri gibi bileşenler de biyofilm fenotipine katkı sağlayabilir. Lipopolisakkarit (LPS) O antijeni ve kapsüller polisakkarit K antijeni, *E. coli* suşlarına özgü yüzey polisakkaritleridir. Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit, endotoksin olarak da

bilinen glikolipidik bir polimerdir (Beloin vd., 2008; Sharma vd., 2016). LPS'nin sentezlenip hücre yüzeyinde birleştirilmesinde, bazıları büyük operonlarda kümelenen 50 üzerinde gen görev almaktadır. LPS yoksun *E. coli*'ler üzerine yapılan çalışmalarda, abiyotik yüzeylere yapışmanın azaldığı ve biyofilm kapasitesinin düştüğü belirlenmiştir (Beloin vd., 2008). Başka bir çalışmada ise *rfaH* genindeki mutasyon ile azalan LPS ekspresyonunun, *E. coli* adezinlerinin üzerindeki LPS maskeleyme etkisini kaldırdığı ve bu sayede ilk yapışma ve/veya biyofilm oluşumuna olanak sağladığı bildirilmiştir (Beloin vd., 2006). Bu çalışmalar gösteriyor ki, LPS hücre yüzeyinde bulunan yapışma faktörleriyle etkileşime girerek biyofilm oluşumu artırıp azaltabilmektedir (Beloin vd., 2008). Kapsüller polisakkaritler ise hücreyi sıkıca tutan yüksek molekül ağırlıklı ve yüzeyi saran yapılardır. *E. coli* kapsülü, yüzey adezinlerini koruyarak biyofilm oluşumuna dolaylı olarak katkı sağlar (Beloin vd., 2008).

2.3. *E. coli* Biyo-filmlerinin Oluşumunda Yer Alan Çevresel Sinyaller ve Düzenleyici Ağlar

2.3.1. Sinyaller

2.3.1.1. Mekanik Sinyaller

Yüzeyle olan mesafesi azalan bir bakteri hücresi, biyofilm ve planktonik yaşam tarzı arasında geçiş yapabilir. Bu durum, biyofilm oluşumunun sağlanabilmesi için yüzeyin algılanmasının gerekli olduğunu göstermektedir (Karatan ve Watnick, 2009). Flagella, sadece yüzeye yakın itici kuvvetlerin üstesinden gelmeye yardımcı olarak ve yüzey yakınlığını uzatarak yüzey bağlanmasını teşvik etmez, aynı zamanda yüzeyin algılanması aşamasında da rol oynar (Nord ve Pedaci, 2020). *E. coli*'de flagellar master operon *flhDC*, flagella üretip üretmemeye konusundaki temel kararın kontrolünden sorumludur. FlhDC proteinleri, transkripsiyonel aktivatör olarak işlev gören bir heteromultimerik kompleks (FlhD₄C₂) oluştururlar. Bu sayede flagellanın sentezinde yer alan genlerin ekspresyonları düzenlenir (Karatan ve Watnick, 2009; Belas, 2014). Gerçekleştirilen transkripsiyonel profilleme çalışmalarında elde edilen veriler, flagellar gen ekspresyonunun ve biyofilm matris sentezinin birbirinin tersi şeklinde düzenlendiğini göstermektedir. Bu düzenleme, bakterinin yüzey ile etkileşiminden kaynaklanan flagellar motor üzerinde sürtünme artışının algılanması yoluyla gerçekleşebilmektedir. Sürtünme ortaya çıktığı zaman, flagellar motorun dönüşü durur ve engellenir (Karatan ve Watnick, 2009). Flagellanın durması nedeniyle iyonik akışın ani değişimi, hücre içerisinde hiper-polarizasyon oluşmasına neden olabilir. Mekanik olarak indüklenen bu elektro-kimyasal uyarının, henüz net bir şekilde ortaya koyulmamış bir yolla, biyofilm oluşumu için gerekli olan hücre içi sinyallerin tetiklenmesine neden olduğu

düşünülmektedir (Belas, 2014; Nord ve Pedaci, 2020). Flagellar motorun olmadığı durumlarda ise yüzeyle olan etkileşim iletilmez (Karatan ve Watnick, 2009).

2.3.1.2. Besin Varlığı ve Metabolik İpuçları

Çevrede bulunan besin türleri ve bu besinlerin miktarları, bakterilerin çevrelerine verecekleri tepkileri düzenler. Bir biyofilmi oluşturmanın ve sonrasında biyofilmden ayrılmanın enerji yönünden maliyetleri, bakterilerin ortamın besin durumunu iyi analiz etmesini gerektirmektedir. Biyofilm oluşumu, besin sinyallerinden etkilenmektedir (Karatan ve Watnick, 2009; Zahra vd., 2019).

Glikoz ve katabolik represyonu, biyofilm oluşumunu etkileyen besin sinyallerinden birisidir. Glikoz, Dünya üzerinde yaşayan bütün organizmaların metabolizmasında önemli rolü olan bir karbonhidrattır. Bazı bakterilerde, glikoz ve benzeri karbonhidratlar biyofilm oluşumunu tetiklerken, bazı bakterilerde ise yüzey yapışmasını inhibe ederler. Çevresel glikoz ve katabolit represyon, çeşitli *E. coli* suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir. *E. coli*'de, glikozun baskılayıcı etkisi, cAMP-CRP sistemi aracılığıyla katabolit baskılama şeklinde gerçekleşir (Karatan ve Watnick, 2009; Zahra vd., 2019). *E. coli*'de bulunan *bssS* ve *bssR*, katabolit represyonda yer alan birkaç genin düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. *BssS* ve *BssR*, glikoz tarafından modüle edilen farklı sistemler (*RpoS*, *CRP*, *CreC* ve *CsrA* gibi) aracılığıyla biyofilm oluşumunu önemli ölçüde baskılayabilir. *CsrA*'nın ekspresyonu, glikojen metabolizmasının bastırılmasını ve *flhDC* operonunun aktivasyonunu sağlar. Aynı zamanda, biyofilm oluşumunun başlangıcıyla birlikte *csrA* ifadesi dramatik olarak düşüş gösterir, biyofilm olgunlaşmasından sonra *csrA*'nın aktif olmasıyla birlikte, flagellar genlerin ekspresyonu sağlanarak, hücrenin biyofilmden ayrılması gerçekleşebilir. *CsrA*, *pgaABCD* operonunu dolaylı yoldan etkileyerek, PGA üretimini posttranskripsiyonel olarak düzenler. Triptofanın, triptofanaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucunda, indol ve piruvat oluşur, bunlar az besin bulunan ya da besinlerin tükenmiş olduğu koşullar altında bir karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılır. İndol, birçok gram-negatif bakteride olduğu gibi *E. coli* biyofilm oluşumu üzerinde de uyarıcı bir etkiye sahiptir (Domka vd., 2007; Karatan ve Watnick, 2009). İndol, hücrelerin çevredeki besin tükenmesini algılamasını ve buna tepki vermesini sağlayan evrensel bir biyofilm sinyalidir (Karatan ve Watnick, 2009).

Putresin, spermidin ve norspermidin gibi poliaminler, nötr pH'ta pozitif yüklü, yapısında iki veya daha fazla amin grubu bulunduran organik moleküllerdir. Poliaminler, hücre büyümesi için gereklidir ve biyofilm oluşumunu modüle eden sinyaller olarak işlev görebilirler (Karatan

ve Watnick, 2009). *E. coli*'de bir spermidin alım taşıyıcısı PotABCD ve beş putresin taşıyıcısı (PotE, PotFGHI, PuuP, PlaP (YeeF) ve YdcSTUV) bulunmaktadır. PotABCD taşıyıcısının PotD'si biyofilm oluşumu için gereklidir (Thongbhubate vd., 2021). Yapılan çalışmalarda, ekzojen putresin'in *E. coli* kültürlerinde biyofilm oluşumunu ve hücre canlılığını uyardığı, spermidinin ise biyofilm oluşumunu desteklediği belirlenmiştir (Guo vd., 2021; Thongbhubate vd., 2021).

2.3.1.3. İnorganik Moleküller

Demir ve fosfat gibi inorganik moleküller, biyofilm oluşumu üzerinde etkilere sahiptir. *E. coli*'de, demir alımında rol oynayan genlerin bir transkripsiyonel aktivatörünü kodlayan *fecR*'nin transkripsiyonu CsgD tarafından baskılanır. Bu durum, demir alımıyla biyofilm oluşumunun ters bir şekilde düzenlendiğini göstermektedir (Karatan ve Watnick, 2009). Ortamda bulunan fosfat, *E. coli* biyofilmlerinde hücre canlılığını arttırmaktadır (Khan ve Gupta, 2020).

2.3.1.4. Ozmolarite

Ozmolarite, birçok bakteri türünde biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde rol oynar. Ortamda yer alan ozmolitin tipine bağlı olarak biyofilm oluşumu etkilenir. Örneğin; *E. coli* 100 mM NaCl içeren ortamda kültürlendiğinde, *curli* genlerinin transkripsiyonu, CpxR transkripsiyon faktörü tarafından bastırılırken, 100 mM süktroz içeren bir ortamda aynı etki görülmemektedir. Bu durum ozmolaritenin değil, iyonik gücün çevresel sinyal olarak kullanıldığını göstermektedir. Ortama 200 mM NaCl'nin eklenmesi ise, PNAG (poli-*N*-asetil- β -(1-6)-glukozamin) sentezi için gerekli proteinleri kodlayan *pga* operonunun transkripsiyonunu aktive etmektedir. Ortamdaki farklı tuz konsantrasyonları, *E. coli* biyofilmleri üzerinde farklı etkilere sebep olmaktadır. Ozmolaritenin bakteriyel biyofilm oluşumu üzerindeki farklı etkileri, bakterilerin fizyolojik farklılıklarından kaynaklanmaktadır (Karatan ve Watnick, 2009).

2.3.2. İkincil Haberciler ve Küçük Moleküller

Planktonik formdan biyofilm formuna geçişte, siklik di-GMP, asetil fosfat, alarmon guanozin 5'-difosfat 3'-difosfat (ppGpp), *N*-Asetil-Glukozamin ve *N*-Asetilglukozamin-6-P gibi küçük moleküller görev almaktadır (Beloin vd., 2008).

2.3.2.1. Siklik di-GMP

Siklik di-GMP (c-di-GMP), diguanilat siklazlar tarafından sentezlenen, fosfodiesteraz tarafından degradasyonu sağlanan ikincil bir habercidir (Römling vd., 2005; Beloin vd., 2008). C-di-GMP, hücredeki birçok hücrenel işlevi bulunmaktadır. Bu işlevler arasında, hareketin düzenlenmesi ve biyofilm oluşumu yer almaktadır. *E. coli*'de, biyofilm oluşumu sırasında c-di-GMP konsantrasyonu yüksek seviyede, motilite sırasında c-di-GMP konsantrasyonu düşük seviyededir. *E. coli*'de biyofilm oluşumuna katılan selülozün sentezinin düzenlenmesi, CsgD aktivasyonunun bir diguanilat siklaz kodlayan gen olan *adrA*'nın ifadesini uyarmasıyla gerçekleşmektedir. Diguanilat siklaz, c-di-GMP üreterek BcsA'yı aktive eder ve devamında bakteriyel selülozün oluşumu sağlanır. C-di-GMP'nin hareketi düzenlemesi YcgR yoluyla gerçekleşmektedir (Hufnagel vd., 2014; Ahmad vd., 2017; Suchanek vd., 2020).

2.3.2.2. Asetil Fosfat

Ortamda bol miktarda karbon kaynağı bulunuyorsa, hücre içerisinde asetil fosfat (AcP) birikimi gerçekleşmektedir. Bakteriler bir yüzeye ulaştığında meydana gelen yerel oksijen tükenmesi, hücre içi AcP seviyelerinin yükselmesine neden olan bir sinyaldir. AcP seviyelerinde meydana gelen artış, yüksek seviyede tip 1 pili ve kolanik asit gen ekspresyonuna ve düşük seviyede flagellar gen ekspresyonuna neden olarak, biyofilm olgunlaşmasını destekler (Beloin vd., 2008; Christensen vd., 2019).

2.3.2.3. Alarmon ppGpp

Guanozin 5'-difosfat 3'-difosfat (ppGpp) ve guanozin 5'-trifosfat 3'-difosfat (pppGpp), alarmon adı verilen küçük nükleotitlerdir. Alarmonlar, tepki düzenleyiciler üzerindeki etkileri ile gen ekspresyonunu düzenleyerek çevresel etkilere uyum sağlamada rol oynarlar (Steinchen vd., 2020). *E. coli*'nin bulunduğu ortamda, amino asit seviyeleri sürekli olarak değişir, amino asit seviyelerinin büyümeyi etkileyecek kadar azalmasıyla, ppGpp'nin RNA polimeraza bağlanması tetiklenir. Böylece protein sentezinin azalmasına neden olan stabil RNA'ların regülasyonu aşağı yönlü olarak düzenlenir (Bessaiah vd., 2021). Alarmon miktarındaki birikim ile yaklaşık 500 genin transkripsiyonu etkilenir (Fernández-Coll ve Cashel, 2020; Irving vd., 2021). *E. coli*'nin çevresel strese yanıtının (stringent response) gerçekleştirilmesinden sorumlu olan ppGpp, çevresel strese yanıtı sırasında *fimB* promotörlerinden birini etkileyerek *fimB* transkripsiyonunun azalmasına ve dolayısıyla tip 1 fimbriae miktarının da azalmasına neden olur (Steinchen vd., 2020). ppGpp'nin, rRNA transkripsiyonunu azaltarak, RNA polimeraz mevcudiyetini artırarak *dsrA* (küçük düzenleyici RNA) ve *iraP* (anti-adaptör protein)

ekspresyonunu dolaylı olarak artırabildiği gösterilmiştir (Girard vd., 2018). DsrA ise dolaylı olarak RpoS'yi etkileyerek *fimB* ifadesinin baskılanmasına neden olur (Bessaiah vd., 2021). Besin maddesinin tükenmiş olduğu ortamlarda bulunan planktonik bakterilerde ppGpp sinyalinin, tip 1 fimbria üretiminde bir artışa sebep olarak, koşulların daha iyi olduğu yüzeylerde kolonizasyonu indüklediği düşünülmektedir (Beloin vd., 2008).

2.3.2.4. N-Asetil-Glukozamin ve N-Asetilglukozamin-6-P

E. coli, bir karbon kaynağı olarak ve/veya peptidoglikan ve lipopolisakkarit biyosentezinde bir öncü olarak *N*-asetilglukozamin-6-P'yi kullanabilir. Bunlara ek olarak, *N*-asetilglukozamin-6-P, hücrenin yapışkan moleküller üretmesi için bir sinyal olabilir. *E. coli*, katı yüzeylere tutunmayı, hücre-hücre yapışmasını ve biyofilm yapısının stabilizasyonunu destekleyen *N*-asetilglukozamin alt birimlerinden (PGA) oluşan hücre dışı bir polisakkarit üretir (Beloin vd., 2008). Bu hücre dışı polisakkarit yapı aynı zamanda antimikrobiallerin hücreler üzerindeki etkisini azaltarak hücreleri çevresel faktörlerin etkilerinden de korumaktadır (Little vd., 2014). Ortama eklenen müsin şeker *N*-asetil-glukozaminin veya düzenleyici protein NagC'nin mutant hale getirilmesinin AIEC LF82 suşunda biyofilm oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Sicard vd., 2018).

2.3.3. Düzenleyici Ağlar

2.3.3.1. İki Bileşenli Düzenleyici CpxRA Sistemi

İki bileşenli düzenleyici bir sistem olan *cpxRA*, sensör membran proteini CpxA ve sitoplazmik regülatör CpxR'den oluşmaktadır (Debnath vd., 2013). Bakterilerin çevresel streslere adaptasyonuna katılan bu sistem, membran proteinlerinin aşırı üretimi ve yanlış katlanması ve yüksek pH gibi streslere yanıt olarak gen ekspresyonlarının düzenlenmesini sağlar (Raivio vd., 2013; Mitchell ve Silhavy, 2019). *E. coli*'nin abiyotik yüzeylere ilk tutunması, membran pertürbasyonunu indükler ve bu sayede yüzey algılayıcısı olan CpxR'e bağlı olarak *cpx* sistemi aktif olur (Shetty vd., 2019). Bu sürece yüzey algılama adı verilir. CpxR'nin aktivasyonu, motilite ve kemotaksis genlerinin baskılanmasına neden olur, bu sayede hücrelerin biyofilmin sabit yapısına geçiş süreci hızlanır. Yüzeyleri algılamasının yanı sıra, *cpx* sistemi etrafta bulunan bakterilerin de algılanmasını sağlar (Beloin vd., 2008). Gelişmekte olan *E. coli* biyofilmlerindeki hücrelerin birbirine teması *cpx* sisteminin indüksiyonunu sağlar. Bu sayede *cpx* sistemi biyofilm olgunlaşmasına önemli bir katkı sağlar (Beloin vd., 2008).

2.3.3.2. İki Bileşenli Düzenleyici Rcs Sistemi

Rcs iki bileşenli düzenleyici sistemi, membranla ilişkili olan RcsC ve RcsD proteinlerinden ve sitoplazmik yanıt düzenleyici RcsB'den oluşmaktadır (Meng vd., 2020). RcsC sensör kinaz, kurumayı, ozmolaritedeki değişiklikleri ve membran pertürbasyonlarını (katı bir yüzey üzerindeki büyüme durumunda) algılar, bu yüzden *E. coli*'de biyofilm gelişiminin normal bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir (Beloin vd., 2008; Kimkes ve Heinemann, 2020). Aynı zamanda, iki bileşenli *rcs*, *E. coli*'de flagellar gen ekspresyonunu bastırmaktadır (Meng vd., 2020). *rcsC* ve *rcsB* mutantlarında hücrelerin ilk bağlanması etkilenmemektedir, bu durum bu regulonun biyofilmin ilk aşamalarında değil, biyofilmin olgunlaşma aşamasında rol aldığını göstermektedir (Beloin vd., 2008).

2.3.3.3. İki Bileşenli Düzenleyici EnvZ / OmpR Sistemi

EnvZ / OmpR iki bileşenli sistemi, *ompC* ve *ompF* porin proteini genlerinin transkripsiyonunu dış ozmolaritedeki değişiklere yanıt olarak düzenler (Kenney ve Anand, 2020). EnvZ / OmpR aktivitesi, dış ozmolaritede orta dereceli bir artış olduğunda, flagellar gen ekspresyonunu baskılar ve ilk yapışma sonrasında curli ekspresyonunu aktive ederek yapışmayı destekleyebilir (Beloin vd., 2008). Curli ekspresyonu üzerindeki OmpR etkisi, regülatör CsgD'nin fosforile OmpR tarafından aktivasyonu sayesinde sağlanır (Jubelin vd., 2005; Beloin vd., 2008).

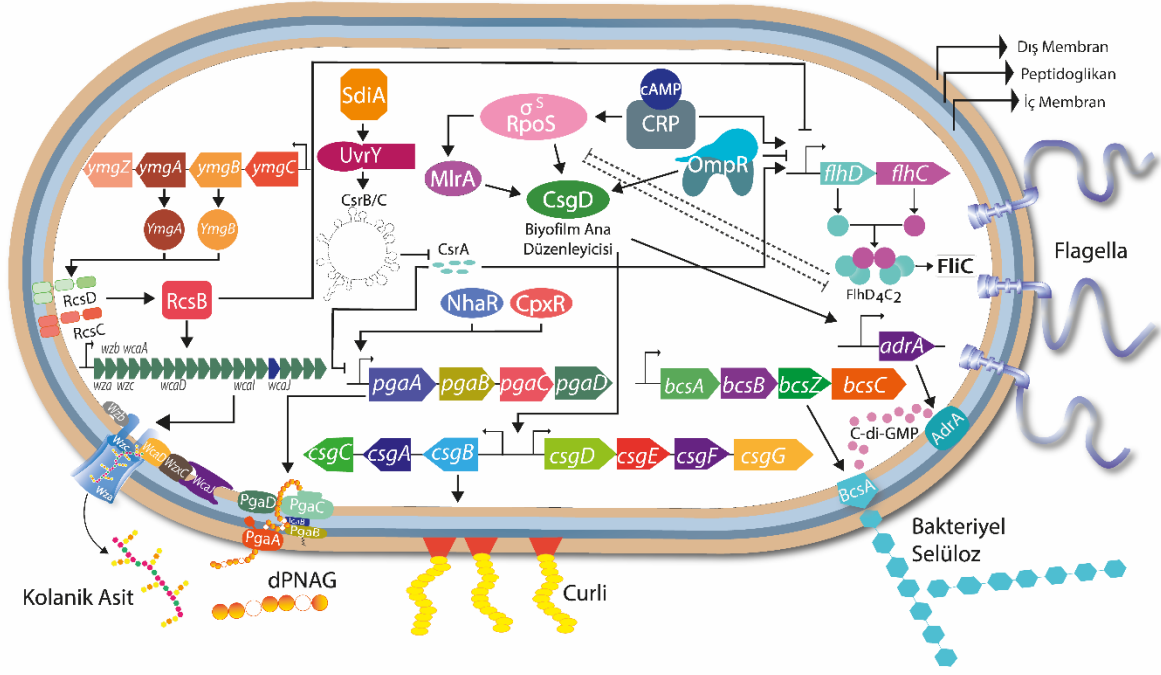
2.3.3.4. H-NS ve RpoS

H-NS ve RpoS, çevresel koşullara yanıt olarak, biyofilm oluşumunun düzenlenmesine katılır (Beloin vd., 2008). H-NS, flagella, tip 1 fimbria gibi birçok biyofilm ile ilişkili olan geni düzenlemesinin yanı sıra, genomda farklı genlerin düzenlenmesine de katılmaktadır. H-NS, RpoS sigma faktörüne etki ederek, RpoS'e bağlı genlerin ekspresyonlarını düzenler (Beloin vd., 2008). Bu düzenleme birkaç şekilde olabilir. H-NS, RpoS'nin bağlanacağı promotora bağlanarak onun bağlanmasını engelleyebilir, dolaylı olarak *rpoS* transkripsiyonunu bastırabilir veya RpoS yenilenmesini (turnover) uyarabilir (Beloin vd., 2008).

2.4. Yeterli Yoğunluk Algılama (Quorum Sensing)

Quorum sensing (QS), hücreler tarafından salgılanan otoindükleyiciler (AI) veya quormonlar olarak adlandırılan küçük sinyal moleküllerinin ortamda bulunma yoğunluğuna göre gen ekspresyonlarını modüle eden bir kimyasal sinyalleşme sistemidir. Farklı türler için spesifik olan otoindükleyicilerin yoğunluğu ortamda bulunan hücre popülasyonu ile doğru orantılıdır. Popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak artan otoindükleyici miktarı, hücreden

hücreye sinyal mekanizması aracılığıyla biyofilm oluşumu ve olgunlaşması sırasında gen ekspresyonunu kontrol eder (Sharma vd., 2016; Styles vd., 2020). AI yüksek bir konsantrasyona ulaştığında, virülans faktörlerinin gen ekspresyonunu modüle eden ve hareketliliği, fimbriaları ve ısıya dayanıklı toksin ekspresyonunu arttıran düzenleyici bir protein ile etkileşime girer (Sturbelle vd., 2015). Gram negatif bakterilerde, AI-1 ve AI-2 olmak üzere iki tip otoindükleyici bulunmaktadır (Verbeke vd., 2017). AI-1 molekülleri, *N*-açıl-homoserin laktonlardır (AHL), AI-2 ise benzersiz bir furanosil borat diesterdir. AI-1 düzenleme sistemi, AI-1 sentazını kodlayan *luxI* ve AI-1 yanıt düzenleyicisini kodlayan *luxR* olmak üzere iki yapısal genden oluşmaktadır. LuxI ve LuxR, virülanstan biyofilm oluşumuna kadar birçok süreci kontrol etmektedir (Sharma vd., 2016). *E. coli*, AHL'yi sentezleyememektedir ancak genomu, bir AI-1 sensörü ve bir *luxR* homologu olan *sdiA*'yı kodlamaktadır. Diğer bakteriler tarafından sentezlenen AHL, *sdiA* tarafından kodlanan LuxR tarafından algılanmaktadır. Buna ek olarak, SdiA, *E. coli*'nin biyofilm oluşumunu, hareketliliğini ve virülansını artıran *uvrY* ve *csrA* genlerini yukarı regüle etmektedir (Beloin vd., 2008). AI-2, hem türler içi hem de türler arası bakteriyel QS'den sorumludur. AI-2'nin QS regülatörü (YgiU) aracılığıyla biyofilm biyokütlesini önemli ölçüde arttırmaktadır. YgiU, QseBC iki bileşenli sistem aracılığıyla flagellar hareketi düzenlemektedir. YgiU, daha sonra MotA ve FliA'yı uyararak biyofilm oluşumuna yol açan ana regulon *flhDC* aracılığıyla *E. coli*'deki hareketliliği kontrol eden QseB'yi uyarılmaktadır. Ayrıca YgiU, *crl* aracılığıyla curli ifadesinin indüklenmesini ve *csrA* aracılığıyla da motilitenin uyarılmasını sağlamaktadır (Sharma vd., 2016).



Şekil 2.2. *E. coli*'de biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde rol oynayan anahtar genler ve ürünleri

Kaynak: (Öztürk vd., 2022: 263)

2.5. *E. coli* Porin Proteinlerinin Biyofilm Oluşumuyla İlişkisi

Biyofilm oluşumu literatür bilgilerinden de anlaşılacağı üzere, çok kapsamlı ve karmaşık bir oluşumdur. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların, temelde benzer olan, biyofilm oluşum mekanizmalarına dahil olan birçok farklı gen bulunmaktadır. Bu çeşitliliğe ek olarak, türler arasındaki etkileşimlerde rol oynayan ya da belirli şartlarda aktif olan mekanizmalar da bulunmaktadır (Öztürk vd., 2022). Mekanizmaların tetiklenmesi çevresel faktörlerin etkisiyle olmaktadır. UV radyasyonu, su kıtlığı, besin maddelerinin tükenmesi, değişken pH şartları, yüksek oranlarda tuz konsantrasyonları ve yüksek basınç gibi etmenler biyofilmler üzerinde düzenleyici etkilere neden olabilirler (Muhammad vd., 2020). Bu düzenleyici etkiler, doğrudan ya da dolaylı olarak biyofilm oluşumuna indükleyici ya da inhibe edici etkiye bulunabilirler (Öztürk vd., 2022).

Biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu bazı çalışmalarda ortaya koyulan porin proteinleri, biyofilm oluşumunu çevresel faktörlerin etkisiyle sağlayabilir. Porin proteinleri, Gram negatif bakterilerin dış zarını (OM) oluşturan, fosfolipitler, lipopolisakaritler, lipoproteinler gibi yapı elemanlarından bir tanesidir (Henderson vd., 2016). OM porinler, su dolu açık bir kanal oluşturan ve hidrofilik bileşiklerin pasif taşınmasına izin veren, β -fiç

yapısına sahip transmembran gözenekler oluştururlar (Choi ve Lee, 2019). Porinler, aynı zamanda Gram negatif bakterilerde OM'de bulunan proteinler arasında en yoğunudur. Aktivitelerine göre spesifik olmayan veya spesifik porinler olarak sınıflandırılabilirler. Ek olarak, fonksiyonel yapılarına göre monomerik, dimerik veya trimerik porinler olarak da birbirlerinden ayrılırlar (Choi ve Lee, 2019). *E. coli*'de bu zamana kadar 20'nin üzerinde dış membran porin proteini tanımlanmıştır. Bu dış membran proteinlerinden bazıları; OmpA, OmpF, OmpC, LamB, PhoE, FecA, FepA, FadL, OmpN, OmpX, OmpG, OmpT, OmpL, OmpH, OmpD, OmpW, TolC ve ScrY'dir (Han vd., 2012; Schmitt vd., 2019).

Çeşitli moleküllerin pasif taşınmasına ek olarak, porinlerin Gram-negatif bakterilerin zarf bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin, dış zar proteini A (OmpA), birçok küçük kimyasalın pasif taşınmasına izin veren spesifik olmayan bir porindir (Iyer vd., 2017; Choi ve Lee, 2019). Aynı zamanda peptidoglikan ile ilişkili bir proteindir (Samsudin vd., 2016). OmpC, iyonların ve diğer hidrofilik çözünen maddelerin dış zardan geçmesine izin veren trimerik bir porin proteindir (Alva vd., 2020). LamB, dış membranda bulunan diğer bir trimerik porin proteindir (Mirus vd., 2010). *E. coli*'de LamB porininin ortasında bulunan kanal, maltoz ve maltodekstrinin dış zar boyunca difüzyonunu kolaylaştırmaktadır (Wagh ve Escobar, 2019). OmpC, LamB porinlerinin ortalarında 3 ayrı kanal bulunmaktadır (Myint vd., 2021). Bakteriler birçok çevresel strese maruz kalmaktadırlar, maruz kaldıkları bu çevresel streslerden birisi de pH faktörüdür. Çevresel pH'da ortaya çıkabilecek bir değişiklik, doğal toplulukların metabolik aktivitelerini karmaşık bir şekilde etkileyebilmektedir (Jin ve Kirk, 2018). OM proteinlerinden, TolC, OmpC, OmpX ve LamB, *E. coli*'de pH regülasyonunun sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Wu vd., 2009). *ompF*, *ompC* ve *lamB* porin genleri, nötral ve asidik pH ile düzenlenmektedir (Heyde ve Portalier, 1987). Dış zardaki OmpC ve OmpF miktarlarının ortamın pH'ından etkilendiği literatürde bildirilmiştir. Alkali pH'a bağlı OmpF porin proteininin düzenlemesinin EnvZ'nin kontrolü altında olduğu öne sürülmüştür (Heyde ve Portalier, 1987; Darcan, 2004). Buna ek olarak, *ompC* sentezi için ayrı bir düzenleme mekanizması bulunmaktadır (Heyde ve Portalier, 1987). Heyde, vd., (1988) araştırmalarını sürdürerek, farklı porinlerin (OmpF, OmpC, PhoE) farklı pH'larda işlevlerini incelemişler ve porinlerin gözenek çapının pH ile doğrudan ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Heyde, vd., (2000) *E. coli*'de pH 6.0'da OmpC'nin, pH 7.8'de ise OmpF'nin sentezinin arttığını tespit etmişlerdir. *E. coli*, değişen ortam pH'sına, porin ekspresyonunda farklı konformasyonel değişiklikler yaparak yanıt vermektedir. *E. coli* asidik ortamlarda alkali ortamlardakine göre çok daha iyi büyüme gösterirken, en iyi büyümeyi nötral

ortamlarda sağlamaktadır (Kim ve Ndegwa, 2018; Zhao vd., 2022). *E. coli*'deki iki bileşenli sistemlerin yaklaşık %50'si benzer şekilde düzenlenmektedir. Porin seviyeleri, pH, sıcaklık, ozmolarite ve büyüme fazı dahil çok çeşitli büyüme koşullarından etkilenmektedir. OmpC ve OmpF'nin düzenlenmesi OmpR / EnvZ iki bileşenli sistem aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Genel olarak, toplam OmpF ve OmpC miktarı nispeten sabit kalır, ancak seviyeleri karşılıklı olarak osmolarite ve pH gibi çevresel uyaranlar tarafından koordineli olarak düzenlenir (Kenney ve Anand, 2020). OmpF ve OmpC'nin ekspresyonu, alkali pH'ta *envZ*'nin varlığına ihtiyaç duymaktadır, ancak her iki protein de *envZ* mutant haldeyken asidik pH'ta eksprese edilmektedir, bu da düşük pH'ta osmolarite ile farklı bir şekilde düzenlenen porin ekspresyonunun varlığını ortaya koymaktadır (Sato vd., 2000). OmpC porin proteininin sentezi alkali ve nötr pH'a kıyasla asidik pH'da artış gösterirken, OmpF porin proteininin sentezi ise alkali ve nötr pH değerlerine kıyasla asidik pH'da azalış göstermektedir. Dolayısıyla dış membran porin proteinlerinin bu şekilde düzenlenmesi, asidik ve alkalın stres altında büyümenin gerçekleşebilmesi için gereklidir (Darcan vd., 2009). *lamB* porin geni ise hem nötral hem de asidik pH ile düzenlenmektedir (Heyde ve Portalier, 1987). Asidik pH'da indüklenemeyen OmpA'nın bazik pH'da indüklendiği, OmpX'in pH 7 dışındaki diğer pH'larda indüklendiği gösterilmiştir (Stancik vd., 2002).

Literatürde, porin proteinlerinin biyofilm oluşumu ile bağlantısını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Herman vd., (2016), yaptıkları transkriptomik analizinde, *Salmonella*'dan alınan *ompA*, *ompC*, *ompX* ve *osmB* genlerinin *E. coli* DH5 α 'da biyofilm oluşumuna katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (Hermans vd., 2016). Başka bir çalışmada da, *E. coli* F18'de biyofilm oluşumunda, *ompC*, *ompF*, *ompT* genlerinin ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir, bu artış sayesinde adezyon ve otoagregasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir (Liao vd., 2017). *E. coli* MG1655 suşunun kullanıldığı bir çalışmada, *ompC* ekspresyonunun biyofilm oluşturmeyen hücrelere kıyasla biyofilm oluşturan hücrelerde artış gösterdiği belirlenmiştir (Virolle vd., 2020). *ompA* ile yapılan bazı çalışmalarda, *ompA* varlığının biyofilm oluşumunu desteklediğine yönelik sonuçlar bulunmuştur. Lower vd., (2005), *E. coli* B suşundan türetilen BL21 (DE3) ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, OmpA'nın abiyotik yüzeylere bağlanmak için gerekli olduğunu bildirmiştir. *E. coli* XL1 blue'da *ompA*'nın aşırı eksprese edilmesinin sonucu olarak, biyofilm oluşumunun gerçekleştiği tespit edilmiştir (Orme vd., 2006). Bir başka çalışmada, *E. coli* K12 suşunun *ompA* geninin delesyonunda biyofilm oluşumunun %80 azaldığı tespit edilmiştir (Barrios vd., 2006). Biyofilm oluşumu ile porin proteinlerinin ilişkisi hususunda porin ekspresyonunun artışının biyofilm oluşumuna katkısı

olduğunu gösteren bu çalışmaların yanında aksi ya da zıttı bulguların olduğu çalışmalar da bulunmaktadır. Ma ve Wood, (2009) yapmış oldukları çalışmalarında, *E. coli* BW25113 yabancı tipine göre, *ompA* mutant *E. coli*'nin daha fazla biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Bu tespitten sonra biyofilm oluşumunda *ompA*'nın etkilediği yolların belirlenmesi için transkriptom analizleri gerçekleştirilmiştir. Transkriptom analizinin sonucunda, Cpx sisteminin *ompA* ile aktive edildiği belirlenmiştir. *ompA*'nın olmamasının CpxAR sistemini indükleyebildiği ve bu sisteminde biyofilm üretimi için gerekli olan *csgD* ve *adrA*'yı aktive ettiği tespit edilmiştir (Ma ve Wood, 2009). Buna karşın *ompA* ile yapılan başka çalışmalarda, *ompA*'nın varlığının biyofilm oluşumunu desteklediğine yönelik sonuçlar da bulunmuştur (Lower vd., 2005). *E. coli* B suşundan türetilen BL21 (DE3) ile gerçekleştirilen bir çalışmada, OmpA'nın abiyotik yüzeylere bağlanmak için gerekli olduğu bildirilmiştir. *E. coli* XL1 blue'da *ompA*'nın aşırı eksprese edilmesinin sonucu olarak, biyofilm oluşumunun gerçekleştiği tespit edilmiştir (Orme vd., 2006). Bir başka çalışmada, *E. coli* K12 suşunun *ompA* geninin delesyonunda biyofilm oluşumunun %80 azaldığı tespit edilmiştir (Barrios vd., 2006). *E. coli* O157:H7'nin ise konakçı hücrelere yapışmada, OmpA'yı kullandığı belirlenmiş ve OmpA bir virülans faktörü olarak tanımlanmıştır (Hirakawa vd., 2021; Scotti vd., 2021). *Cymbopogon martini*'den (Hint sardunyası) elde edilen esansiyel yağların kullanıldığı bir çalışmada da *E. coli* O157:H7'un M9 minimal besiyerinde biyofilm oluşturmasının önüne geçilmiştir. Bu süreçte gerçek zamanlı PZR ile ekspresyon seviyeleri kontrol edilen *ompA*'nın biyofilm oluşumunun kaybıyla orantılı olarak hücrede azalış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, *ompA*'nın biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığına atfedilmiştir (Scotti vd., 2021). Yani bazı durumlarda *ompA* eksikliğinde biyofilm oluşmaktadır, bazı durumlarda ise *ompA* eksikliğinde biyofilm oluşumu azalmaktadır. Ancak *ompA* geni olmadığında hangi mekanizma ile biyofilm oluşumunun kontrol edildiği bilinmemektedir. *ompA*'nın biyofilm oluşumunu nasıl bir moleküler mekanizma ile etkilediğinin netleştirilmesi gerekmektedir. Literatürde *Aeromonas veronii* TH0426'de LamB porinin nakavt edildiği bir çalışma yapılmıştır, bu mutantta biyofilm oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir (Yang vd., 2019). Ayrıca *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*'da *lamB* mutantın biyofilm oluşturma kapasitesinin önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir (Kint vd., 2010). *E. coli*'de ise LamB porininin biyofilm ile ilişkisine dair literatürde herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Yapılan bir çalışmada; yabancı tip *E. coli* W3110 porin proteinlerine sahip olmasına rağmen asidik, nötr ve alkali pH değerlerinde biyofilm oluşumu göstermemiştir. Ancak *E. coli* W3110'un *ompA*, *ompC* ve *lamB* porin mutant suşları, asidik, nötr ve alkali pH değerlerinde

farklı oranlarda biyofilm oluşumu göstermiştir (Er, 2018). Aynı çalışmada *ompT*, *ompG*, *ompF* ve *phoE* mutantları da çalışılmış ancak bu mutantlarda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. *ompA*'nın yokluğunun asidik pH değeri olan 6,5'da hava-sıvı ara fazında kalın bir biyofilm tabakası oluşmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu pH değerleri 7 ve 7,5'ta artış gösterirken, pH 8'den sonra azalma göstermiştir. Buna ek olarak, *ompA* mutant *E. coli* suşunda biyofilm yapısına ek olarak, selüloz üretimi de tespit edilmiştir. *ompC* mutant *E. coli* suşu, en iyi pH 6,5 olmak üzere, denenen bütün pH değerlerinde (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0) katı-sıvı ara fazında biyofilm oluşturmuştur. LamB dış membran proteinini kodlayan *lamB* geni bakımından mutant olan *E. coli* suşu ile gerçekleştirilen çalışmalarda, iki farklı pH değerinde (7, 7,5) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir, ancak diğer pH'larda bitofilm oluşumu görülmemiştir. Literatürde benzer çalışmaların varlığı tarandığında, *lamB* geni ve biyofilm oluşumu hakkında çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmada bu mutantlarda *nhaR* ve *ygiU* genlerinin seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile araştırılmıştır (Er, 2018). Bu genlerle elde edilen sonuçlarda porin mutantları ile bu genlerin ilişkisi ortaya konulmuştur. Ancak biyofilm ile ilgili diğer genlerin durumları araştırılmadığı için tam anlamıyla bir moleküler mekanizma ortaya çıkarılamamıştır. Biyofilm üretimi gerçekleştirilmeyen yabani tipe kıyasla *ompA*, *ompC* ve *lamB* genlerinin yokluğu biyofilm oluşturma mekanizmasını bir şekilde tetikleyerek suşun biyofilm oluşturmaya neden olmaktadır. Burada bahsi geçen OmpA, LamB ve OmpC porin proteinlerine ait genlerin mutant olmasının pH değişimine bağlı olarak biyofilm oluşumu mekanizmasına nasıl dahil olduğu belirsizliğini korumaktadır.

2.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada verilen literatür bilgilerinden de görülebileceği gibi biyofilm oluşumunda *E. coli*'nin kullandığı birçok farklı biyofilm oluşumu mekanizması bulunmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız *E. coli* W3110 yabani tip suşu biyofilm oluşumu göstermemektedir. Daha önceki çalışmalarda, bu suşun sahip olduğu porin gen mutantlarında biyofilm oluşumu verdiği belirlenmiştir. W3110 *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarında farklı pH değerlerinde biyofilm oluşumu gözlenirken, *phoE*, *ompG*, *ompF* ve *ompT* mutantlarının çalışılan hiçbir şart ve koşulda biyofilm oluşumu vermediği tespit edilmiştir. Ancak porin mutantlarında, biyofilm ile direkt ilişkili genlerin ifade durumları hususunda bir bilgi bulunmamaktadır. Dolayısı ile porin aracılı biyofilm oluşumunun moleküler mekanizması açıklanamamıştır. Bu çalışmanın amacı, *E. coli* W3110'un *ompA*, *ompC*, *lamB* ve *phoE* porin genleri bakımından mutant olmasının biyofilmle ilişkili genlerin (*csrA*, *rscB*, *sdiA*, *qseB*, *qseC*, *pgaC* ve *csgD*) ifadeleri üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunu araştırmak ve bu genler üzerindeki etkilerden yola çıkarak moleküler mekanizmayı aydınlatmaktır. Böylece *ompC*, *ompA* ve *lamB* aracılı biyofilm oluşumunun mekanizmasına yönelik literatüre yeni bulgular kazandırmayı hedefliyoruz.

3. MATERYAL METOT

3.1. *Escherichia coli* suşları

Çalışmada kullanılan W3110 mutant suşları Tablo 3.1’de verilmiştir. Komplement hücreler ise transformasyon yönetimi ile elde edilmiş, laboratuvar stoklarımıza eklenmiştir. Bütün suşlar, %60 gliserol (Merck) ihtiva eden Luria Bertani (LB) broth besiyerinde hazır hale getirilmiş, stoklar -80 °C koşullarında derin dondurucuda (Panasonic) saklanmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar

Genotip	Kaynak
W3110 Yabani Tip	Lab. Stok
W3110 <i>ompA</i> ::Km	Lab. Stok
W3110 <i>ompC</i> ::Km	Lab. Stok
W3110 <i>lamB</i> ::Km	Lab. Stok
W3110 <i>phoE</i> ::Km	Lab. Stok
W3110 pLATE51:: <i>ompA</i>	Lab. Stok
W3110 pLATE51:: <i>ompC</i>	Lab. Stok
W3110 pLATE51:: <i>lamB</i>	Lab. Stok
W3110 pLATE51:: <i>phoE</i>	Lab. Stok
W3110 + pLATE51	Lab. Stok

3.2. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar

3.2.1. LB agar besiyeri

Bakteri suşlarının stoklarının +4 °C’de buzdolabı içerisinde saklanabilmesi için kullanılmıştır. 25 g LB broth (Merck) besiyerine, 15 g Agar Agar tartılıp ilave edildikten sonra 1 L dH₂O’da çözdürülmüştür. Sonrasında, otoklavda 15 dakika (dk) 121 °C’de steril edilmiştir. Daha sonrasında aseptik koşullarda steril petrilere dökülerek hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. LB broth besiyeri

Bakteri suşlarının büyümesi için gerekli ortam koşullarının sağlanmasında kullanılmıştır. LB broth (Merck) besiyerinden 25 g tartılarak, 1 L dH₂O içerisinde çözdürülmüş, tüplere ve erlenlere dağıtılmıştır. Sonrasında, otoklavda 15 dk 121 °C’de steril edilmiştir.

3.2.3. Tris-Borat-EDTA (TBE) elektroforez tamponu

108 g TRİS (Ultrapure), 40 mL pH 8'e ayarlanmış 0,5 M EDTA, 55 g borik asit (Merck) üzerine 1 L dH₂O ilave edilerek 10X TBE tamponu hazırlanmıştır.

3.2.4. Tris-HCl tamponu

1 M Tris-HCl'den 157,6 g/mol tartıldıktan sonra üzerine 1 L dH₂O ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.2.5. Tris-EDTA (TE) tamponu

1 M Tris-HCl'den 10 mL alınarak, son konsantrasyonda 10 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA'dan 2 mL alınarak, son konsantrasyonda 1 mM EDTA elde edilecek şekilde 1 L dH₂O içerisinde hazırlanmıştır.

3.2.6. IPTG (izopropil β -D-1-tiyogalaktopironasid) solüsyonu

100 mM IPTG (Sigma) hazırlanılması için 2,38 g IPTG (Thermo Scientific) tartılarak 99 mL dH₂O içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonrasında filtreden geçirilip steril hale getirildikten sonra 2 mL'lik ependorflara birer mL alikotlanarak, -20 °C'de koşullarında saklanmıştır.

3.2.7. pH tamponlarının hazırlanması

LB broth besiyerinin pH'sı 6, 7 ve 8 değerlerine pH tamponları kullanılarak ayarlanmıştır. Her bir tampon, besiyerinde son konsantrasyonda 50 mM'a denk gelecek şekilde kullanılmıştır.

3.2.7.1. 4-Morfolin etan sülfonik asit (MES) tamponu

1 M MES hazırlanılması için 19,52 g MES (Serva) tartılarak 100 mL dH₂O içerisinde çözdürülmüştür. Çözdürülen MES'in pH'sı 6'a ayarlandıktan sonra amber şişeye konularak, otoklavda 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir. Besiyeri pH'sının 6'a ayarlanmasında kullanılan MES tamponu, kullanıma kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2.7.2. 3-morfolin propan-1-sülfonik asit (MOPS) tamponu

1 M MOPS hazırlanılması için 20,927 g MOPS (Amresco) tartılarak 100 mL dH₂O içerisinde çözdürülmüştür. Çözdürülen MOPS'un pH'sı 7'e ayarlandıktan sonra amber şişeye konularak, otoklavda 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir. Besiyeri pH'sının 7'e ayarlanmasında kullanılan MOPS tamponu, kullanıma kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2.7.3. *N*-tris (hidroksimetil) metilglisin (tricine) tamponu

1 M tricine hazırlanması için 17,92 g tricine (Serva) tartılarak 100 mL dH₂O içerisinde çözdürülmüştür. Çözdürülen Tricine'in pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra amber şişeye konularak, otoklavda 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir. Besiyeri pH'sının 8'e ayarlanmasında kullanılan tricine tamponu, kullanıma kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.3. Koloni PZR

Stoklarımızda bulunan yabancı tip W3110 şusu, W3110 gen mutantları ve bunların komplement suşlarının kontrolü koloni PZR yöntemi ile sağlanmıştır.

LB agar besiyerine tek koloni olarak düşürülmüş kolonilerden seçilip 20 µL dH₂O içerisinde seyreltilmiştir. Sonrasında PZR tüplerine 1'er µL olacak şekilde alikotlanmıştır. Alikotlanan bakteri süspansiyonu üzerine PZR reaksiyonu karışımından 9 µL eklenmiştir (Tablo 3.2). İlgili genlerin doğrulamasında kullanılan primerler Tablo 3.3'te verilmiştir. PZR reaksiyon karışımı hazır hale getirildikten sonra Tablo 3.4'te verilen reaksiyon koşullarına uygun olarak PZR döngüleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. Koloni PZR reaksiyon karışımı (1 örneklilik)

Solüsyonlar	Miktar
dH ₂ O	6,15 µL
10X ThermaPol Reaksiyon Tamponu (Biolab)	1 µL
10 mM dNTP Mix	0,2 µL
10 µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µL
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µL
2 mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µL
0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µL
Bakteri Süspansiyonu	1 µL
Total	10 µL

Tablo 3.3. PZR (Thermo) döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü
94	3	1
94	1	30
56	1,5	
72	5	
4	10	1

Tablo 3.4. Koloni PZR primerleri

Primerler	Primer Dizisi
Evrensel K1 geri primeri	5'-CAGTCATAGCCGAATAGCCT-3'
W3110:: <i>ompA</i> ileri primeri	5'-TATGCCTGACGGAGTTCACA-3'
W3110:: <i>ompA</i> geri primeri	5'-GGCATTGCTGGGTAAGGAAT-3'
W3110:: <i>ompC</i> ileri primeri	5'-TTTGGGGAGAATGGACTTGC-3'
W3110:: <i>ompC</i> geri primeri	5'-CGCAACCAACAAAGAAGAGC-3'
W3110:: <i>lamB</i> ileri primeri	5'-ATGTCGTCGACTGCATAAGG-3'
W3110:: <i>lamB</i> geri primeri	5'-AGCCGTTGTAGGCCTGATAA-3'
W3110:: <i>phoE</i> ileri primeri	5'-AAGCATGGCGTTTTGTTGCG-3'
W3110:: <i>phoE</i> geri primeri	5'-TTTCACGAGAAGCTGCGTGA-3'
pLATE51:: <i>ompA</i> ileri primeri	5'-GGTGATGATGATGATGACAAGATGAAAAAGACAGCTATCGCG-3'
pLATE51:: <i>ompA</i> geri primeri	5'-GGAGATGGGAAGTTAAGCCCTGCCCTGGCGG-3'
pLATE51:: <i>ompC</i> ileri primeri	5'-GTGATGATGATGACGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCC-3'
pLATE51:: <i>ompC</i> geri primeri	5'-GGAGATGGGAAGTCATTAGAACTGGTAAACCAGACCCAGA-3'
pLATE51:: <i>lamB</i> ileri primeri	5'-GGTGATGATGATGACAAGATGATGATTACTCGAAACTTCC-3'
pLATE51:: <i>lamB</i> geri primeri	5'-GGAGATGGGAAGTCATTACCACCAGATTTCCTCTGGGCAC-3'
pLATE51:: <i>phoE</i> ileri primeri	5'-GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGAGCACTCTGGC-3'

3.4. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan jel, %1'lik agaroz (Sigma) kullanılarak hazırlanmıştır. Jelin hazırlanması için 1.2 g agaroz tartılarak erlene koyulduktan sonra üzerine 120 mL 1x TBE eklenmiştir. Mikrodalgada orta ısıda 2 dk tutulduktan sonra agaroz iyice çözüldürülmüştür. Erlenin oda sıcaklığında birazcık soğuması beklendikten sonra 10 mg/mL EtBr'den (Sigma) 1 µL eklenmiştir. Hazırlanan jel iyice karıştırıldıktan sonra elektroforez cihazının tankına dökülmüştür. DNA'ların yükleneceği kuyucukların oluşturulması adına tank üzerine taraklar yerleştirilmiştir. Jelin katılaşması gerçekleştikten sonra taraklar çıkarılmış ve oluşan kuyucuklara 5 µL DNA örneğiyle birlikte 1 µL yükleme boyası (Sigma) karıştırılarak yükleme yapılmıştır. Yükleme sonrasında elektroforez cihazı 120 mV 40 dk'a ayarlanarak DNA'ların yürümesi sağlanmıştır.

3.5. Biyofilm oluşumunun tespiti (tüp metodu)

Biyofilm oluşumlarının tespit edilmesi için niteliksel bir yöntem olan tüp metodu kullanılmıştır (Christensen vd., 1982). İlk olarak, LB agar içeren petride tek koloni olarak düşürülmüş bakteri kolonisi, 5 mL LB broth besiyeri içeren vakum kapaklı tüplere aktarılmıştır. Tüpler 37 °C'de 170 rpm çalkalama hızıyla gece boyunca (18 saat) inkübe edilmiştir. Ardından bakterilerin yoğunluğu OD₆₀₀'de ölçülmüş ve 5 mL LB broth besiyeri içerisinde OD₆₀₀'de 0,01 olacak şekilde seyreltilmiştir. Yoğunlukları eşitlenmiş bakterilerin biyofilm oluşumlarını değerlendirmek adına, bakteriler bir gün boyunca (24 saat) 37 °C'de 170 rpm çalkalama hızıyla inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, besiyerleri pipet ile dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Tüp içerisinde kalan besiyerinin ve yüzeye tutunmayan bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması için tüpler dH₂O ile en az 3 kere yıkanmıştır. Daha sonrasında tüpler baş aşağı şekilde kurumaya bırakılmıştır. Tüpler kuruduktan sonra, uzaklaştırılan besiyeri ile aynı hacimde (5 mL), %0,1'lik kristal viyole boyasından tüplere eklenmiştir ve tüpler 20 dk boyunca 170 rpm çalkalama hızıyla inkübe edilmiştir. Boyama sonrasında, tüplerdeki fazla boyayı ortamdan uzaklaştırmak için tüpler, dH₂O ile en az 3 kere yıkanmıştır ve baş aşağı şekilde kurumaya bırakılmıştır. Tüpler kurutulduktan sonra, tüplerde oluşan kristal viyole halkalarının çözünmesini sağlamak için her bir tüpe 5 mL %30'luk asetik asit çözeltisi eklenmiştir ve tüpler 10 dk boyunca 170 rpm çalkalama hızıyla inkübe edilmiştir. Homojen hale gelen boya çözeltisinden 1 mL alınarak spektrofotometre'de (Thermo) OD₅₄₀ nm'de ölçüm alınmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 3.5'e göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre her bir suşun biyofilm oluşumu derecelendirilmiştir.

Tablo 3.5. Biyofilm oluşumu derecelendirmesi

Kaynak: (Stepanović vd., 2001; Swedan vd., 2019)

Ortalama OD Değeri	Biyofilm Oluşumu
$OD \leq OD_c$	Negatif Biyofilm Üreticisi
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf Biyofilm Üreticisi
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Orta Biyofilm Üreticisi
$4 \times OD_c < OD$	Kuvvetli Biyofilm Üreticisi

Optik dansite sınır değeri (OD_c) = negatif kontrolün ortalama OD'si + negatif kontrolün 3x standart sapması (SD)

Tüp metodu komplement hücreler için de uygulanmıştır. Komplement hücrelerde protein ekspresyonunun indüklenmesi için LB broth besiyerine IPTG ilave edilmiştir. Yapılan her bir deneme için en az 3 tekrar gerçekleştirilmiştir.

3.6. Biyofilm ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi

3.6.1. Total RNA izolasyonu

Total RNA eldesi için total RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, MN) kullanılmıştır. Farklı pH değerlerinde (6, 7 ve 8) büyütülen yabani tip, mutant ve komplement suşlardan içinde 10^9 hücre olacak şekilde pelletler elde edilmiştir. Pelletler, 1 mg/mL lizozim (Sigma) içeren 100 μ L TE tamponunda yeniden süspansiyon edilmiştir ve 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonrasında kitin protokolünde belirtildiği gibi, hücre süspansiyonunun üzerine 350 μ L RA1 ve 3,5 μ L β -merkaptoetanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Elde edilen karışım, 2 mL'lik ependorf tüpüne yerleştirilen NucleoSpin filtresine (Mor halkalı) transfer edilmiş ve devamında 1 dk 11.000 x g'de santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası filtre atılmış, toplama tüpüne geçen sıvı üzerine 350 μ L %70'lik etanolden eklenmiş ve 5 kez pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrası karışım, yeni bir toplama tüpüne (2 mL) yerleştirilmiş bir NucleoSpin® RNA Column'a (açık mavi halka) alınmıştır ve 11.000 x g'de 30 saniye (sn) santrifüj edilmiştir. Devamında, 350 μ L MDB (Membran Tuz Giderme Tamponu) eklenmiş ve membranın kuruması için 11.000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtrede DNA kalıntısı kalmaması için filtrenin merkezine 95 μ L rDNase reaksiyon karışımı eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında, NucleoSpin RNA Column'a 200 μ L RAW2 Tamponu eklenmiş ve 11.000 x g'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonrası, ilk olarak 600 μ L RA3 tamponu eklenmiş ve 11.000 x g'de 30 sn santrifüjlenmiş ve sonrasında 250 μ L RA3 tamponu eklenerek 11.000 x g'de 2 dk

santrifüjlenmiştir. Son olarak filtreye 60 µL RNase içermeyen H₂O eklenmiş ve 1 dk oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra 11.000 x g'de 1 dk santrifüjlenerek RNA'ların eldesi sağlanmış ve cDNA'ya dönüştürülene kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.6.2. Total RNA eldesinin kontrolü

Elde edilen RNA'ların durumlarının kontrolünün sağlanması için, RNA'lar %1 agaroz içeren 120 mL jele yüklenmiş ve 120 mV'de 40 dk yürütülmüştür. Jel görüntüleri kontrol edilen örneklerden cDNA sentezi için uygun (parlak ve iki bant veren) olan örnekler seçilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. cDNA sentezi

Seçilmiş RNA'ların cDNA'larının sentezlenmesinde cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Nükleaz içermeyen bir PZR tüpüne RNA örneklerinden 1 µg'a denk gelecek şekilde RNA alınmış, 1 µL Random Hexamer Primer'den eklenmiş ve üzeri nükleaz içermeyen H₂O ile toplam hacim 12 µL olacak şekilde tamamlanmıştır. Sonrasında ise karışıma, 4 µL 5X reaksiyon tamponu, 1 µL Ribolock RNase inhibitörü (20U/µL), 2 µL 10 mM dNTP karışımı ve 1 µL RevertAid M-MiLV RT (200 U/µL) eklenmiş ve reaksiyon karışımının toplam hacmi 20 µL'e getirilmiştir. Nazikçe pipetaj yapılmış ve santrifüj edilmiştir. PZR cihazında Tablo 3.6'da gösterildiği şekilde inkübe edilmiştir.

Tablo 3.6. cDNA sentezi inkübasyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
25	5
42	60
70	5

3.6.4. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için primerler tasarlanması

Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) deneylerinde kullanılacak ve araştırılan genlere spesifik olan primerlerin dizaynında, baz dizilerinin G-C oranlarına ve dimerleşme yapıp yapmama durumlarına dikkat edilmiştir. Dizaynları yapılan primerler liyofilize olarak tarafımıza ulaştırılmıştır (Tablo 3.7). Primerlerin sulandırılmasında, 10 mM'lık TE tamponu

kullanılmıştır. Her bir liyofilize primer TE ile çözündürülmüş ve vortekslenmiştir. Çözürülen her bir stok primer solüsyonundan 10 µL alınarak üzerine 90 µL TE tamponu eklenmiş ve 10 kat sulandırılmış çalışma solüsyonları elde edilmiştir. Çalışma solüsyonları ve stok primer solüsyonları kullanıma kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 3.7. Kantitatif gerçek zamanlı PZR’da kullanılan primerlerin dizileri

Primerler	Primer Dizisi
<i>csgD</i> ileri primeri	5'-ACGCCTGAAGATTACCCGTA-3'
<i>csgD</i> geri primeri	5'-GCGATCTCGTTATTAGACGC-3'
<i>ycdQ (pgaC)</i> ileri primeri	5'-AACCATACACGCCGCTTTAG-3'
<i>ycdQ (pgaC)</i> geri primeri	5'-ATGCGGCAATAACACCGGAA-3'
<i>csrA</i> ileri primeri	5'-TGCTGATTCTGACTCGTCGA-3'
<i>csrA</i> geri primeri	5'-CTGGATACGCTGGTAGATCT-3'
<i>rcsB</i> ileri primeri	5'-ACGGCGATGGCATTACCTTA-3'
<i>rcsB</i> geri primeri	5'-GCGCAGAACTTCACTCTCTT-3'
<i>sdiA</i> ileri primeri	5'-CTGAGGCGTGGGTAGTTAT-3'
<i>sdiA</i> geri primeri	5'-AACGCATCAGAGCCATCAGA-3'
<i>qseB</i> ileri primeri	5'-TGATGCGGTGATCCTGGATT-3'
<i>qseB</i> geri primeri	5'-TCGCAGATGATGCACATGCA-3'
<i>qseC</i> ileri primeri	5'-AACTGGTCGGTGAAGACGAT-3'
<i>qseC</i> geri primeri	5'-AACCATCATCGCATGTGTGC-3'
<i>uidA</i> ileri primeri	5'-CGGAAGCAACGCGTAAACTC-3'
<i>uidA</i> geri primeri	5'-TGATGGTATCGGTGTGAGCG-3'

3.6.5. Kantitatif gerçek zamanlı PZR

Kantitatif gerçek zamanlı PZR’da kalıp olarak cDNA’lar kullanılmıştır. SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) kiti kullanılmış ve kitin kullanım kılavuzuna uygun olarak bileşenler (Tablo 3.8) eklenerek Tablo 3.9’deki PZR döngü sıcaklıklarına ayarlanarak (AriaMx, Agilent) PZR gerçekleştirilmiştir. mRNA seviyelerinin doğru bir şekilde ölçülmesini sağlamak

için, her gen için üç amplifikasyon, toplam mRNA'nın 1 ve 1/10 dilüsyonları ile yapılmıştır. Ölçülen mRNA seviyeleri, referans gen (kontrol) olan Beta-glukuronidaz (*uidA*) (Barbau-Piednoir vd., 2018) transkriptinin mRNA seviyelerine normalize edilmiştir. Test edilen farklı koşullarda ifade düzeylerinin oranlarını hesaplamak için normalleştirilmiş değerler kullanılmıştır. Verilerin işlenmesi için ise, Agilent Aria v1.5 yazılımı kullanılmıştır.

Tablo 3.8. Kantitatif gerçek zamanlı PZR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
cDNA kalıp	1 µL
Primer F	0,5 µL
Primer R	0,5 µL
DEPC'li dH ₂ O	3 µL
SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)	5 µL
Total	10 µL

Tablo 3.9. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sıcaklık döngüsü

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
95	5
95	0,5
60	1

3.7. İstatiksel analiz ve sonuçların değerlendirilmesi

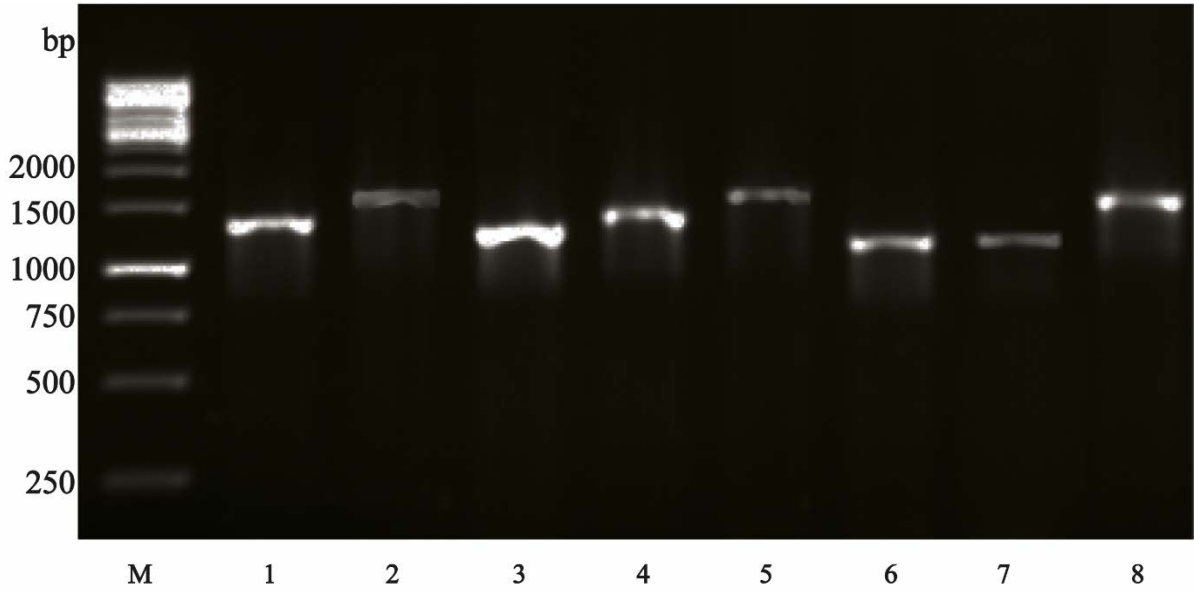
Bu çalışmada yapılan en az 3 bağımsız ve 3 bağımlı tekrarın istatistiksel analizleri için Graphpad programında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır. Bu analiz ile p değerleri hesaplanmıştır (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, ****, p<0,0001). Önem dereceleri, grafiklerdeki "*" işaretleri ile gösterilmiş, standart sapmalar ise hata çubuklarıyla gösterilmiştir.

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç

4.1.1. Yabani Tip ve Mutant Suşların Doğrulanması

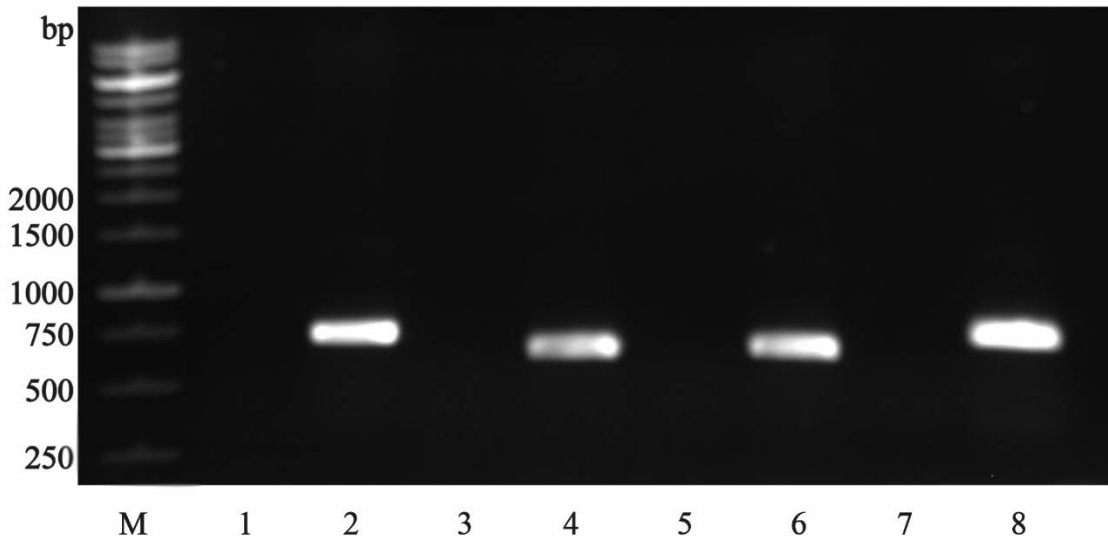
Çalışmada kullanılan yabancı tip ve mutantların kontrolünün sağlanması için Tablo 3.4’de verilen ileri primer ve geri primerler ile PZR gerçekleştirilmiştir. Yabancı tip *E. coli* W3110’da bulunan porin geni *ompA*, f-r primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda 1328 baz çifti (bç) büyüklüğünde bir PZR ürünü verirken, *ompA::Km* ise 1501 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü vermiştir (Şekil 4.1. 1,2). Yabancı tip *E. coli* W3110’da bulunan diğer porin geni *ompC*, f-r primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda 1373 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü verirken, *ompC::Km* ise 1483 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü vermiştir (Şekil 4.1. 3,4). Yabancı tip *E. coli* W3110’da bulunan ve maltoporini kodlayan *lamB* geni, f-r primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda 1539 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü verirken, *lamB::Km* ise 1412 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü vermiştir (Şekil 4.1. 5,6). Yabancı tip *E. coli* W3110’da bulunan fosfoporin E’yi kodlayan *phoE* geni, f-r primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda 1393 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü verirken, *phoE::Km* ise 1551 bç büyüklüğünde bir PZR ürünü vermiştir (Şekil 4.1. 7,8).



Şekil 4.1. Yabancı tip *E. coli* W3110 ve gen mutantlarının ileri ve geri primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR’ın jel elektroforez görüntüsü

M: Marker, 1- W3110, 2- W3110 *ompA::Km*, 3- W3110, 4- W3110 *ompC::Km*, 5- W3110, 6- W3110 *lamB::Km*, 7- W3110, 8- W3110 *phoE::Km*

Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutant suşlarının antibiyotik (kanamisin) direnç genlerinin kontrolü için ileri primerler ve k1 geri primerinin (Tablo 3.4) kullanıldığı PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda, yabani tip *E. coli* W3110'un bulunduğu 1,3,5,7 nolu kuyucuklarda PZR bantı gözlenmemiştir. Bu da yabani tip *E. coli* W3110'da antibiyotik direncinin olmadığını göstermektedir. 2. kuyucukta, f ve k1 primerleri ile PZR'ı gerçekleştirilen *ompA*::Km mutantının bantı gösterilmektedir, buna göre *ompA*::Km mutanı ile yapılan PZR'da 689 bp büyüklüğünde bir PZR bantı elde edilmiştir. 4. kuyucukta, f ve k1 primerleri ile PZR'ı gerçekleştirilen *ompC*::Km mutantının bantı gösterilmektedir, buna göre *ompC*::Km mutanı ile yapılan PZR'da 661 bp büyüklüğünde bir PZR bantı elde edilmiştir. 6. kuyucukta, f ve k1 primerleri ile PZR'ı gerçekleştirilen *lamB*::Km mutantının bantı gösterilmektedir, buna göre *lamB*::Km mutanı ile yapılan PZR'da 605 bp büyüklüğünde bir PZR bantı elde edilmiştir. 8. kuyucukta ise f ve k1 primerleri ile PZR'ı gerçekleştirilen *phoE*::Km mutantının bantı gösterilmektedir, buna göre *phoE*::Km mutanı ile yapılan PZR'da 701 bp büyüklüğünde bir PZR bantı elde edilmiştir. K1 primeri kullanılarak yapılan antibiyotik direnci doğrulamasıyla birlikte, çalışmada kullanılan bütün mutantlar doğrulanmıştır (Şekil 4.2).

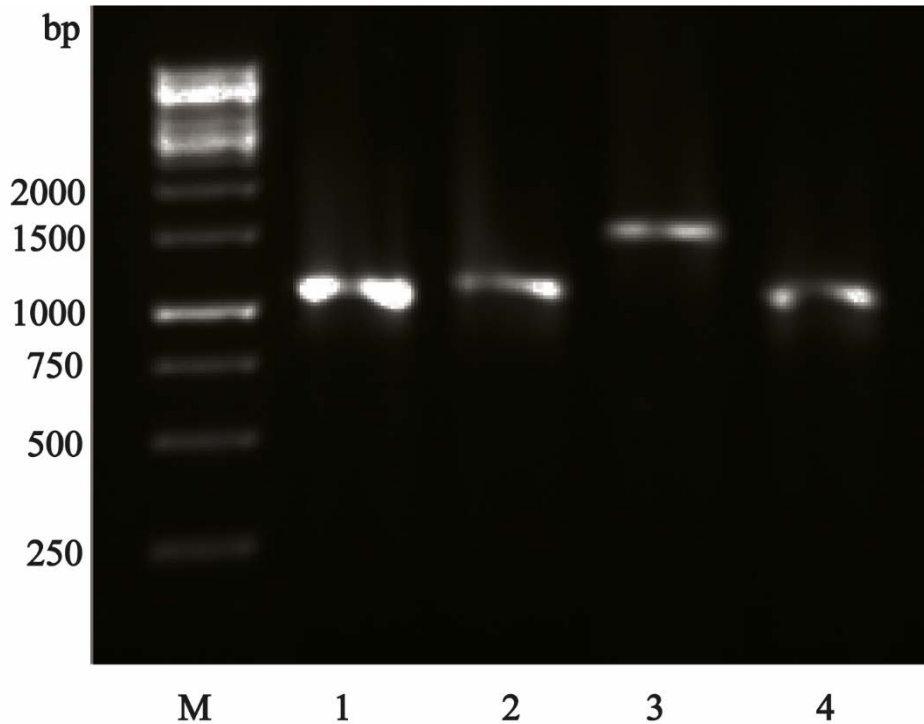


Şekil 4.2. Yabani tip *E. coli* W3110 ve gen mutantlarının ileri ve K1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ın jel elektroforez görüntüsü

M: Marker, 1- W3110, 2- W3110 *ompA*::Km, 3- W3110, 4- W3110 *ompC*::Km, 5- W3110, 6- W3110 *lamB*::Km, 7- W3110, 8- W3110 *phoE*::Km

W3110 mutantlarından elde edilen verilerin doğrulamasının sağlanması için komplement hücreler kullanılmıştır. Komplement hücreler, mutant hücrelerin oluşturulması sırasında silinmiş gen bölgelerinin plazmit aracılığıyla tekrardan mutant hücrelere transforme edilmesiyle elde edilmektedir. Laboratuvar stoğumuzda bulunan komplement hücreler, aLICator™ LIC Cloning and Expression Kit 2 (Thermo Scientific) kullanılarak elde edilmiştir. Kit kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde, eksik olan her bir gen bölgesi pLATE51 vektörüne aktarılıp, ilgili gen bölgelerini içeren plazmitler transformasyon yöntemiyle mutant hücrelere transforme edilmektedir. Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerin kontrolü ampisilin antibiyotiği ile sağlanmaktadır.

Çalışmada kullanılan gen mutantlarının komplement hücrelerinin kontrolü için, her bir gene özel olarak tasarlanmış ileri ve geri primerler (Tablo 3.4) kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. PZR sonucunda elde edilen jel elektroforez görüntüsünde, pLATE51::*ompA* 1194 bp, pLATE51::*ompC* 1254 bp, pLATE51::*lamB* 1498 bp ve pLATE51::*phoE* 1156 bp uzunluğunda PZR bantları vermiştir (Şekil 4.3). Bu bantların kontrolüyle birlikte, komplement hücrelerin doğrulaması da yapılmıştır.

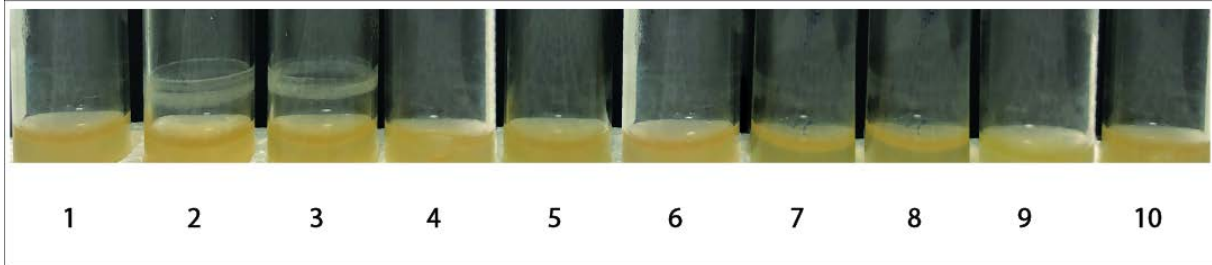


Şekil 4.3. W3110 pLATE51 mutantlarının ileri ve geri primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR'ın jel elektroforez görüntüsü

M: Marker, 1- pLATE51::*ompA*, 2- pLATE51::*ompC*, 3- pLATE51::*lamB*, 4- pLATE51::*phoE*

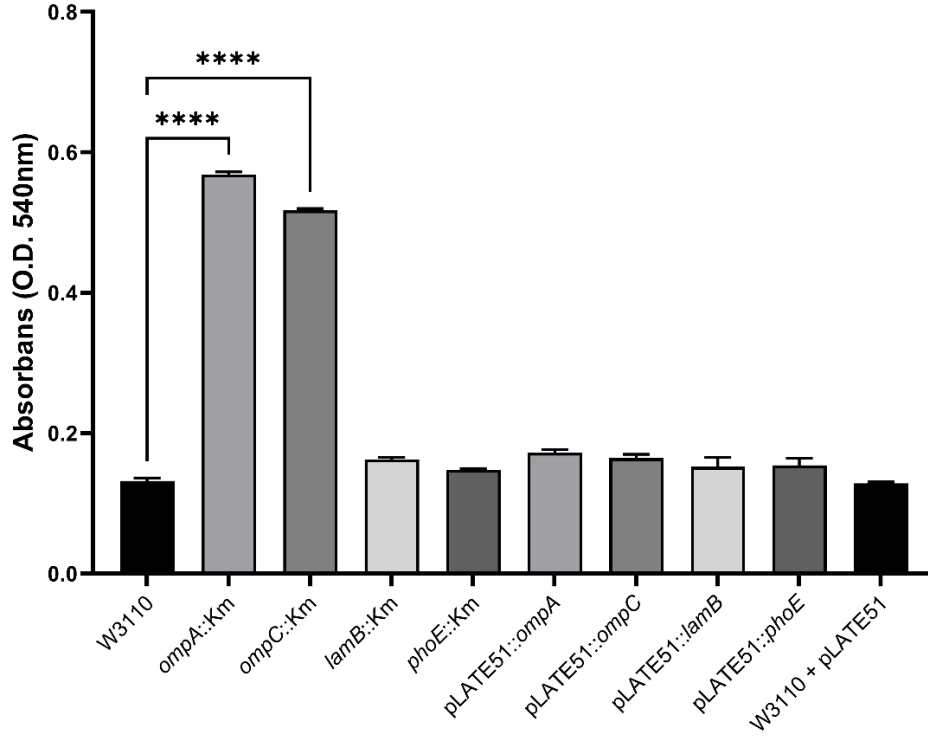
4.1.2. pH Değişiminin Yabani Tip ve Mutant Suşların Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Yabani tip *E. coli* W3110 ve gen mutantlarının 3 farklı pH değerlerinde (6, 7, 8) biyofilm oluşumları tüp metoduyla incelenmiştir. Bu incelemelere göre, pH 6 değerinde yabani tip *E. coli* W3110, *lamB::Km* ve *phoE::Km*'de biyofilm oluşumu gözlenmezken, *ompA::Km* ve *ompC::Km*'de biyofilm oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.4). pH 6 değerinde biyofilm oluşumları test edilen suşların her birinin 24 saat inkübasyon sonrası pH değişimleri ölçülmüş, biyofilm oluşturan suşlarda pH değerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Suşların oluşturdıkları biyofilm miktarlarının belirlenmesinde ise kristal viyole metodunda belirtilen prosedür uygulanıp, OD₅₄₀ nm'de ölçüm alınmıştır. Bu ölçüm sonucunda elde edilen veriler Grafik 4.1'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, *ompA::Km* 0,568, *ompC::Km* 0,517 ve yabani tip *E. coli* W3110 ise 0,132 OD değeri vermiştir. Biyofilm oluşumu veren mutantların (*ompA::Km* ve *ompC::Km*) komplementlerindeki durumları kontrol edilmiş ve biyofilm oluşumunun yabani tip W3110 ile aynı seviyeye geldiği belirlenmiştir. *ompA* ve *ompC* mutantlarının komplement suşlarının biyofilm değerleri sırasıyla 0,172 ve 0,164 olmuştur. Bu değerlerin W3110'da elde edilen değere oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Bu sayede biyofilm oluşumunun tek gen mutasyonu kaynaklı olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 4.4. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların pH 6 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu

1- W3110, 2- W3110 *ompA::Km*, 3- W3110 *ompC::Km*, 4- W3110 *lamB::Km*, 5- W3110 *phoE::Km*, 6- W3110 pLATE51::*ompA*, 7- W3110 pLATE51::*ompC*, 8- W3110 pLATE51::*lamB*, 9- pLATE51::*phoE*, 10- W3110 + pLATE51



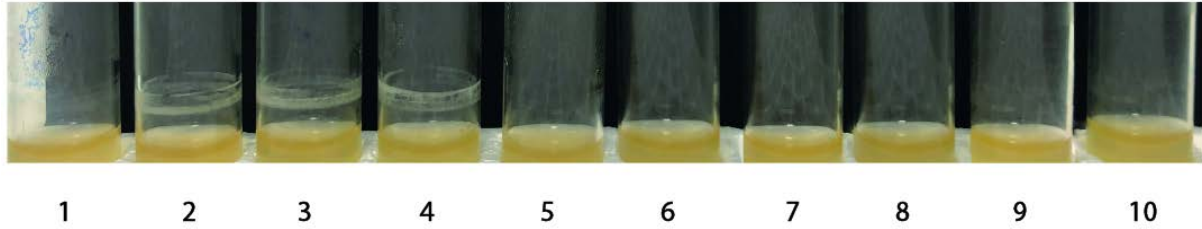
Grafik 4.1. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 6’da inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki biyofilm oluşumları

(****, $p < 0,0001$)

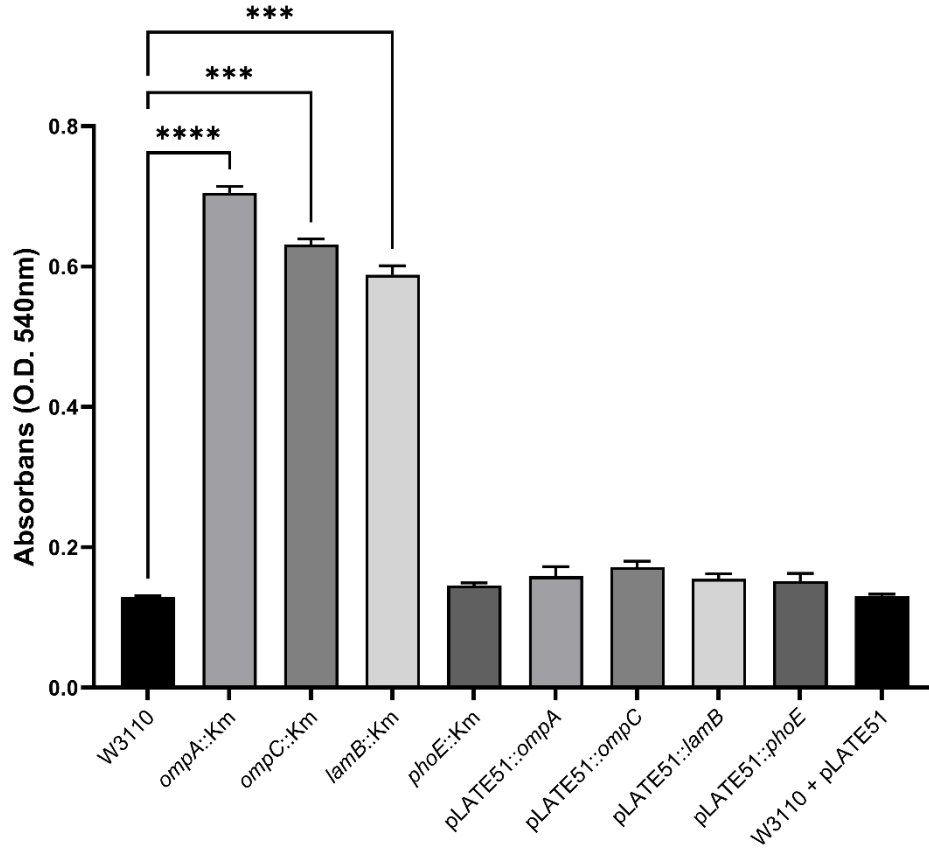
Tablo 4.1. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 6’da inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki pH değişimleri

Suş	İnkübasyon Sonrası pH
W3110 Yabani Tip	6,25±0.05
W3110 <i>ompA</i> ::Km	6,53±0.09
W3110 <i>ompC</i> ::Km	6,81±0.07
W3110 <i>lamB</i> ::Km	6,35±0.04
W3110 <i>phoE</i> ::Km	6,31±0.03
W3110 pLATE51:: <i>ompA</i>	6,36±0.06
W3110 pLATE51:: <i>ompC</i>	6,37±0.05
W3110 pLATE51:: <i>lamB</i>	6,28±0.09
W3110 pLATE51:: <i>phoE</i>	6,30±0.03
W3110 + pLATE51	6,27±0.04

pH 7 değerinde yabani tip *E. coli* W3110 ve *phoE::Km*'de biyofilm oluşumu gözlenmezken, *ompA::Km*, *ompC::Km* ve *lamB::Km*'de biyofilm oluşumu gözlenmiştir (şekil 4.5). pH 7 değerinde biyofilm oluşumları test edilen suşların her birinin 24 saat inkübasyon sonrası pH değişimleri olulmuş ve biyofilm oluşturan suşlarda pH'nin yükseldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.2). pH 7 de biyofilm belirlenmesi için kullanılan kristal viyole ölüm sonucu elde edilen veriler Grafik 4.2'de verilmiştir. En yüksek OD değeri 0,705 ile, *ompA::Km*'de olulurken, diğer biyofilm oluşturan mutantlarda sırasıyla, *ompC::Km*'de 0,631 ve *lamB::Km*'de ise 0,588 OD değeri olulmuştur. Yabani tip *E. coli*'nin OD değeri ise 0,129 olarak olulmuştur. Biyofilm oluşumu veren mutantların (*ompA::Km*, *ompC::Km* ve *lamB::Km*) komplement suşlarında biyofilm oluşumu gorulmediği 0,158, 0,172 ve 0,155 değerleri ile belirlenmiştir. Bu sayede biyofilm oluşumunun porin geninin mutasyonu kaynaklı olduğu doğrulanmiştir.



şekil 4.5. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 7 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu
1- W3110, 2- W3110 *ompA::Km*, 3- W3110 *ompC::Km*, 4- W3110 *lamB::Km*, 5- W3110 *phoE::Km*, 6- W3110 pLATE51::*ompA*, 7- W3110 pLATE51::*ompC*, 8- W3110 pLATE51::*lamB*, 9- pLATE51::*phoE*, 10- W3110 + pLATE51



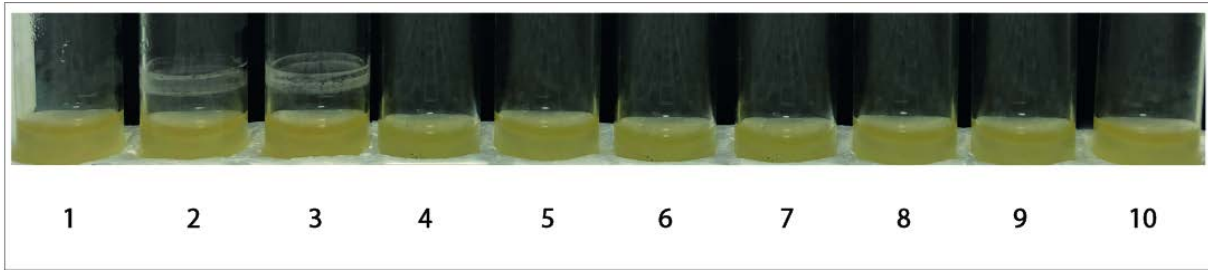
Grafik 4.2. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 7’de inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki biyofilm oluşumları

(***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$)

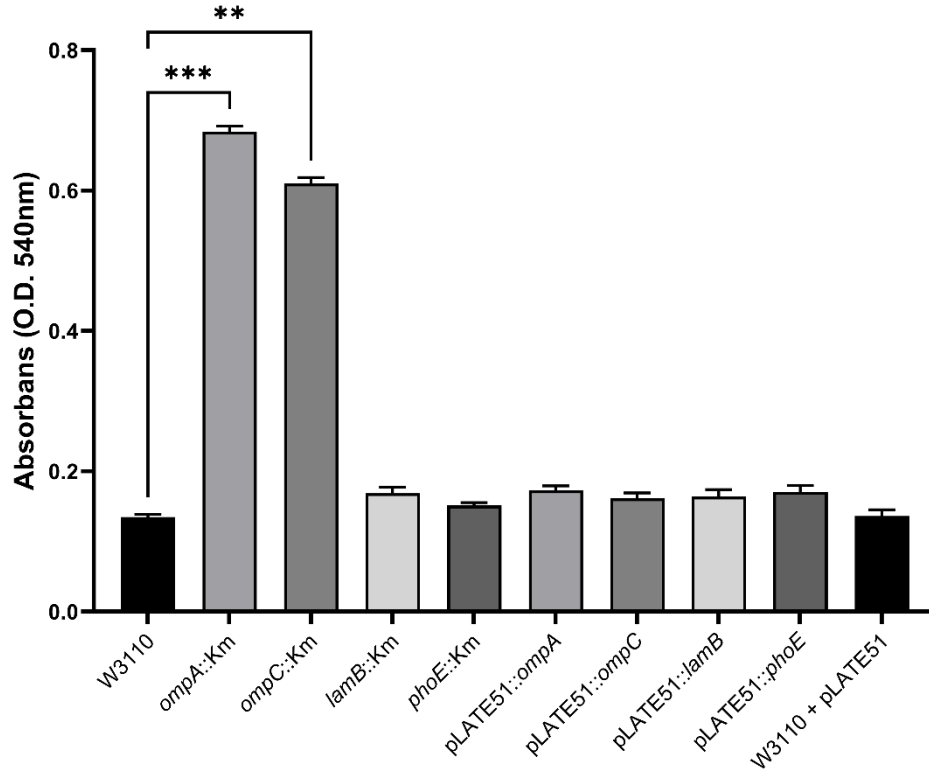
Tablo 4.2. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 7’de 24 inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki pH değişimleri

Suş	İnkübasyon Sonrası pH
W3110 Yabani Tip	7,01±0.07
W3110 <i>ompA</i> ::Km	7,29±0.06
W3110 <i>ompC</i> ::Km	7,37±0.09
W3110 <i>lamB</i> ::Km	7,31±0.11
W3110 <i>phoE</i> ::Km	7,08±0.05
W3110 pLATE51:: <i>ompA</i>	7,12±0.08
W3110 pLATE51:: <i>ompC</i>	7,09±0.03
W3110 pLATE51:: <i>lamB</i>	7,11±0.09
W3110 pLATE51:: <i>phoE</i>	7,06±0.12
W3110 + pLATE51	7,05±0.04

Ortamın pH'ının 8 olduğu şartlarda, yabani tip *E. coli* W3110, *lamB::Km* ve *phoE::Km*'de biyofilm oluşumu yokken, *ompA::Km* ve *ompC::Km*'de biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.6). pH 8 değerinde biyofilm oluşumları test edilen suşların her birinin 24 saatlik inkübasyon sonrası pH değişimleri ölçülmüş ve pH'ın biyofilm oluşturan *ompA* ve *ompC*'e ek olarak, *lamB* mutantında da arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.3). Kristal viyole metoduna göre suşların oluşturdukları biyofilmler boyanmış ve sonrasında çözdürülen boya OD₅₄₀ nm'de ölçülmüştür. Bu ölçüm sonucunda elde edilen veriler Grafik 4.3'te verilmiştir. Elde edilen OD değerlerine göre, biyofilm oluşturan *ompA::Km*'nin OD değerinin 0,684 olduğu, *ompC::Km*'nin OD değerinin ise 0,610 olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturmeyen yabani tip *E. coli* W3110'un OD değeri 0,135 olarak ölçülmüştür. Biyofilm oluşturan mutantların (*ompA::Km* ve *ompC::Km*) komplement suşlarında biyofilm oluşumunun yabani tip W3110 ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, pLATE51::*ompA* 0,172 değerini verirken, pLATE51::*ompC* ise 0,161 değerini vermiştir. Bu sayede biyofilm oluşumunun porin mutasyonundan kaynaklandığı doğrulanmıştır.



Şekil 4.6. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 8 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu
1- W3110, 2- W3110 *ompA::Km*, 3- W3110 *ompC::Km*, 4- W3110 *lamB::Km*, 5- W3110 *phoE::Km*, 6- W3110 pLATE51::*ompA*, 7- W3110 pLATE51::*ompC*, 8- W3110 pLATE51::*lamB*, 9- pLATE51::*phoE*, 10- W3110 + pLATE51



Grafik 4.3. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 8’de inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki biyofilm oluşumları

(**, p<0,01; ***, p<0,001)

Tablo 4.3. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 8’de inkübasyonu sonucunda LB broth besiyerindeki pH değişimleri

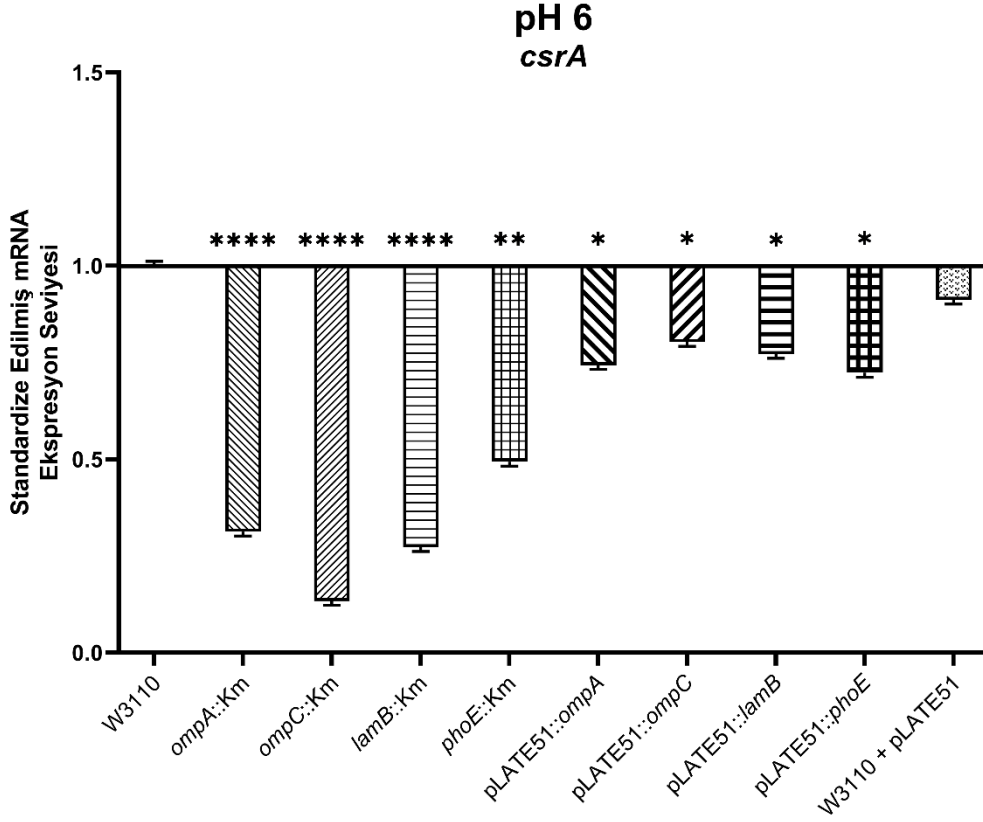
Suş	İnkübasyon Sonrası pH
W3110 Yabani Tip	7,48±0.04
W3110 <i>ompA</i> ::Km	7,65±0.03
W3110 <i>ompC</i> ::Km	7,64±0.06
W3110 <i>lamB</i> ::Km	7,66±0.08
W3110 <i>phoE</i> ::Km	7,54±0.06
W3110 pLATE51:: <i>ompA</i>	7,51±0.04
W3110 pLATE51:: <i>ompC</i>	7,56±0.06
W3110 pLATE51:: <i>lamB</i>	7,47±0.08
W3110 pLATE51:: <i>phoE</i>	7,52±0.07
W3110 + pLATE51	7,50±0.08

4.1.3. Porin Mutantlarında Biyofilm Oluşumunda Rol Alan Genlerin Araştırılması

Gerçek zamanlı PZR kullanılarak, biyofilm oluşumu üzerinde role sahip olan genlerin pH değişimiyle nasıl etkilendiği incelenmiştir. Her bir suşun çalışmada kullanılan pH değerlerinde (6, 7 ve 8) büyütülmüş 24 saatlik kültürlerinden en az 3 bağımsız tekrar olmak üzere izole edilen RNA'larının kullanıldığı gerçek zamanlı PZR ile, *csrA*, *rcsB*, *sdiA*, *qseB*, *qseC*, *pgaC* ve *csgD* genlerinin ekspresyon seviyelerinin suşlar arasındaki değişimleri karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda, pH 6, 7 ve 8 değerlerinde *csrA* için elde edilen veriler Grafik 4.4 – 4.6'da, *rcsB* için elde edilen veriler Grafik 4.7 – 4.9'da, *sdiA* için elde edilen veriler Grafik 4.10 – 4.12'de, *qseB* için elde edilen veriler Grafik 4.13 – 4.15'de, *qseC* için elde edilen veriler Grafik 4.16 – 4.18'de, *pgaC* için elde edilen veriler Grafik 4.19 – 4.21'de ve *csgD* için elde edilen veriler ise Grafik 4.22 – 4.24'de verilmiştir.

pH 6 değerinde 24 saat büyütülen suşların RNA'larından elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *csrA* gen ifadesi *ompC::Km* suşunda kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Önemli şekilde azalmanın gözlemlendiği diğer suşlar (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe), *lamB::Km*, *ompA::Km* ve *phoE::Km* olarak belirlenmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Komplementlerdeki gen ekspresyonlarının gen mutantlarına göre daha fazla olduğu belirlenmiş, kontrol olarak kullanılan yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine yaklaşmakla birlikte daha az olduğu tespit edilmiştir.

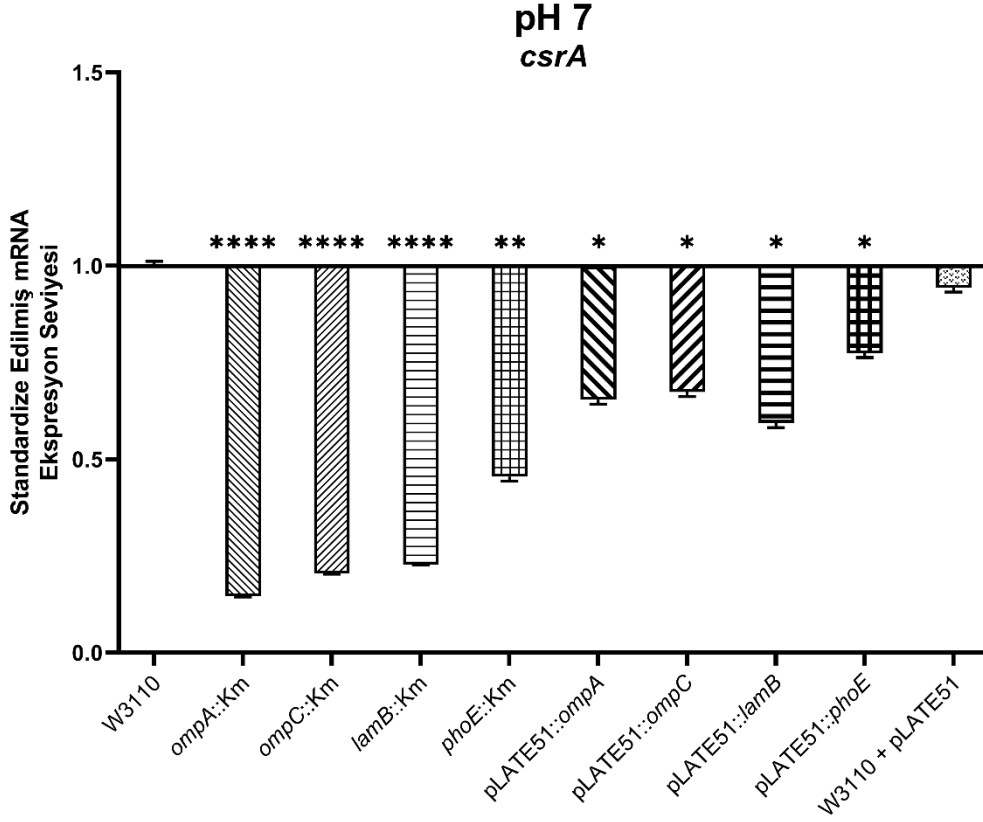
Tüm suşlar içerisinde en yüksek *csrA* gen ifadesi, yabani tip *E. coli* W3110'da gözlenirken, en düşük *csrA* gen ifadesi, *ompC::Km* (0,133) suşunda tespit edilmiştir (Grafik 4.4).



Grafik 4.4. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csrA* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; **** , p<0,0001)

pH değeri 7'e ayarlanmış besiyerinde 24 saat büyütülen suşlardan elde edilen RNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *csrA* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km*, *ompC::Km* ve *lamB::Km* suşlarında kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Yabani tipte 1 olan ifade seviyesi mutantlarda sırasıyla 0,145, 0,204 ve 0,227 seviyelerine azalmıştır. Önemli şekilde azalma biyofilm oluşturmeyen *phoE::Km* suşunda da tespit edilmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Komplementlerde de gen ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. Ancak, komplement hücrelerin *csrA* gen ekspresyonlardaki azalma, gen mutantlarındaki azalmaya kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Yani, komplementlerin sonuçları yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine mutantların ekspresyon seviyesinden daha yakındır.

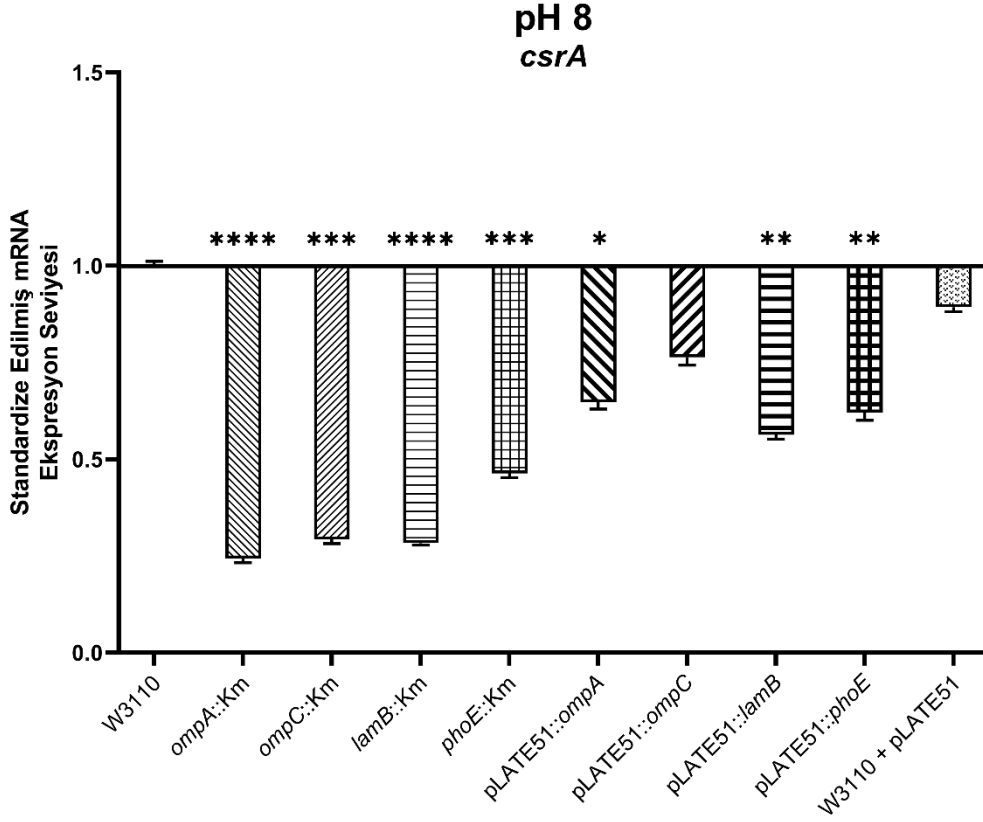
İfade düzeyi araştırılan bütün suşlar içerisinde en yüksek *csrA* gen ifadesi, yabani tip *E. coli* W3110'da gözlenirken, en düşük *csrA* gen ifadesi ise *ompA::Km* (0,145) suşunda görülmüştür (Grafik 4.5).



Grafik 4.5. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csrA* geninin ekspresyon seviyesi

(* , p<0,05; ** , p<0,01; **** , p<0,0001)

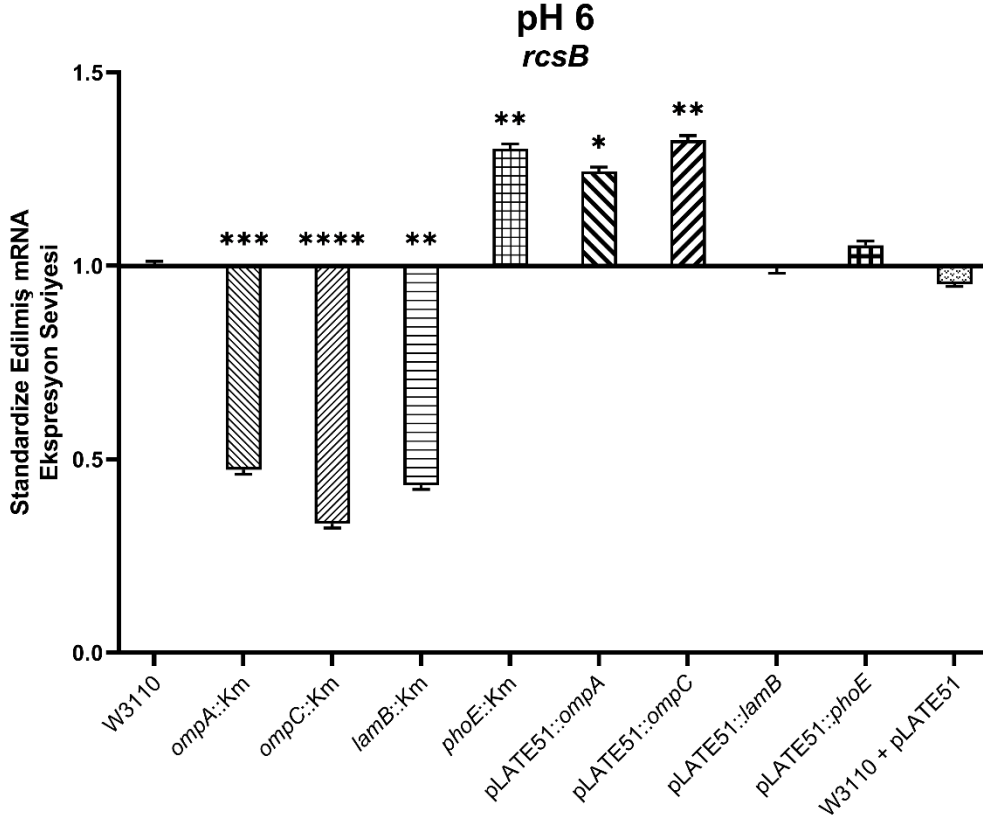
24 saat pH 8 değerinde büyütülen suşlardan izole edilen RNA'ların gerçek zamanlı PZR'deki ekspresyon değerlerine göre, *csrA* gen ifadesi pH 8 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA*::Km ve *ompC*::Km suşlarında, kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Buna göre, *ompA*::Km 0,243, *ompC*::Km ise 0,293 değerini vermiştir. Ekspresyonda önemli şekilde azalma pH 8 değerinde biyofilm oluşturmeyen (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *lamB*::Km ve *phoE*::Km suşlarında da (0,283, 0,463) tespit edilmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Komplementlerde de gen ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. Ancak, komplement hücrelerin *csrA* gen ekspresyonlardaki azalma, gen mutantlarındaki azalmaya kıyasla daha azdır. Yani, komplementlerin sonuçları yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine mutantların ekspresyon seviyesinden daha yakındır. Test edilen suşlar arasında en yüksek *csrA* gen ifadesi yabani tip *E. coli* W3110'da gözlenirken, en düşük gen ifadesi ise *ompA*::Km (0,243) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.6).



Grafik 4.6. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csrA* geninin ekspresyon seviyesi (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$)

Ortam pH'ı 6 olan besiyerinde 24 saat büyütülen suşların RNA'larından elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *rscB* gen ifadesi *ompC::Km* suşunda kontrol olan yabancı tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Yabancı tipte 1 olan ifade seviyesi, *ompC::Km*'de 0,333 seviyesine azalmıştır. Önemli şekilde azalmanın gözlemlendiği diğer suşlar (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe), *lamB::Km* (0,433) ve *ompA::Km* (0,472) olarak belirlenmiştir. *phoE::Km* suşunda, yabancı tip W3110 ekspresyon verilerine göre azalış değil artış gözlenmiştir. *phoE::Km* suşunda ifade seviyesi 1,303'e çıkmıştır. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. W3110 pLATE51::*ompC* ve W3110 pLATE51::*ompA*'nın gen ekspresyonlarının yabancı tip *E. coli* W3110'un gen ekspresyonuna göre bir miktar arttığı görülürken, W3110 pLATE51::*phoE* ve W3110 pLATE51::*lamB*'nin ekspresyon seviyesinin yabancı tip *E. coli* W3110 ile aynı seviye olduğu tespit edilmiştir.

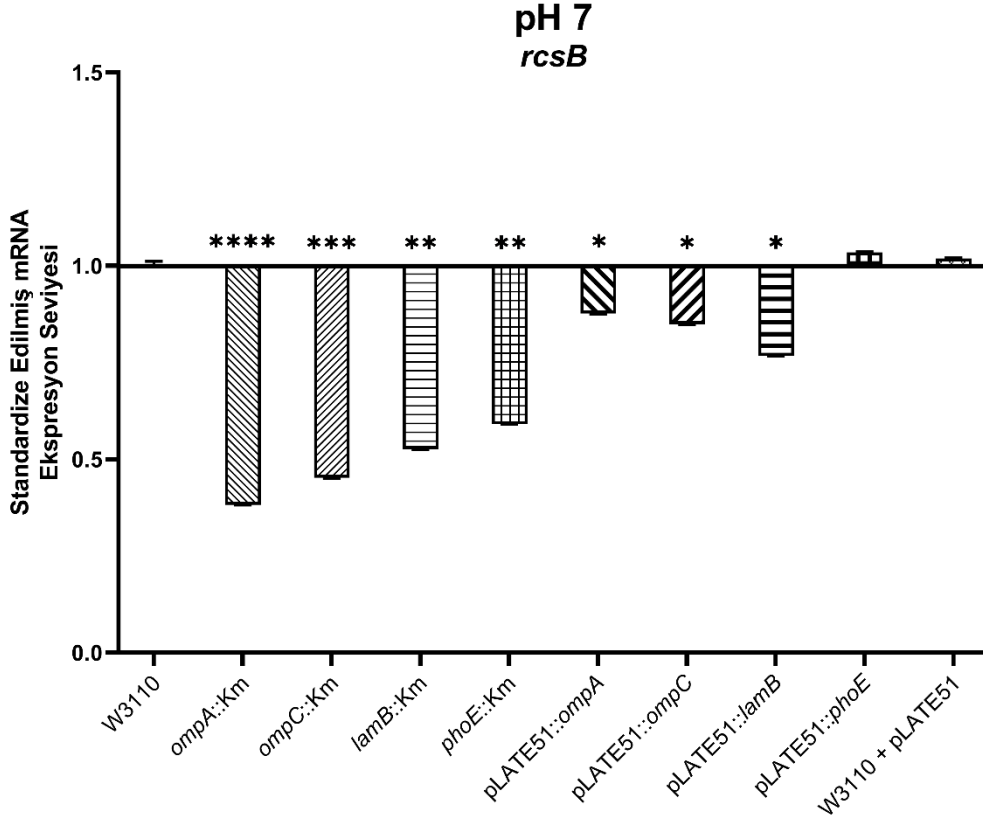
İncelenen suşlar içerisinde en yüksek *rscB* gen ifadesi W3110 pLATE51::*ompC*'de (1,324) gözlenirken, en düşük gen ifadesi ise *ompC::Km*'de (0,333) gözlenmiştir (Grafik 4.7).



Grafik 4.7. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *rscB* geninin ekspresyon seviyesi (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$)

pH 7 değerindeki besiyeri ortamında 24 saat büyütülen suşlardan elde edilen RNA'ların gerçek zamanlı PZR'deki ekspresyon değerlerine göre, *rscB* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* (0,382), *ompC::Km* (0,452) ve *lamB::Km* (0,526) suşlarında kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Önemli şekilde azalma biyofilm oluşturmeyen *phoE::Km* (0,591) suşunda da tespit edilmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Komplementlerde de, suşlarda da (W3110 pLATE51::*phoE* hariç) gen ekspresyonlarının azaldığı, ancak bu azalmanın gen mutantlarına göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Yani, komplement suşların sonuçları nispeten yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine daha yakındır.

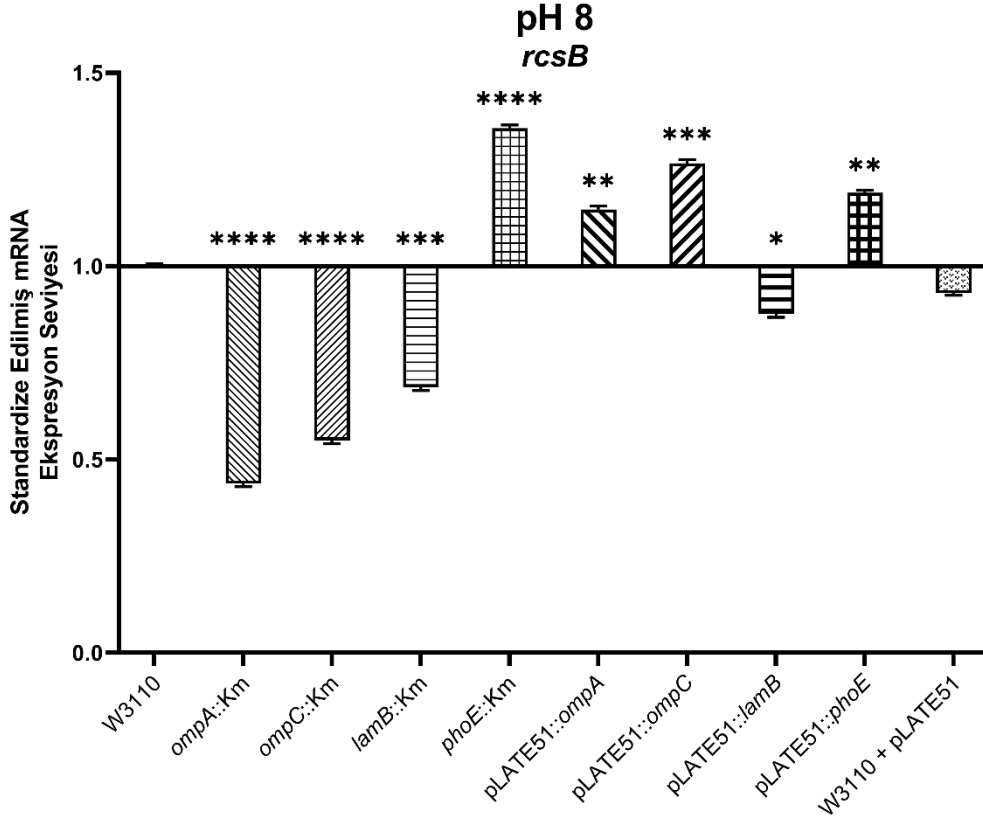
Araştırılan suşlar arasında en yüksek *rscB* gen ifadesi W3110 pLATE51::*phoE*'de (1,035) gözlenirken, en düşük gen ifadesi ise *ompA::Km*'de (0,382) gözlenmiştir (Grafik 4.8).



Grafik 4.8. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *rcsB* geninin ekspresyon seviyesi (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$)

24 saat pH 8 değerinde büyütülen suşlardan izole edilen RNA'ların gerçek zamanlı PZR'deki ekspresyon değerlerine göre, *rcsB* gen ifadesi pH 8 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* ve *ompC::Km* suşlarında, kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Bu verilere göre, *ompA::Km*'de 0,437 seviyesine azalan gen ifadesi ve *ompC::Km*'de 0,549 seviyesine azalmıştır. Gen ifadesindeki bu önemli azalma, pH 8 değerinde biyofilm oluşturmayan *lamB::Km* (0,686) suşunda da tespit edilmiştir. pH 8'de biyofilm oluşturmayan *phoE::Km* (1,356) suşunda ise, *rcsB* gen ifadesinin yabani tipe göre arttığı tespit edilmiştir. Komplement suşların gen ifadeleri de kontrol edilmiştir. Komplement suşlardan sadece W3110 *pLATE51::lamB*'de bir miktar azalma gözlenirken, diğerlerinde bir miktar artış gözlenmiştir. *pLATE51* içeren W3110'da gen ifadesinin yabani tip ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Komplementlerin gen ifadeleri, yabani tip *E. coli* W3110'un ifade seviyesine mutantlara nazaran daha yakındır.

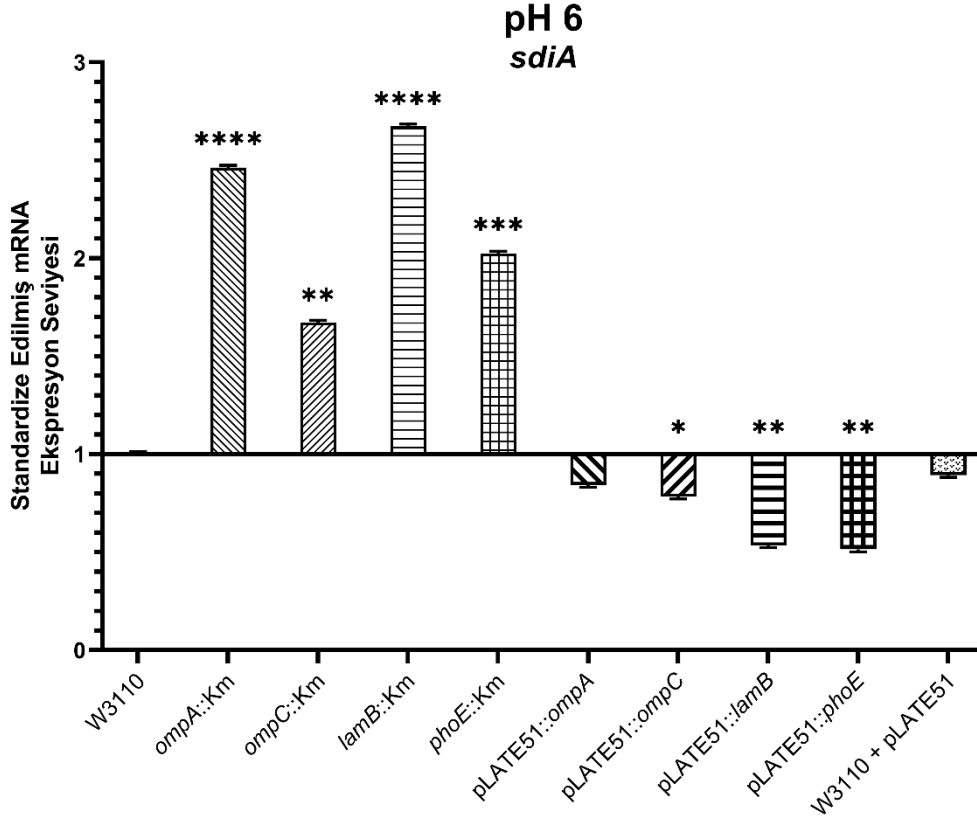
Tüm suşlar içerisinde en yüksek *rcsB* gen ifadesi *phoE::Km*'de (1,356), en düşük gen ifadesi ise *ompA::Km* (0,437) suşunda görülmüştür (Grafik 4.9).



Grafik 4.9. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *rcsB* geninin ekspresyon seviyesi (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$)

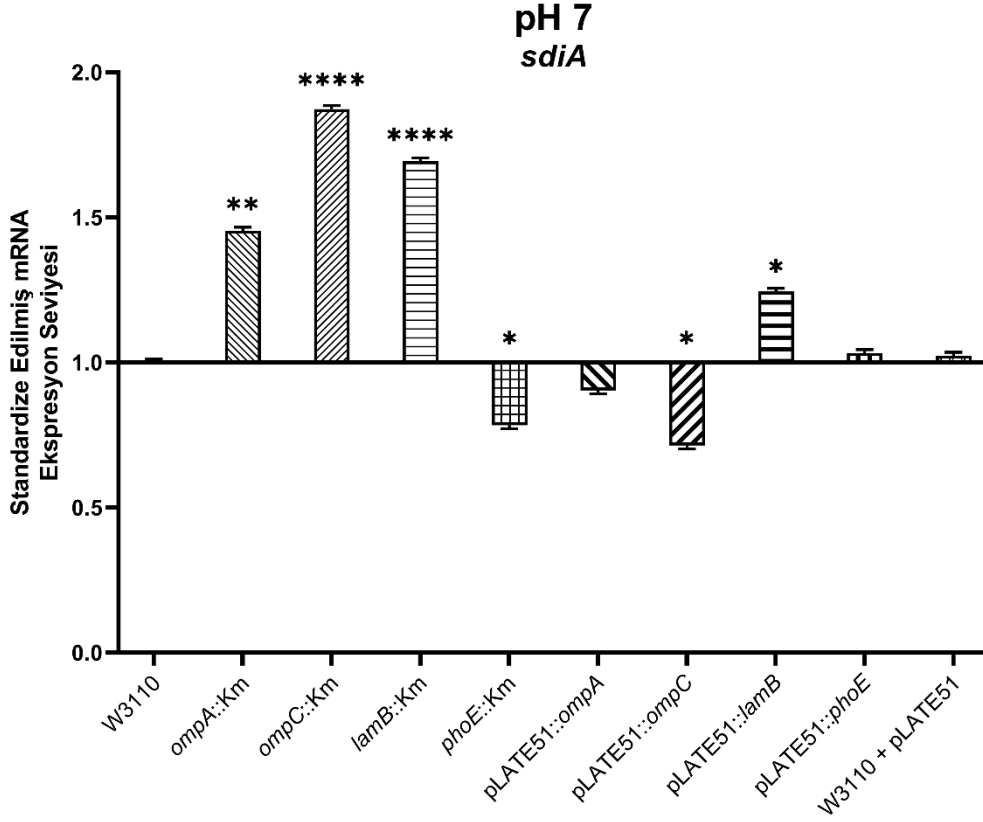
pH 6'da 24 saat boyunca inkübe edilen suşların RNA'larıyla gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR'nin verilerine göre, *sdiA* gen ifadesi *lamB::Km* suşunda kontrol olan yabancı tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artış göstermiştir. Buna göre, *lamB::Km*'de gen ifadesinin seviyesi artarak, 2,673 olmuştur. Önemli şekilde artışın gözlemlendiği diğer suşlar (artış miktarına göre; büyükten küçüğe), *ompA::Km* (2,462), *phoE::Km* (2,024) ve *ompC::Km* (1,672) olarak belirlenmiştir. Suşların gen ifadesindeki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da incelenmiştir. Komplement suşlardan W3110 pLATE51::*phoE* ve W3110 pLATE51::*lamB*'nin gen ifade seviyesinin yabancı tip *E. coli* W3110'a göre azalış gösterdiği, ancak W3110 pLATE51::*ompA*, W3110 pLATE51::*ompC* ve pLATE51 içeren W3110'un yabancı tip ile benzer seviyede *sdiA* gen ifadesi verdiği belirlenmiştir.

Test edilen suşlar arasında en yüksek *sdiA* gen ifadesi *lamB::Km*'de (2,673) gözlenirken, en düşük *sdiA* gen ifadesi pLATE51::*phoE* (0,514) suşunda tespit edilmiştir (Grafik 4.10).



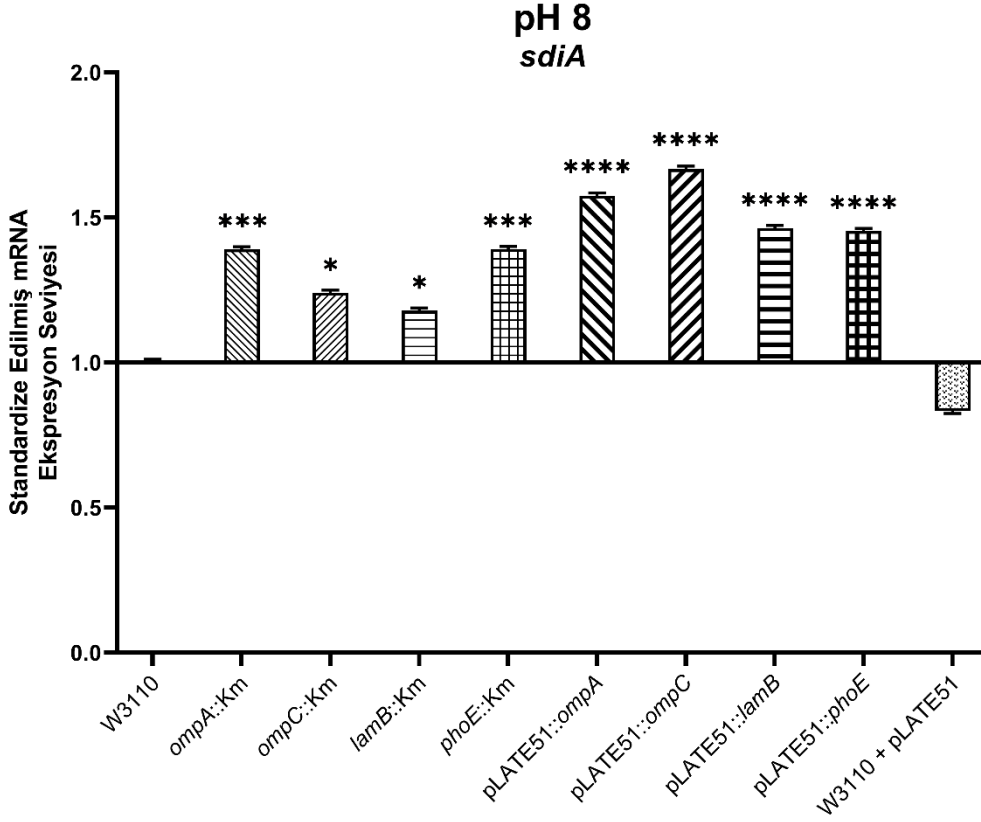
Grafik 4.10. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *sdiA* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001; **** , p<0,0001)

pH 7’de 24 saat boyunca inkübe edilen suşlardan elde edilen RNA’lar kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen ifade verilerine göre, *sdiA* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşturan (artış miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompC::Km*, *lamB::Km* ve *ompA::Km* suşlarında kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artış göstermiştir. Artışlar sırasıyla, 1,873, 1,693 ve 1,454 olarak ölçülmüştür. Biyofilm oluşturmeyen *phoE::Km* (0,783) suşunda ise bir miktar azalış tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan suşların gen ekspresyonundaki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110’da olup olmadığı da araştırılmıştır. Komplementlerde ise pLATE51::*lamB* hariç gen ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. Komplementlerin sonuçları nispeten yabani tip *E. coli* W3110’un ekspresyon seviyesine daha yakındır. Ekspresyon seviyeleri araştırılan suşlar arasında en yüksek *sdiA* gen ifadesi, *ompC::Km*’de (1,873) gözlenirken, en düşük *sdiA* gen ifadesi ise pLATE51::*ompC* (0,713) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *sdiA* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; **, p<0,01; ****, p<0,0001)

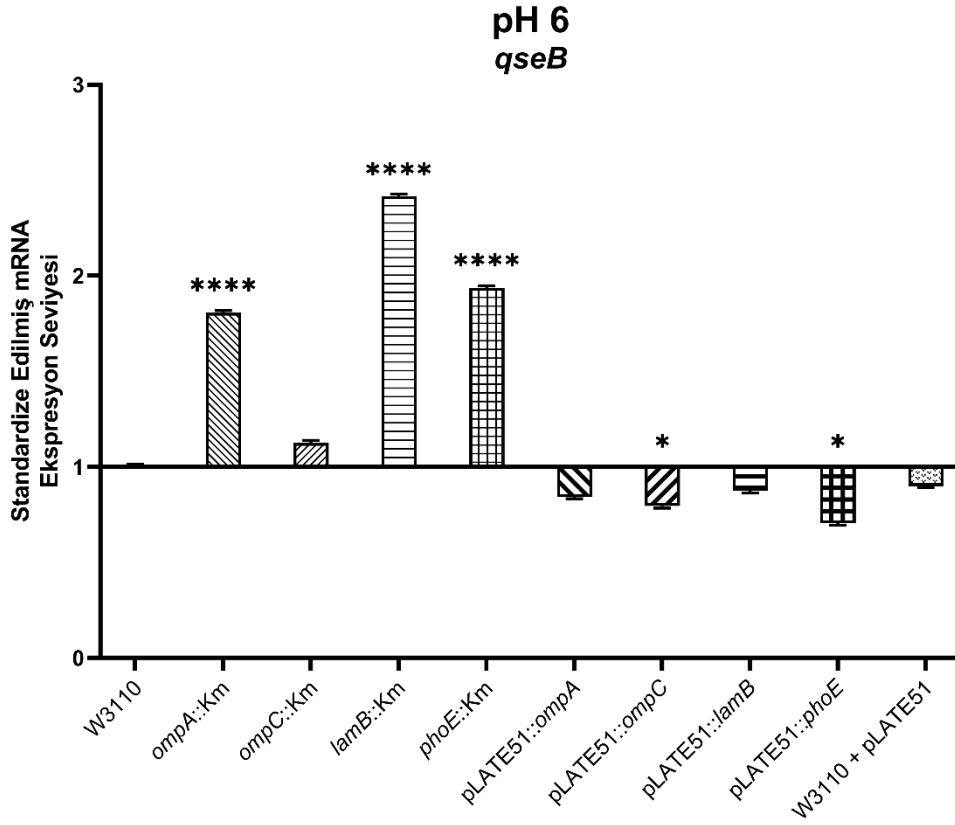
24 saat boyunca pH 8’de büyütülen suşlardan izole edilen RNA’ların gerçek zamanlı PZR’deki ifade değerlerine göre, *sdiA* gen ifadesi pH 8’de biyofilm oluşumu veren (artış miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* ve *ompC::Km* suşlarında, kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. *ompA::Km*’de 1,390 olan gen ifadesi seviyesi, *ompC::Km*’de 1,240 olarak ölçülmüştür. pH 8’de biyofilm oluşturmeyan *lamB::Km* (1,178) suşunda da artış gözlenirken, bu artış diğer suşlardaki kadar olmamıştır. pH 8 değerinde biyofilm oluşturmeyan *phoE::Km* (1,391) suşunda ise, *sdiA* gen ifadesinin yabani tipe göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Komplement suşların gen ekspresyonları da kontrol edilmiştir. Komplement suşların her birinde artış gözlenmiştir. pLATE51 içeren W3110’da gen ekspresyonunun yabani tip ile aynı olduğu belirlenmiştir. Komplementlerin gen ifadeleri, yabani tip *E. coli* W3110’un ekspresyon seviyesinin yaklaşık 1,5 katıdır. Test edilen suşlar arasında en yüksek *sdiA* gen ifadesi pLATE51::ompC’de (1,666), en düşük gen ifadesi ise W3110 + pLATE51 (0,833) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.12).



Grafik 4.12. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *sdiA* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; *** , p<0,001; **** , p<0,0001)

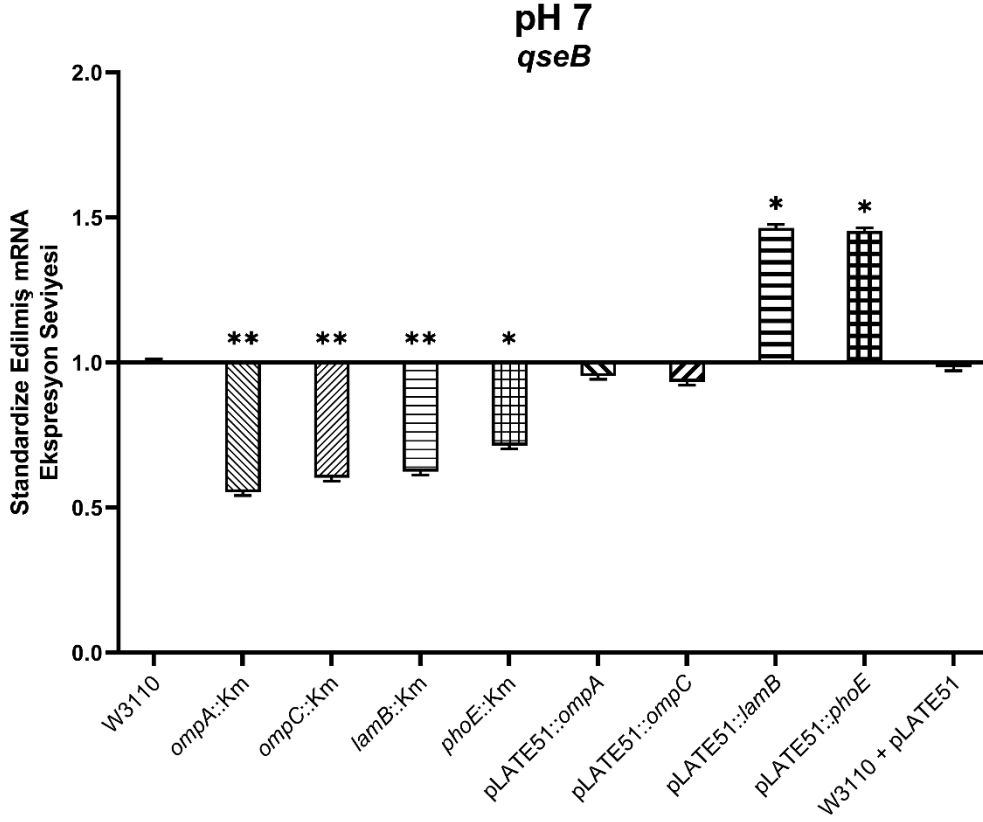
24 saat pH 6’da büyütülen suşların RNA’larından elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *qseB* gen ifadesi *lamB::Km* suşunda kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. Buna göre, W3110’da 1 olan gen ifade seviyesi, *lamB::Km*’de 2,416 olarak ölçülmüştür. Önemli şekilde artışın gözlemlendiği diğer suşlar (artış miktarına göre; büyükten küçüğe), *phoE::Km* (1,936) ve *ompA::Km* (1,805) olarak belirlenmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110’da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Komplementlerdeki gen ekspresyonlarının gen mutantlarına ve kontrol olarak kullanılan yabani tip *E. coli* W3110’un ifade seviyesine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Genel olarak, komplementlerin ifade seviyelerinin yabani tip *E. coli* W3110 ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Tüm suşlar içerisinde en yüksek *qseB* gen ifadesi, *lamB::Km*’de (2,416) gözlenirken, en düşük *qseB* gen ifadesi, pLATE51::*phoE* (0,705) suşunda tespit edilmiştir (Grafik 4.13).



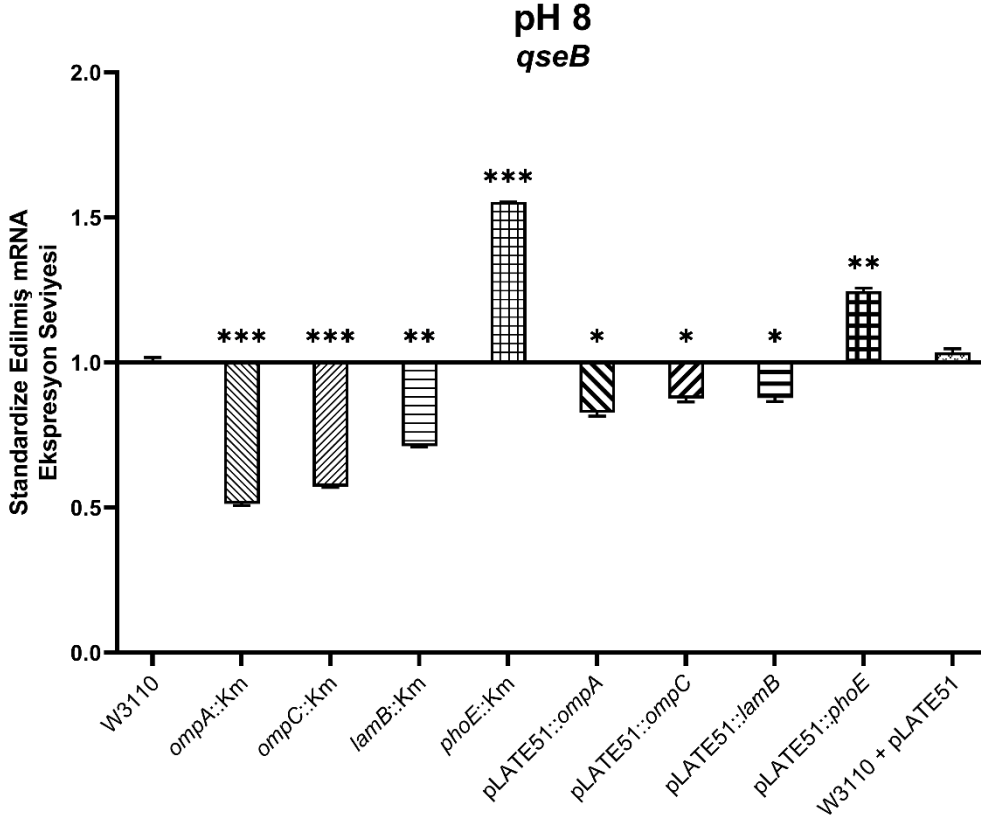
Grafik 4.13. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *qseB* geninin ekspresyon seviyesi
(* , $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$)

pH 7’de 24 saat süresince inkübe edilen suşların RNA’ları kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR verilerine göre, *qseB* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* (0,553), *ompC::Km* (0,603) ve *lamB::Km* (0,623) suşlarında kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Önemli şekilde azalma biyofilm oluşturmayan *phoE::Km* suşunda da belirlenmiştir. Buna göre, yabani tip *E. coli* W3110’da 1 olan ifade seviyesi, *phoE::Km* suşunda 0,713 olarak ölçülmüştür. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110’da olup olmadığı da incelenmiştir. Komplementlerde gen ifadelerinde azalma (pLATE51::*ompA* ve pLATE51::*ompC*) ve artış (pLATE51::*lamB* ve pLATE51::*phoE*) tespit edilmiştir. pLATE51::*ompA* ve pLATE51::*ompC* komplementlerin sonuçları yabani tip *E. coli* W3110’un ifade seviyesiyle benzerdir. Test edilen suşlar arasında en yüksek *qseB* gen ifadesi, pLATE51::*lamB*’de (1,463) gözlenirken, en düşük *qseB* gen ifadesi ise *ompA::Km* (0,553) suşunda görülmüştür (Grafik 4.14).



Grafik 4.14. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *qseB* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; **, p<0,01)

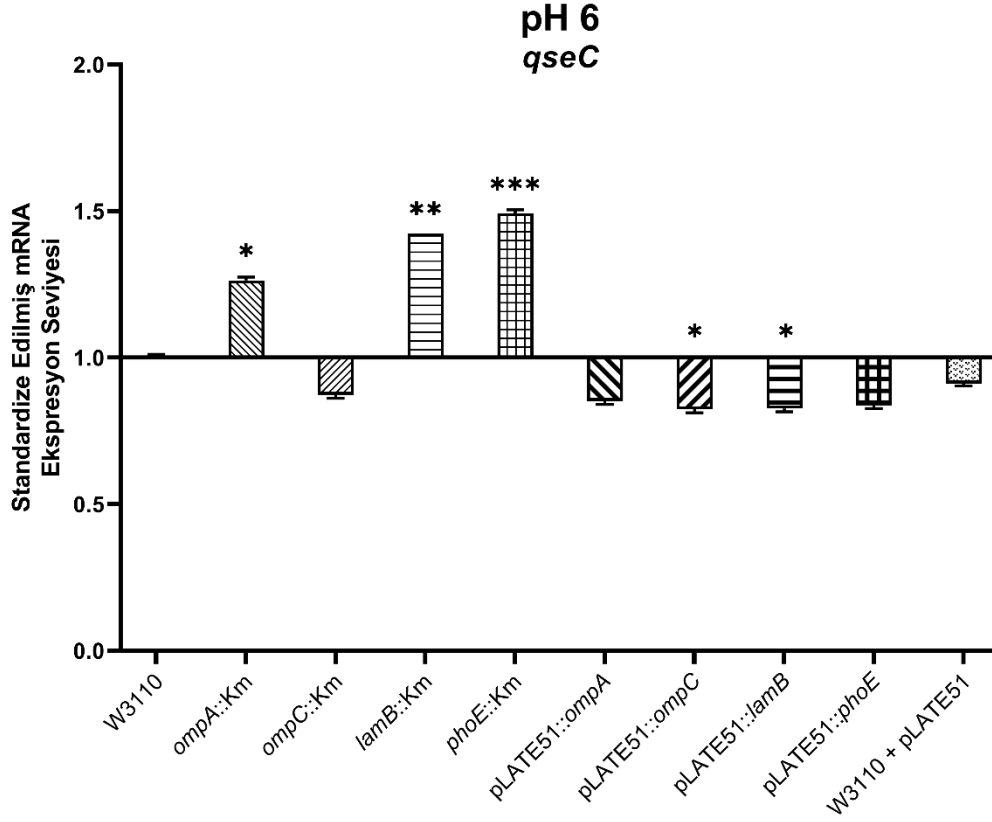
pH 8’de inkübe edilmiş suşlardan alınan RNA’ların gerçek zamanlı PZR’deki ifade değerlerine göre, *qseB* gen ifadesi pH 8’de biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* ve *ompC::Km* suşlarında, kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. İfade seviyesi yabani tipe 1 seviyesindeyken, *ompA::Km*’de 0,513, *ompC::Km*’de ise 0,571 olarak ölçülmüştür. İfade seviyesinde önemli şekilde azalma pH 8’de biyofilm oluşturmayan *lamB::Km* suşunda da tespit edilmiştir. Buna göre, *lamB::Km*’de ifade seviyesi 0,711 olarak ölçülmüştür. pH 8’de biyofilm oluşturmayan *phoE::Km* suşunda ise, *qseB* gen ifadesinin yabani tipe göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Komplement suşların gen ekspresyonları da kontrol edilmiştir. Komplement suşlardan sadece W3110 pLATE51::*phoE*’de bir miktar artış gözlenirken, diğerlerinde bir miktar azalış gözlenmiştir. pLATE51 içeren W3110’da gen ekspresyonunun yabani tip ile aynı olduğu belirlenmiştir. Komplementlerin gen ifadeleri, yabani tip *E. coli* W3110’un ekspresyon seviyesine nispeten yakındır. Ekspresyon seviyeleri araştırılan suşlar arasında en yüksek *qseB* gen ifadesi *phoE::Km*’de (1,553), en düşük gen ifadesi ise *ompA::Km* (0,513) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.15).



Grafik 4.15. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *qseB* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001)

pH 6’da 24 saat inkübasyona tabi tutulan suşların RNA’larından elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *qseC* gen ifadesi *phoE::Km* suşunda kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. *phoE::Km* suşunda artan gen ifadesi seviyesi 1,493 olarak ölçülmüştür. Önemli şekilde artışın gözlemlendiği diğer suşlar (artış miktarına göre; büyükten küçüğe), *lamB::Km* (1,422) ve *ompA::Km* (1,263) olarak tespit edilmiştir. pH 6 değerinde biyofilm oluşturan *ompC::Km* suşunda ise, gen ifadesi yabani tipe göre azalış göstermiş ve 0,873 olarak ölçülmüştür. Suşların gen ifadesindeki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110’da olup olmadığı da araştırılmıştır. Komplementlerdeki gen ekspresyonlarının, gen mutantlarına ve kontrol olarak kullanılan yabani tip *E. coli* W3110’a kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir.

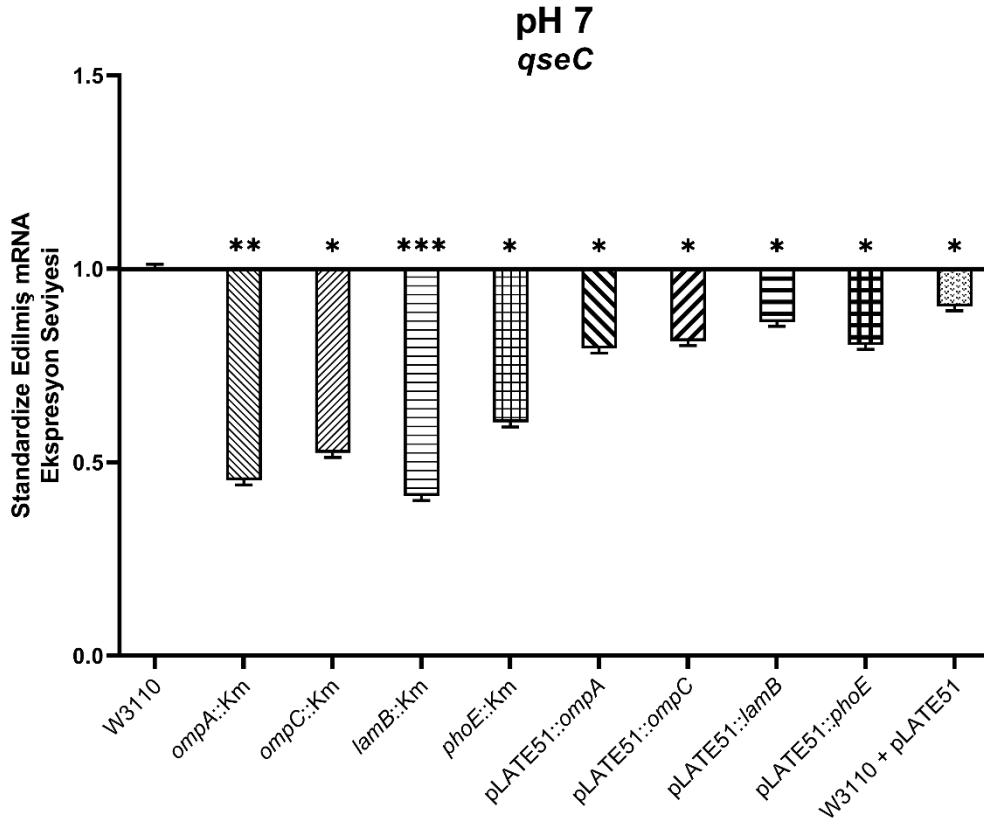
Tüm suşlar içerisinde en yüksek *qseC* gen ifadesi, *phoE::Km*’de (1,493) gözlenirken, en düşük *qseC* gen ifadesi, pLATE51::*ompC* (0,823) suşunda tespit edilmiştir (Grafik 4.16).



Grafik 4.16. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *qseC* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001)

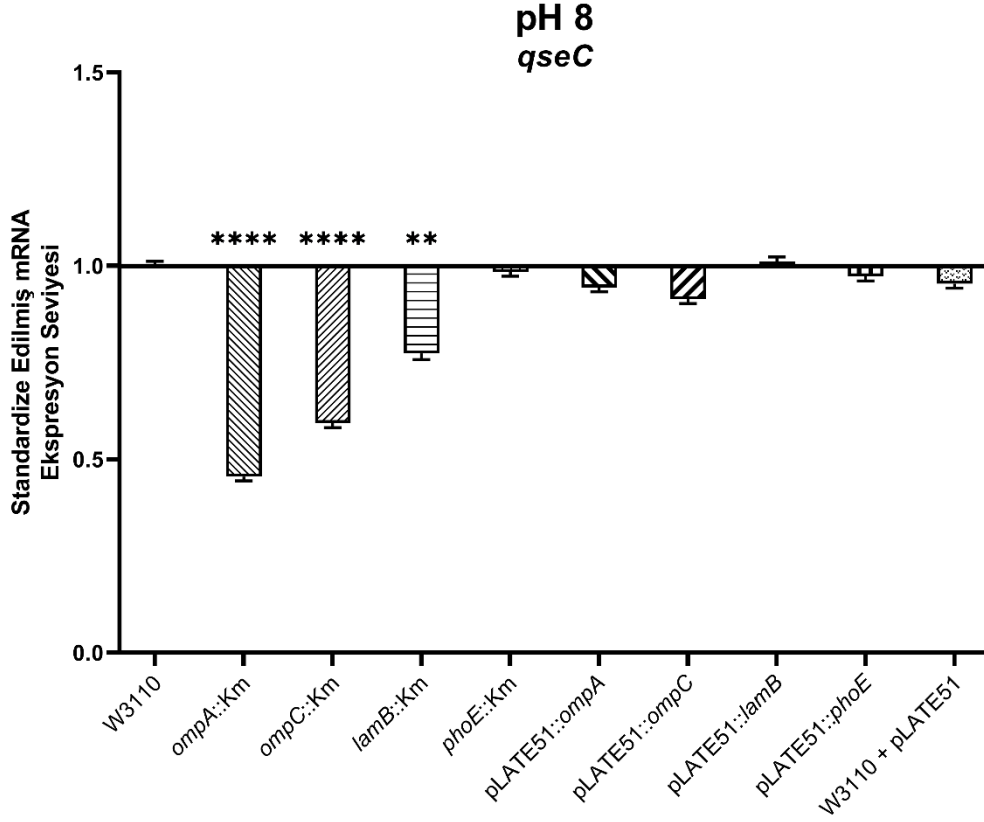
pH değeri 7'e ayarlanmış besiyerinde 24 saat büyütülen suşlardan elde edilen RNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *qseC* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *lamB::Km* (0,413), *ompA::Km* (0,453) ve *ompC::Km* (0,524) suşlarında kontrol olan yabancı tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Önemli şekilde azalma biyofilm oluşturmeyen *phoE::Km* suşunda da tespit edilmiştir. Yabancı tipte 1 olan gen ifade seviyesinin *phoE::Km* suşunda, 0,602 olduğu belirlenmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu azalmanın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Komplementlerde de gen ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir. Ancak, komplement hücrelerin *qseC* gen ekspresyonlardaki azalma, gen mutantlarındaki azalmaya kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Yani, komplementlerin sonuçları nispeten yabancı tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine daha yakındır.

İfade düzeyi araştırılan bütün suşlar arasında en yüksek *qseC* gen ifadesi, yabancı tip *E. coli* W3110'da gözlenirken, en düşük gen ifadesi ise *lamB::Km* (0,413) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.17).



Grafik 4.17. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *qseC* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001)

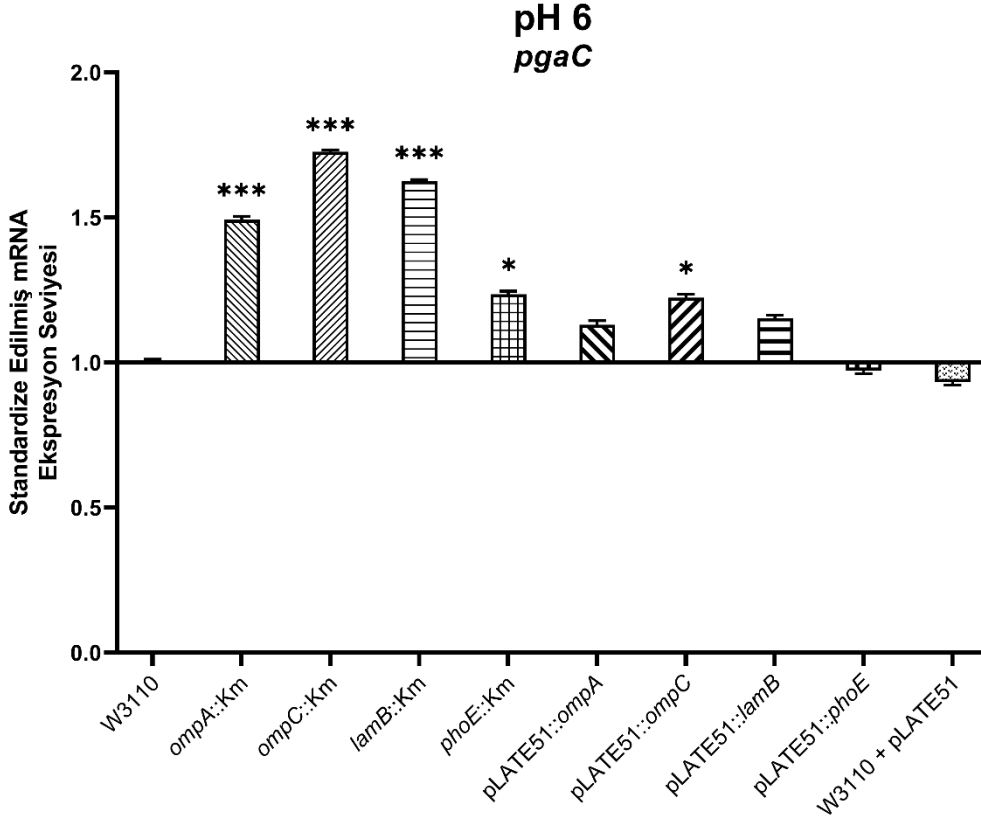
24 saat pH 8 değerinde inkübe edilen suşlardan izole edilen RNA'ların gerçek zamanlı PZR'deki ifade değerlerine göre, *qseC* gen ifadesi pH 8 değerinde biyofilm oluşumu veren (azalma miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* ve *ompC::Km* suşlarında, kontrol olan yabancı tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde azalmıştır. Gen ifadesinde önemli şekilde azalma pH 8 değerinde biyofilm oluşturmayan *lamB::Km* suşunda da tespit edilmiştir. Buna göre, gen ifade seviyelerinin *ompA::Km*'de 0,454, *ompC::Km*'de 0,593 ve *lamB::Km* suşunda ise 0,773 olduğu tespit edilmiştir. pH 8 değerinde biyofilm oluşumu vermeyen *phoE::Km* suşunda ise, *qseC* gen ifadesinin yabancı tipte aynı olduğu belirlenmiştir. Komplement suşların gen ekspresyonları da incelenmiştir. Komplement suşlardan sadece W3110 pLATE51::*ompC* ve pLATE51::*ompA*'da bir miktar azalma gözlenirken, diğerlerinde ekspresyon seviyesi yabancı tip W3110 ile benzer çıkmıştır. pLATE51 içeren W3110'da gen ekspresyonunun yabancı tip ile aynı olduğu belirlenmiştir. Komplementlerin gen ifadeleri, yabancı tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine yakındır. Test edilen bütün suşlar arasında en yüksek *qseC* gen ifadesi *ompA::Km*'de (0,454), en düşük gen ifadesi ise pLATE51::*lamB* (1,011) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.18).



Grafik 4.18. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *qseC* geninin ekspresyon seviyesi (**, p<0,01; ****, p<0,0001)

pH 6'da büyütülen suşlardan 24 saatin sonunda izole edilen RNA'lardan elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *pgaC* gen ifadesi *ompC::Km* (1,725) suşunda kontrol olan yabancı tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. Önemli şekilde artışın gözlemlendiği diğer suşlar (artış miktarına göre; büyükten küçüğe), *lamB::Km* (1,624), *ompA::Km* (1,492) ve *phoE::Km* (1,235) olarak tespit edilmiştir. Suşların gen ifadesindeki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da incelenmiştir. Komplementlerdeki gen ifadelerinin gen mutantlarına göre daha az olduğu belirlenmiş, kontrol olarak kullanılan yabancı tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine göre ise pLATE51::*phoE* hariç her bir komplementin ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Artış gösteren komplementler içerisinde en yüksek artışı pLATE51::*ompC* (1,223) vermiştir.

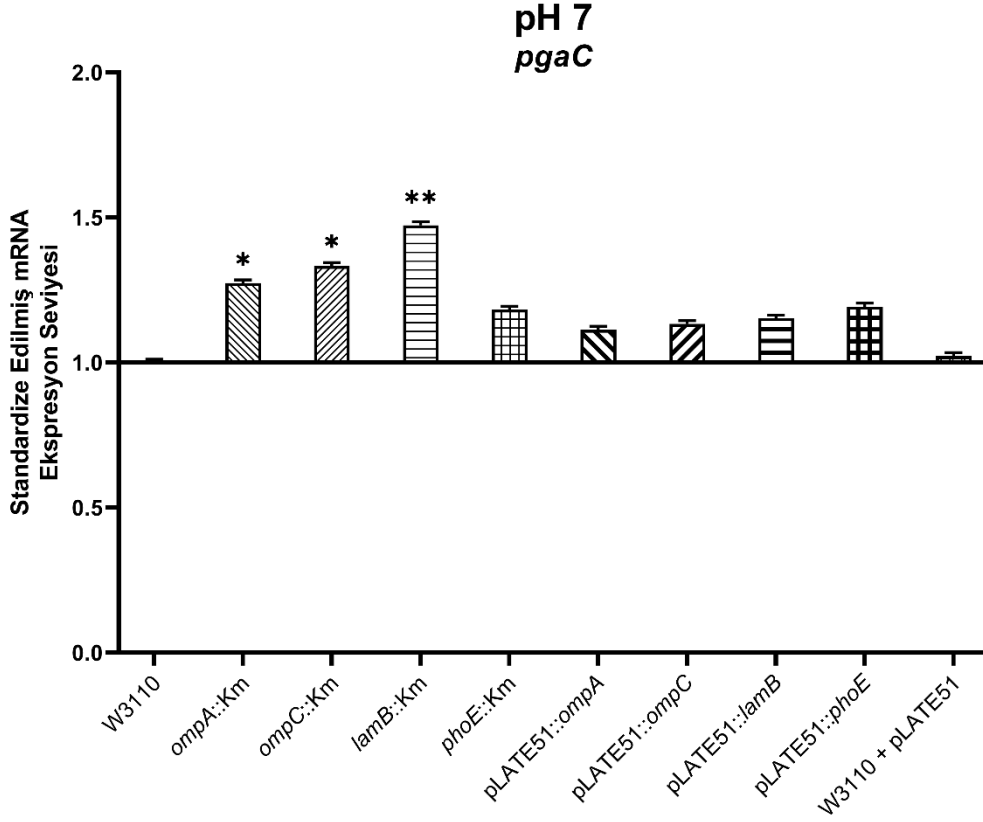
Ekspresyon seviyesi araştırılan tüm suşlar içerisinde en yüksek *pgaC* gen ifadesi, *ompC::Km*'de (1,725) gözlenirken, en düşük *pgaC* gen ifadesi, W3110 + pLATE51 (0,933) suşunda tespit edilmiştir (Grafik 4.19).



Grafik 4.19. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *pgaC* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ***, p<0,001)

pH 7’de besiyerinde 24 saat inkübe suşlardan izole edilen RNA’lar kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *pgaC* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren (artış miktarına göre; büyükten küçüğe) *lamB::Km*, *ompC::Km* ve *ompA::Km* suşlarında kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. *ompC::Km* (1,332) ve *ompA::Km* (1,273) suşlarında gen ifade seviyeleri birbirine yakinken, *lamB::Km*’de (1,473) ifade seviyesi diğer iki suştan daha yüksektir. Biyofilm oluşturmeyen *phoE::Km* suşunda da bir miktar artış tespit edilmiştir. Yabani tipte 1 olan ifade seviyesi, *phoE::Km* suşunda 1,182 seviyesine gelmiştir. Suşların gen ifadesindeki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110’da olup olmadığı da incelenmiştir. Komplementlerde de gen ekspresyonlarında artış belirlenmiştir. Ancak, komplement hücrelerin *pgaC* gen ekspresyonlardaki artışın, gen mutantlarındaki artışa kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Yani, komplementlerin sonuçları nispeten yabani tip *E. coli* W3110’un ekspresyon seviyesine daha yakındır.

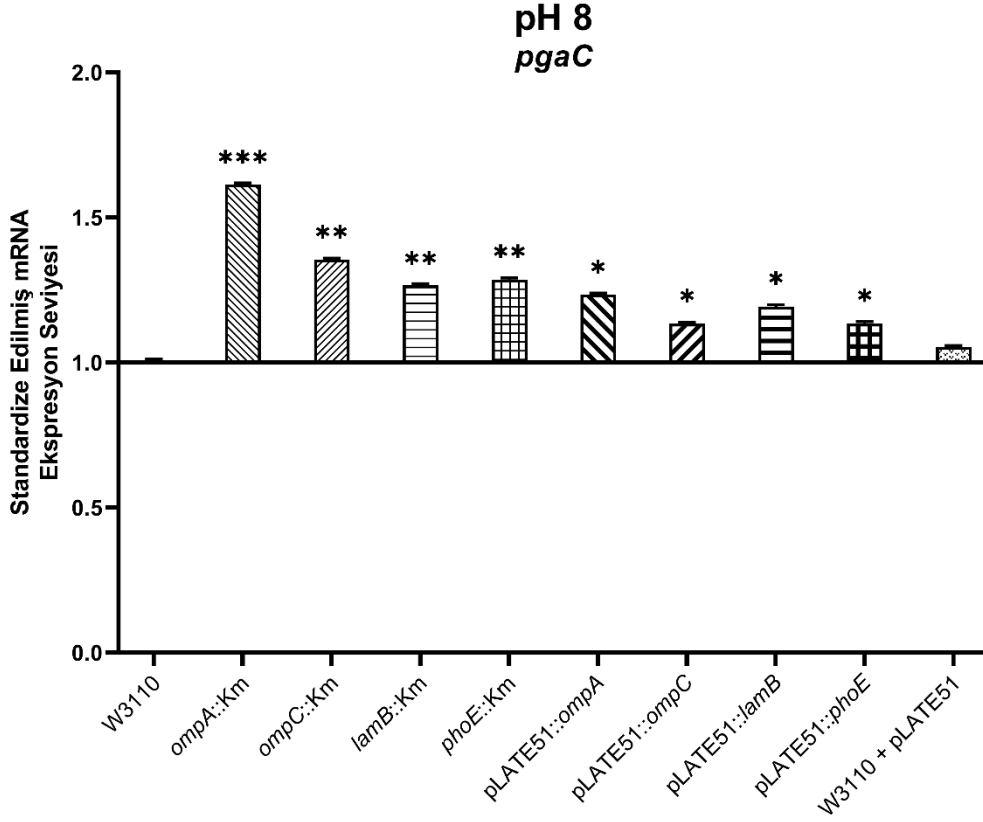
Tüm suşlar içerisinde en yüksek *pgaC* gen ifadesi, *lamB::Km*’de (1,473) gözlenirken, en düşük *pgaC* gen ifadesi ise yabani tip *E. coli* W3110’da görülmüştür (Grafik 4.20).



Grafik 4.20. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *pgaC* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01)

pH 8'e ayarlanmış besiyerinde büyütülen suşlardan elde edilen RNA'ların gerçek zamanlı PZR'deki ekspresyon değerlerine göre, *pgaC* gen ifadesi pH 8 değerinde biyofilm oluşumu veren (artış miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* ve *ompC::Km* suşlarında, kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artış göstermiştir. Buna göre, yabani tipte 1 olan gen ifade seviyesi, *ompA::Km*'de 1,613 olarak ölçülürken, *ompC::Km*'de ise 1,354 olarak ölçülmüştür. Ekspresyonda önemli şekilde artış pH 8 değerinde biyofilm oluşturmeyen *lamB::Km* (1,266) suşunda da belirlenmiştir. pH 8 değerinde biyofilm oluşturmeyen *phoE::Km* suşunda ise, *pgaC* gen ifadesinin yabani tipe göre artış gösterdiği tespit edilmiş ve ifade seviyesi 1,285 olarak ölçülmüştür. Komplement suşların gen ekspresyonlarının kontrolü de yapılmıştır. Komplement suşlarda da bir miktar artış gözlenmiştir. pLATE51 içeren W3110'da gen ekspresyonunun yabani tip ile aynı olduğu belirlenmiştir. Komplementlerin gen ifadeleri, yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesinin bir miktar üzerindedir.

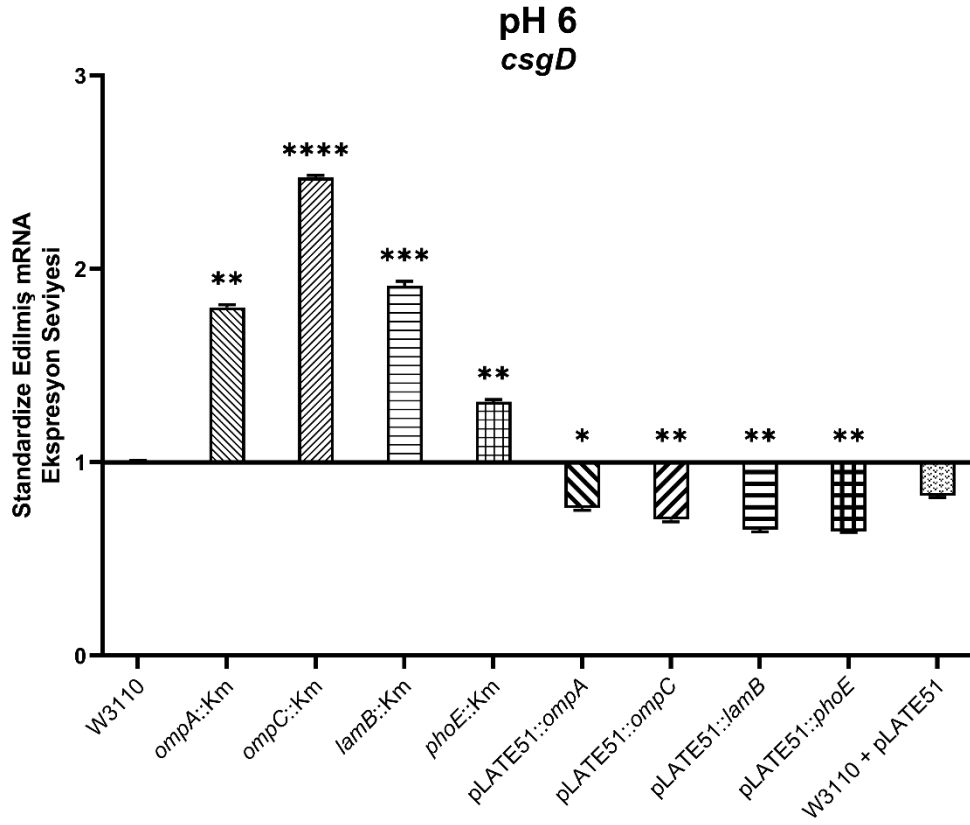
Tüm suşlar içerisinde en yüksek *pgaC* gen ifadesi *ompA::Km*'de (1,613), en düşük gen ifadesi ise yabani tip *E. coli* W3110'da görülmüştür (Grafik 4.21).



Grafik 4.21. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *pgaC* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001)

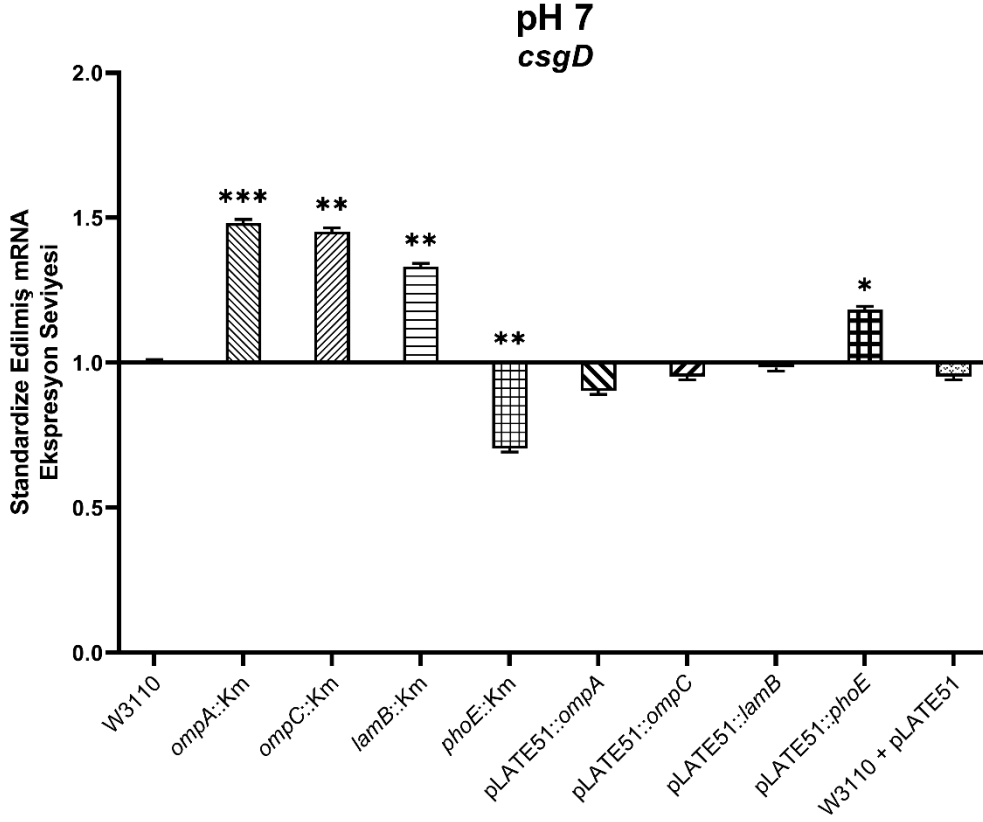
pH 6 değerinde 24 saat inkübe edilen suşların RNA'larından elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *csgD* gen ifadesi *ompC::Km* suşunda kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. *ompC::Km*'de gen ifade seviyesi 2,473 olarak ölçülmüştür. Önemli şekilde artışın gözlemlendiği diğer suşlar (artış miktarına göre; büyükten küçüğe), *lamB::Km* (1,912), *ompA::Km* (1,803) ve *phoE::Km* (1,313) olarak belirlenmiştir. Suşların gen ekspresyonundaki bu artışın komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da olup olmadığı da incelenmiştir. Komplementlerdeki gen ekspresyonlarının gen mutantlarına ve kontrol olarak kullanılan yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine göre daha az olduğu belirlenmiştir.

Ekspresyon seviyesi araştırılan tüm suşlar içerisinde en yüksek *csgD* gen ifadesi, *ompC::Km*'de (2,473) gözlenirken, en düşük *csgD* gen ifadesi, pLATE51::*phoE* (0,643) suşunda tespit edilmiştir (Grafik 4.22).



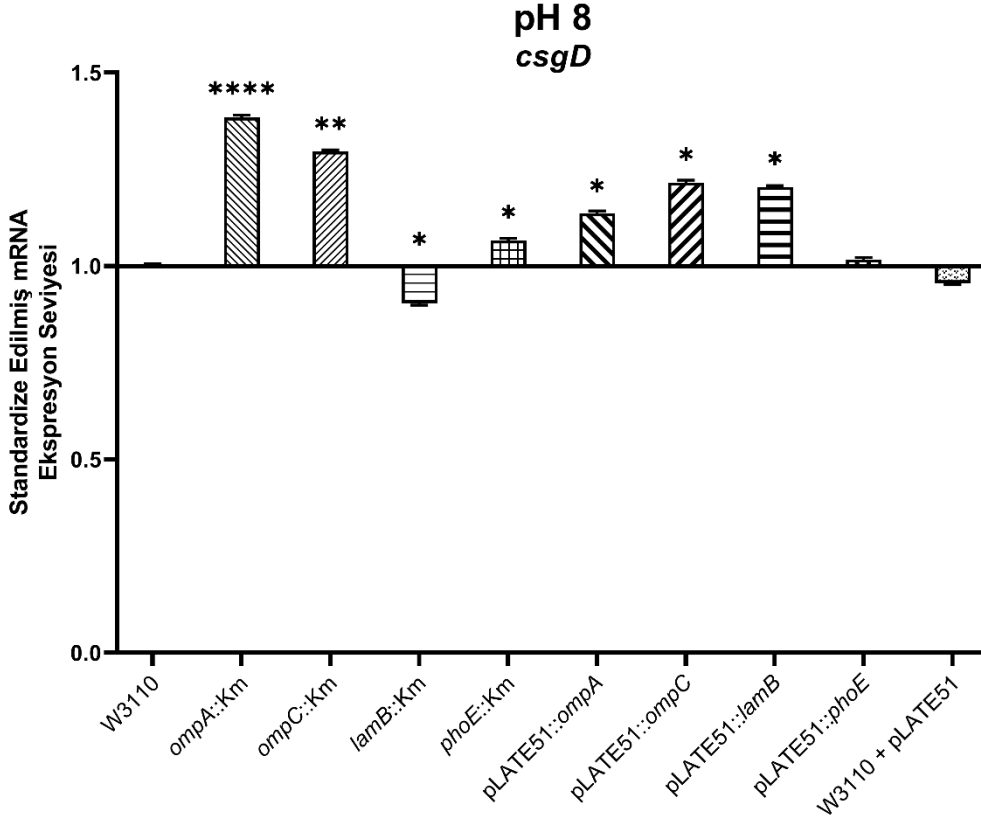
Grafik 4.22. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csgD* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001; **** , p<0,0001)

pH değeri 7 olarak ayarlanmış besiyerinde 24 saat inkübe edilen suşlardan elde edilen RNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen ekspresyon değerlerine göre, *csgD* gen ifadesi pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren (artış miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km*, *ompC::Km* ve *lamB::Km* suşlarında kontrol olan yabancı tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. Gen ifadesinde artış sırasına göre, *ompA::Km* 1,482, *ompC::Km* 1,452 ve *lamB::Km* 1,332 olarak ölçülmüştür. Önemli bir azalış biyofilm oluşturmayan *phoE::Km* suşunda tespit edilmiştir. Suşların gen ekspresyonlarının durumu komplement suşlarda ve pLATE51 içeren W3110'da da kontrol edilmiştir. pLATE51::*phoE* hariç diğer komplementlerde gen ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Ancak, komplement hücrelerin *csgD* gen ekspresyonlardaki azalma, çok fazla değildir. Yani, komplementlerin sonuçları nispeten yabancı tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine daha yakındır. Test edilen tüm suşlar içerisinde en yüksek *csgD* gen ifadesi, *ompA::Km*'de (1,482) gözlenirken, en düşük *csgD* gen ifadesi ise *phoE::Km* (0,703) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.23).



Grafik 4.23. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csgD* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; *** , p<0,001)

pH 8 değerinde 24 saat büyütülen suşlardan elde edilen RNA'ların gerçek zamanlı PZR'deki ekspresyon değerlerine göre, *csgD* gen ifadesi pH 8 değerinde biyofilm oluşumu veren (artış miktarına göre; büyükten küçüğe) *ompA::Km* ve *ompC::Km* suşlarında, kontrol olan yabani tip *E. coli* W3110 gen ifadesine göre önemli ölçüde artmıştır. Yabani tipte 1 olan gen ifadesi, *ompA::Km*'de 1,384, *ompC::Km*'de ise 1,295 olarak ölçülmüştür. pH 8 değerinde biyofilm oluşumu vermeyen *lamB::Km* (0,903) suşunda, ekspresyonda önemli şekilde azalma tespit edilmiştir. pH 8 değerinde biyofilm oluşumu vermeyen *phoE::Km* (1,065) suşunda ise, *csgD* gen ifadesinin yabani tipe göre az bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir. Komplement suşların gen ekspresyonları da kontrol edilmiştir. Komplement suşların birinde bir miktar artış gözlenmiştir. pLATE51 içeren W3110'da ve pLATE51::*phoE*'de gen ekspresyonunun yabani tip ile aynı olduğu belirlenmiştir. Komplementlerin gen ifadeleri, yabani tip *E. coli* W3110'un ekspresyon seviyesine üzerindedir. Tüm suşlar içerisinde en yüksek *csgD* gen ifadesi *ompA::Km*'de (1,384), en düşük gen ifadesi ise *lamB::Km* (0,903) suşunda gözlenmiştir (Grafik 4.24).



Grafik 4.24. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csgD* geninin ekspresyon seviyesi
(* , p<0,05; ** , p<0,01; **** , p<0,0001)

4.2. Tartışma

Bakteriler buldukları ortamda, fagositoza, besin yoksunluğuna, pH değişikliklerine, biyositlere ve antimikrobiyaller gibi çevresel faktörlerin etkisine maruz kalırlar. Bakteriler, bu çevresel faktörlerden etkilenmemek için çeşitli hücrel genlerini aktive ederler ve böylece yaşamlarını sürdürebilmelerini sağlayan korunma stratejilerini devreye sokarlar. Bu koruyucu stratejilerden biri olan biyofilm, bakterileri çevresel faktörlerin etkisinden koruyarak kararlı şekilde yaşamlarını sürdürmelerini sağlar (Satpathy vd., 2016).

Biyofilm oluşumu, bakteriyi çevresel streslerden korurken, bakterilerin sebep olduğu zararlı etkilerin de giderilmesini zorlaştırmaktadır. Biyofilmlerin zararlı etkileri olabileceği gibi, çevreye yarar sağladıkları etkileri de bulunmaktadır. Biyofilmler, bitkilerin korunması, biyoremediasyon, enerji üretimi, atık su arıtma, korozyonun önlenmesi gibi faydalı uygulamalarda kullanılabilir (Sharma vd., 2019). Bu olumlu etkilerin artırılması ve olumsuz etkilerin de azaltılması için, biyofilm oluşumunun moleküler mekanizmasının her yönüyle aydınlatılması önem arz etmektedir.

Biyofilmlerin karmaşık yapısının anlaşılması ve mekanizmalarının aydınlatılması için bugüne kadar birçok farklı çalışma yapılmıştır (Belas, 2014; Berne vd., 2015; Culler vd., 2018; Zahra vd., 2019; Grabski vd., 2021; Meng vd., 2021). Bu kadar çalışmaya rağmen, biyofilm mekanizması veya bu mekanizmayı etkileyen faktörler net bir şekilde anlaşılamamıştır. Bakterilerin yaşamsal süreçlerini etkileyen açlık, pH ve ozmotik stres gibi faktörlerin, bakterilerin biyofilm oluşumlarına da etki ettiği bilinmektedir (Mathlouthi vd., 2018; Fernández-Coll ve Cashel, 2020). *E. coli*'de pasif difüzyon ile besin alımlarında rol oynayan 20'nin üzerinde dış membran porin proteinleri bulunmaktadır, bu porin proteinleri dış etkilere bağlı olarak hücrede farklı oranlarda ifade edilmektedir (Darcan, 2004; Han vd., 2012; Schmitt vd., 2019). Porin proteinlerinin hücrede ifade edilmemesi, *E. coli* dahil birçok bakteride yaşamsal sorunlara sebebiyet vermektedir (Darcan, 2004). Bir çalışmada, *E. coli* W3110 *ompA*, *ompC* ve *lamB* porin gen mutantlarında biyofilm oluşumunun tetiklendiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada *ompT*, *ompG*, *ompF* ve *phoE* mutantları da çalışılmış ancak bu mutantlarda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Er, 2018). Ayrıca yapılan bu çalışmada, farklı pH değerlerinde mutantların oluşturduğu biyofilmlerin kalınlığının değiştiği belirlenmiştir. *lamB* mutantında diğer mutantlardan ayrı olarak, pH 6 ve 8'de biyofilm oluşumu gözlenmezken, pH 7'de biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bu nedenle pH bağımlı *lamB* mutantı aracılığıyla düzenlenen bir biyofilm oluşumu olduğu varsayılmıştır (Er, 2018). Biyofilm oluşum mekanizması üzerindeki porin mutantı bağlantılı etkinin biyofilme ilişkili hangi genler ile sağlandığı ve mekanizmasının nasıl olduğu çalışmamızda irdelenmiştir.

Çalışmamızda, yabani tip *E. coli* W3110 ve *ompA*, *ompC*, *lamB* ve *phoE* porin mutantlarının 3 farklı pH'da (6, 7 ve 8) biyofilm oluşumları değerlendirilmiştir. pH 6'da 24 saat inkübe edilen suşlardan sadece *ompA* ve *ompC*'nin biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir (Grafik 4.1). pH 7 değerinde 24 inkübasyona bırakılan suşlardan, *ompA*, *ompC* ve *lamB*'nin biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir (Grafik 4.2). pH 8'de ise pH 6 değerine benzer olarak, sadece *ompA* ve *ompC*'de biyofilm oluşumu gözlenmiştir (Grafik 4.3). Buradaki sonuçlara göre, çalışılan her pH değerinde *ompA* ve *ompC* porin mutantlarında biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. *lamB* mutantı sadece pH 7'de biyofilm oluştururken, *phoE* hiçbir pH değerinde biyofilm oluşturmamıştır. Aynı zamanda, inkübasyonlardan sonra besiyeri pH'ları ölçülmüştür. Besiyeri pH'larının biyofilm oluşturan suşlarda artış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3).

4.2.1. *E. coli* Suşlarında Biyofilm Oluşumu

E. coli suşları arasında metabolizma ve biyofilm oluşturma yönünden farklılıklar olabilmektedir. Benzer koşulların uygulandığı denemelerde, her *E. coli* suşunun biyofilm oluşumu göstermediği, gösterenlerin ise farklı oranlarda ve farklı moleküler yollarla biyofilm oluşumu verdiği bilinmektedir (Somorin vd., 2018). Yabani tip BW25113 suşunun cam tüplerin yüzeylerine tutunamadığı ve biyofilm oluşturamadığı tespit edilmiştir (Ma ve Wood, 2009). Aynı suşun, *ompA* mutantıyla yapılan çalışmada, cam yüzeylerde biyofilm oluşumu gözlenirken, *ompA* mutantının plastik yüzeylerde biyofilm oluşturmadığı belirlenmiştir (Ma ve Wood, 2009). Enterohemorajik *E. coli* EHEC O157:H7 ve enteropatojenik *E. coli* (EPEC) O127:H6'da selüloz üretimi biyofilm oluşumuna katkı sağlar ve bu sayede de, bu suşlar farklı ortamlarda konak kolonizasyonu yapabilirken kendilerini de çevresel faktörlerden koruyabilirler (Er, 2018; Soria-Bustos vd., 2022). Diğer bir patojen *E. coli* suşu olan enteroagregatif *E. coli* (EAEC)'de kolanik asidin varlığı, kalın biyofilmlerin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (Borgersen vd., 2018). Bunun aksine, kolanik asit üretimi, BW25113'te olduğu gibi bazı hücre yüzeyi adezinlerini maskeleyebilir ve sonuç olarak ilk yapışmayı bozabilir (Ageorges vd., 2020; Ozma vd., 2022). *E. coli* suşlarından BW25113'te biyofilm oluşumunun ilk safhalarında *rcsB* üzerinden kontrol edilen *wza*'nın fazla sentezlenmesi ile oluşan kolanik asitin biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Ozma vd., 2022). *E. coli* K-12 suşları, sahip oldukları biyofilm ilişkili genler sayesinde biyofilm oluşturabilir ancak bu suşlarda selüloz veya curli gibi genler, her çevresel koşulda eksprese edilmemektedir (Domka vd., 2007). Çalışmamızda kullanılan yabani tip *E. coli* W3110 suşu test edilen hiçbir koşulda biyofilm oluşumu sergilememiştir. Benzer şekilde, yabani tip *E. coli* W3110'un kullanıldığı bir çalışmada da bu suşun biyofilm oluşumu vermediği tespit edilmiştir (Paxman vd., 2019). Yabani tip *E. coli* W3110'da biyofilm oluşumunun araştırıldığı bir çalışmada, memeli hücrelerinde sentezlenen üç poliaminden birisi olan putresinin (Nakamura vd., 2019) besiyeri ortamına ilave edilmesiyle W3110'un biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir (Er, 2018). Biyofilm oluşumunun indüklenmesinde bu çalışmada da gösterildiği gibi dışarıdan besiyeri ortamına eklenen çeşitli maddelerin etkisi olabilmektedir. Aynı zamanda, fajlar sayesinde de *E. coli* suşlarının biyofilm oluşturabilme kabiliyeti kazandığı bilinmektedir. Bu bağlamda K-12 MG1655 suşu, λ fajları veya P1 *vir* ile muamele edilmiş ve bunun sonucunda elde edilen suşların biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Visnapuu vd., 2022). Doğal olarak biyofilm oluşumu sergilemeyen bazı *E. coli* K-12 suşları ise, konjugatif pili (F pilus) sentezi için gerekli genetik bilgileri taşıyan plazmitleri barındırdıklarında yüksek

biyokütleli biyofilmler oluşturabilmektedir (Reisner vd., 2003; Shi vd., 2018; Virolle vd., 2020; Buck vd., 2021) Konjugatif F pilusunun, aynı zamanda EAEC suşları tarafından biyofilm oluşumu sırasında merkezi adezyon faktörü olarak çalışabileceği bir başka çalışmada gösterilmiştir (Silva vd., 2020).

Yabani tip suşların mutant hale getirilmesinde kanamisin kaseti içeren plazmidler kullanılmaktadır. Hücre içerisine alınan plazmit hücreye belirli katkılar sağlayabilmektedir. Bu durumundan kaynaklı hatalı yorumların önüne geçebilmek ve plazmit kaynaklı gen ekspresyonu farklılıklarını belirleyebilmek adına hücreye içerisinden ekstradan gen taşımayan plazmit (boş plazmit) aktarılmaktadır. Bu sayede mutantlarda oluşan gen ekspresyonu farklılıkları ortaya çıkarılabilmekte ve değerlendirmeler yapılırken bu farklılıklar göz önünde bulundurulmaktadır. Literatürde yapılan bir çalışmada da biyofilm oluşumu üzerinde plazmide özgü etki oluşabileceği ve bu etki konusunda dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir (Mathlouthi vd., 2018). Mathlouthi ve arkadaşlarının (2018) yapmış olduğu çalışmada elde edilen verilere göre, *E. coli* MG1655 aktarılan plazmitlerin biyofilm üzerine bazı şartlarda hiç etki etmedikleri, bazı şartlarda ise biyofilm üzerinde önemli etkilere sahip oldukları görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, yabani tip W3110 *E. coli* içerisine boş pLATE51 plazmidini aktarılmış ve en az üç tekrarlı olmak üzere biyofilm ilişkili genlerin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Elde edilen ifade seviyelerinin yabani tip W3110 *E. coli*'de elde ettiğimiz ifade seviyeleriyle benzer olduğu belirlenmiştir. Bu sayede, kullandığımız pLATE51 plazmidinin biyofilm ilişkili genlerin ifadesine bir etki etmediği ortaya konulmuştur.

4.2.2. Porin Mutantlarının Biyofilm Oluşturmasında Biyofilm ile İlgili Genlerin Rollerinin Araştırılması

Birçok farklı gen ve gen kümesinin katılımıyla *E. coli*'de biyofilm oluşumu kontrol edilmektedir (Beloin vd., 2008). Biyofilm oluşumu gösteren *E. coli* K-12 suşu kullanılarak yapılan bir gen ekspresyonu karşılaştırma çalışmasında, biyofilm oluşumu sırasında planktonik hücrelerdekinden farklı olarak, genomun (4290 gen) %4'ünü temsil eden 171 genin farklı ifade edildiği belirlenmiştir. Bu genlerin 118 tanesi yukarı yönlü ifade olurken, 53'ü ise aşağı yönlü ifade olmaktadır. Aynı zamanda durağan fazdaki hücrelerle ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığı zaman, aradaki farkın genomun %3'ü kadar olduğu belirlenmiştir (Beloin vd., 2004). Ekspresyon farklılığı gösteren gen kümelerinden en önemlisi olarak, amiloid benzeri proteinli bir madde olan curli fimbriayı kodlayan *csdBAC* ve *csGDEFG* kabul edilmektedir (Liu vd., 2014; Sharma vd., 2016).

Bu çalışmada, *E. coli* W3110'da biyofilm oluşumunda rolü olduğu anlaşılan, dış zar difüzyon porinleri OmpA, OmpC ve maltoz ve maltodekstrinin dış zar boyunca difüzyonunu sağlayan maltoporin proteini LamB'nin mutant olduğu hücrelerde biyofilm oluşumuna katılan genlerin ifade edüzeyleindeki değişimlerin araştırılmıştır. Biyofilm oluşumu veren porin mutantlarına ek olarak, biyofilm oluşumu vermeyen *phoE* mutantının da gen ifadeleri araştırılmış ve biyofilm oluşumu veren porinlerin gen ifadeleriyle kıyaslanmıştır. Test edilen pH değerlerinin (6, 7 ve 8) her birinde *ompA* ve *ompC* mutantlarında biyofilm oluşumu gözlenmiş, bu mutantların, yabancı tip W3110'dan farklı gen ekspresyonları sergiledikleri tespit edilmiştir. Sadece pH 7 değerinde biyofilm oluşumu veren maltoporin *lamB* mutantının biyofilm ile ilişkili gen ekspresyon seviyelerinin W3110 yabancı tipinden farklı profiller sergilediği belirlenmiştir. Test edilen hiçbir pH değerinde biyofilm oluşturmeyen *phoE* mutantının biyofilm ilişkili genleri, yabancı tipte elde edilen sonuçlar ile benzer bulunmuştur. Dolayısı ile *ompA*, *ompC* ve *lamB* porin genleri mutant olduğunda biyofilm genlerinin ifadesinde yabancı tipe göre değişimler olmaktadır.

Çalışmamızda, *pgaABCD* operonunun negatif düzenleyicisi ve flagellar ana regülatörü *flhDC* ifadesinin pozitif düzenleyicisi *csrA* geninin ifade seviyesi (Seyll ve Van Melderden, 2013), *E. coli*'nin biyofilm oluşumunu, hareketliliğini ve virülansını etkileyen *uvrY* ve *csrA* genlerini regüle SdiA proteinini kodlayan *sdiA* geninin ifade seviyesi (Culler vd., 2018; Grabski vd., 2021), *E. coli*'de flagella üretimini baskılayan ve kolanik asit üretimini indükleyen *rcsB* geninin ifade seviyesi (Konovalova vd., 2016; Meng vd., 2020; Meng vd., 2021), flagellar genlerin ana düzenleyicisi FlhDC proteinlerinin ifadesini aktive eden *qseB/qseC* genlerinin ifade seviyeleri (Yang vd., 2014; Luvsandorj, 2017; Wu vd., 2021), curli ifadesi dahil birçok farklı biyofilm ilişkili geni etkileyen biyofilm ana regülatörü *csqD*'nin ifade seviyesi (Ogasawara vd., 2020), *E. coli* *pgaABCD* operonun PGA polimerinin sentezinde, dışa salınımında ve lokalizasyonunda yer alan PgaC glikosiltransferaz'ını kodlayan *pgaC* geninin ifade seviyesi (Sharma vd., 2016) araştırılmıştır.

Bu sayede, biyofilm oluşumunda önemli yeri olan, temel elemanların (flagella, curli, PGA, kolanik asit) ifade seviyeleri araştırılmıştır. Er (2018)'in yapmış olduğu çalışmada, selüloz üretimleri incelenen *ompA*, *ompC*, *lamB* ve *phoE* porin mutantlarında, sadece *ompA* porin mutantında selüloz üretiminin biyofilm oluşumuna katıldığı tespit edilmiştir. Bütün suşlarda selüloz üretimi tespit edilmediğinden dolayı, çalışmamız planlanırken biyofilm oluşumlarında önemli rolleri olduğu bilinen bakteriyel selülozun üretimini etkileyen *bcs* operonuyla ilgili genlerin (Acheson vd., 2021) ifade seviyeleri bu çalışmada araştırılmamıştır.

Çalışmamızda, pH 6, 7 ve 8 değerlerinde çalışılan tüm mutantlarda *csrA*'nın ekspresyon seviyesi azalmıştır. Literatürde, CsrA'nın glikojen metabolizmasının baskılanmasına ve *flhDC* operonunun aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Domka vd., 2007). Aynı zamanda, CsrA ifadesi, biyofilm oluşumunun başlamasıyla birlikte önemli ölçüde azalış göstermektedir (Karatan ve Watnick, 2009). CsrA, biyofilm olgunlaşmasından sonra aktifleşirse, hücrelerin biyofilmden ayrılmasına yol açan flagellar genlerin ekspresyonu meydana gelebilmektedir (Karatan ve Watnick, 2009). CsrA, *pgaABCD* operonunu dolaylı olarak etkileyerek, transkripsiyon sonrası PGA üretimini de düzenlemektedir (Domka vd., 2007). Literatürdeki çalışmalarda da gösterildiği üzere, her bir pH değerinde *ompA* ve *ompC* mutantlarında *csrA* değerinin düşük çıkması biyofilm oluşumları ile doğru orantılıdır. *lamB* mutantında *csrA* miktarı her bir pH'da düşük seviyededir. Bu mutantın sadece pH 7'de biyofilm oluşturması bu mutantta biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde *csrA* geninin düşük seviyede olmasının tek başına yeterli olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda, *phoE* mutantında da *csrA* geninin ekspresyon seviyeleri yabani tipe nazaran düşük çıkmıştır ancak *phoE* mutantı test edilen hiçbir pH değerinde biyofilm oluşumu vermemiştir.

E. coli'deki SdiA, bakteriyel hücre davranışı ve sinyal iletiminde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (Styles vd., 2020; Ishihama ve Shimada, 2021). *E. coli sdiA* geni, hücre yoğunluğu, metabolit yoğunluğu ve hücre ortamındaki diğer faktörlere duyarlı olan AHL molekülleri ile etkileşime girerek hücre davranışını düzenler (Nguyen vd., 2015). SdiA ayrıca *uvrY* genini pozitif olarak düzenleyerek, *csrA* geninin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu sayede, *E. coli*'nin motilitesini, virülansını ve biyofilm oluşumunu düzenler (Beloin vd., 2008). Yani, SdiA miktarının artmasıyla birlikte, *csrA* miktarı da azalış göstermektedir ve bu sayede biyofilmle ilgili genler (*csgA* ve *csgD* gibi) yukarı regüle olurken flagella ile ilişkili genler aşağı yönlü regüle olmaktadır (Domka vd., 2007; Beloin vd., 2008; Karatan ve Watnick, 2009). Çalışmamızda elde ettiğimiz ekspresyon sonuçlarına bakıldığında, *sdiA* miktarının test edilen bütün pH değerlerinde *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarında yapılan denemelerde yabani tipe göre artış gösterdiği, *csrA* miktarının ise azalış gösterdiği belirlenmiştir. Yalnızca *phoE* mutantının pH 7 değerinde, *sdiA* gen ekspresyonu azalma göstermiştir. Aynı zamanda, *E. coli* W3110 *ompC* mutantındaki *sdiA* miktarındaki artışlar, önceki bir çalışmada araştırılan, *pga* ve *sdiA* genlerinin transkripsiyonel aktivatör proteinini kodlayan *nhaR* geninin verilerindeki artışlarla paraleldir. Literatürdeki bu çalışmada, *nhaR* gen ifadesinin *E. coli* W3110 *ompC* mutantında pH 6 ve 7 değerlerinde arttığı gösterilmiştir (Er, 2018). Sonuç olarak, yukarıdaki

çalışmalarda belirtildiği gibi biyofilm oluşturan mutantlarda biyofilm oluşumu sırasında, *sdiA* miktarının artışıyla birlikte *csrA* ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.

İki bileşenli düzenleyici sistem olan Rcs, sitoplazmik reaksiyon düzenleyici RcsB ve zarla ilişkili proteinler RcsC ve RcsD'den oluşmaktadır (Meng vd., 2020). Sensör kinaz RcsC, kurumayı, ozmolaritedeki değişiklikleri ve (katı bir yüzey üzerinde büyürken) zar bozulmasını algılar ve bu sayede *E. coli*'de çeşitli genlerin düzenlenmesini sağlar (Beloin vd., 2008; Kimkes ve Heinemann, 2020). Flagellar gen ekspresyonu, *E. coli*'de iki bileşenli *rsc* tarafından baskılanmaktadır (Meng vd., 2020). Mutant *rscC* ve *rscB* hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda, bu mutant hücrelerin ilk bağlanmasının etkilenmediği bulunmuştur. Bu bulgular, regulon'un biyofilmin erken aşamalarından ziyade biyofilmin olgunlaşma aşamasında yer aldığını düşündürmektedir (Beloin vd., 2008). Biyofilm ilk bağlanma aşamalarını incelediğimiz bu çalışmada, test edilen her bir pH değerinde *ompA* ve *ompC* mutantlarında *rscB* geninin ekspresyon seviyeleri azalış göstermiştir ve bu durum biyofilm oluşumunun ortaya çıkışıyla paraleldir. pH 7 değerinde biyofilm oluşumu gösteren *lamB* mutantımızda *rscB* seviyesinin düşük çıkmış olması literatür çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir (Majdalani ve Gottesman, 2005; Kimkes ve Heinemann, 2020; Meng vd., 2021; Fu vd., 2022). Ancak pH 6 ve 8'de de *rscB* miktarı yabancı tipe göre azalış göstermiş olmasına rağmen, *lamB* mutantında biyofilm oluşumu gözlenmemiştir, bu durum *rscB* geninin düşük olmasının biyofilm oluşumuna etkisinin tek başına yeterli olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda test edilen hiçbir pH değerinde biyofilm oluşturmamış olan *phoE* mutantında pH 6 ve 8'de *rscB* miktarı artış göstermiştir, bu durumda biyofilm oluşturmamasıyla doğru orantılıdır. Ancak, pH 7'de biyofilm oluşturmamasına rağmen *rscB* geninin ekspresyon miktarının yabancı tipe göre düşmesi biyofilm oluşumu için *rscB*'nin düşüşünün tek başına yeterli olmayacağını düşündürmektedir.

Flagellar genlerin transkripsiyonel regülatörü QseBC ikili sistemi, QseB ve QseC'den oluşmaktadır. Bu ikili sistem, *flhDC* operonunu aktivatörü olarak çalışmaktadır. Hücrede *qseBC* miktarının artışıyla birlikte, motilite artış göstermekte, biyofilm miktarı azalış göstermektedir (Sharma vd., 2016). pH 6 değerinde, *ompC* mutanı yabancı tipe yakın *qseBC* seviyeleri verirken, diğer mutantlarda yabancı tipten düşük seviyede *qseBC* gen ekspresyonları gözlenmiştir. pH 7 değerinde ise her mutantta *phoE* geninin ekspresyon seviyeleri azalış göstermiştir. pH 8 değerinde ise *phoE* mutantında *qseBC* seviyeleri artış gösterirken, diğer mutantlarda azalış göstermiştir. pH 6 değerinde biyofilm oluşumu vermeyen *lamB* mutantında *qseBC* seviyesinin artış göstermesi, *lamB* mutantının biyofilm oluşumu verdiği pH 7 değerinde

qseBC ekspresyon seviyesinin yabani tipe göre oldukça düşük seviyede olması *qseBC* gen ekspresyonu değerlendirmelerinde en dikkat çekici durum olmuştur. pH 6'da *E. coli* W3110 *lamB* mutantında *qseBC* ifadesinin aşırı ifadesiyle birlikte, *flhDC*'nin uyarılmasıyla (Li vd., 2020) hücrenin motilitesi fazlaca artış gösteriyor olabilir ve bu yüzden hücrenin biyofilm oluşturma durumu bozuluyor ve hücre planktonik formda kalıyor gibi görünmektedir. *lamB* mutantının biyofilm oluşumu vermediği pH 8 değerinde ise *qseBC* ekspresyonunun yabani tipe göre bir miktar azaldığı gözlenmiştir.

Biyofilm oluşumundaki birçok genin ana düzenleyicisi olan *csgD*'nin miktarı, test edilen her pH değerinde *ompA* ve *ompC* mutantlarında artış gösterirken, *lamB* mutantında, pH 6 ve 7 değerlerinde yabani tipe nazaran artış göstermiş, pH 8 değerinde ise biraz azalış göstermiştir. *lamB* mutantı pH 6'da biyofilm oluşumu vermezken, *csgD* ifadesi yabani tipe göre yüksek çıkmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *E. coli* BW25113 içerisine aktarılan bir plazmid ile *csgD*'nin aşırı eksprese edilmesinin, curli ifadesini bozabileceği ortaya koyulmuştur (Sano vd., 2023). Bu durumun yeni tanımlanan CsgI (curli sentez inhibitörü) ile gerçekleştiği belirlenmiştir. CsgI, OmpR fosforilasyon modülatörü ve CsgA polimerizasyon inhibitörü olarak ikili bir role sahiptir (Sano vd., 2023). Biyofilm oluşumu veren mutantlarda, *csgD* geninin ifade seviyesinin yabani tipten yüksek olması, *csgD*'nin biyofilm oluşumunda artış gösterdiği literatürdeki çalışmaları desteklemektedir (Ogasawara vd., 2020; Khambhati vd., 2021). *phoE* mutantında ise, pH 6 ve 7'de yabani tip ile benzer seviyede olan *csgD* ekspresyonu, pH 8'de yabani tipe nazaran az bir miktar artış göstermiştir.

PGA, hücreleri yüzeylere bağlayarak hücre-hücre adezyonunda rol oynamanın yanı sıra *E. coli* biyofilmini stabilize eden bir adezin olarak da işlev görmektedir. *E. coli*'deki *pgaABCD* operonu, PGA polimerinin sentezi, taşınması ve lokalizasyonu ile ilgili proteinleri kodlamaktadır (Beloin vd., 2008; Sharma vd., 2016). *csrA* artışıyla birlikte, *pgaC* miktarı baskılanmaktadır (Beloin vd., 2008). Çalışmamızda *pgaC* miktarının *csrA*'nın azalmasıyla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. pH 6 ve 7 değerlerinde her bir mutantta *pgaC* miktarı artış gösterirken, *phoE* mutantında *pgaC* miktarı yabani tipe yakın seviyede kalmıştır. pH 8 değerinde, *lamB* ve *phoE*'de yabani tipe göre *pgaC* seviyesi bir miktar artarken, *ompA* ve *ompC*'de artış daha yüksek olmuştur. Elde edilen *pgaC* gen ekspresyon verilerine göre, *lamB* biyofilm oluşumunun gözlendiği pH 7 değerinde de, biyofilm oluşumunun gözlenmediği pH 6 ve 8 değerlerinde de *pgaC* miktarları artış göstermektedir. *pgaC* miktarındaki artışlar, önceki bir çalışmada çalışılan ve *pga* genlerinin indükleyicisi olan *nhaR* gen ifadesinin *E. coli* W3110 *ompC* mutantında pH 6 ve 7'de artış göstermesiyle tutarlıdır. Muhtemelen, *nhaR* gen ifadesinin

artışıyla çalışmamızda araştırdığımız *pgaC* gen ifadesinin *E. coli* W3110 *ompC* mutantlarında artışı gerçekleştirilmiştir. Diğer mutantlarda gözlemlenen *pgaC* artışının da *nhaR* ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

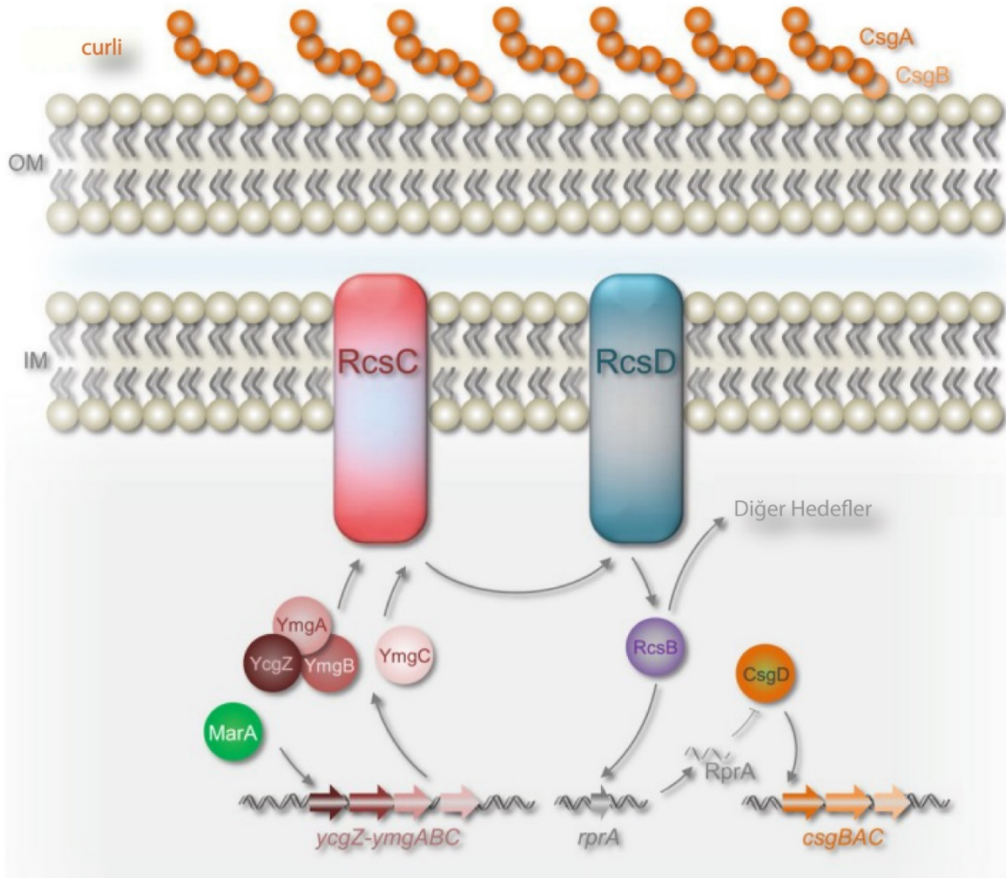
Yedi genin gerçek zamanlı PZR sonuçlarını her bir pH değerinde değerlendirerek biyofilm oluşumunun nasıl bir şekilde düzenlendiğini inceledik.

Bu verilere göre, pH 6 değerinde biyofilm oluşumu veren *ompA* ve *ompC* mutantlarında gen ekspresyonları benzer profil vermiştir. Buna göre biyofilm oluşumunun artmasına neden olan birçok faktör (*csrA* miktarının azlığı, *rscB* miktarının azlığı, *sdiA* miktarının fazla olması, *pgaC* miktarının fazla olması ve *csgD* miktarının fazla olması) her iki mutantta da biyofilm oluşumuyla paralel bir şekilde düzenlenmiştir. Biyofilm oluşumunda artışlara sebebiyet veren birçok faktörün (*csrA* miktarının azlığı, *rscB* miktarının azlığı, *sdiA* miktarının fazla olması, *pgaC* miktarının fazla olması ve *csgD* miktarının fazla olması) pH 6 değerinde de *lamB* mutantında gözlenmesine rağmen biyofilm oluşumunun bu pH değerinde görülmemesi, *lamB* mutantında pH 6 değerindeki yüksek *qseBC* seviyesine atfedilmektedir. *qseBC* aktivitesinin yüksek seviyede olmasıyla birlikte, pH 6'da *lamB* mutantında motilite artış göstererek biyofilm oluşumunu engellemiş olabilir. pH 7'de ise biyofilm oluşumu veren *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarının her birinde gen ekspresyonları aynı yönde düzenlenmiştir (şekil 4.7). *phoE* mutantında ise *sdiA* ve *csgD* genlerinin ekspresyon seviyeleri diğer mutantlara göre ters yönlü olarak düzenlenmiştir. Buna göre *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarında *csrA*, *rscB* ve *qseBC* miktarları azalırken, *csgD*, *sdiA* ve *pgaC* miktarları artış göstermektedir. *phoE* mutantında ise diğer mutantlardan farklı olarak, *sdiA* ve ana biyofilm regülatörü *csgD* miktarının azaldığı belirlenmiştir. pH 8'de biyofilm oluşumu veren *ompA* ve *ompC* mutantlarında, gen ekspresyonlarının pH 7'dekine benzer şekilde olduğu tespit edilmiştir. Buna göre *ompA*, *ompC* mutantlarında *csrA*, *rscB* ve *qseBC* miktarları azalırken, *csgD*, *sdiA* ve *pgaC* miktarları artış göstermiştir. Biyofilm artışlarına sebebiyet verebilecek faktörlerin (*csrA* miktarının azlığı, *rscB* miktarının azlığı, *sdiA* ve *pgaC* miktarının biraz artışı ve *qseBC*'nin azalışı) pH 8'de *lamB* mutantında görülmüştür, ancak ana regülatör *csgD*'nin azalması biyofilm oluşumunun gerçekleşmesini engellemektedir. *phoE* mutantında ise, *rscB* ve *qseB* genlerinin miktarı artarken, *csgD* geninin miktarı yabani tipin gen ekspresyon seviyelerine yakın çıkmıştır. *phoE* mutantında, biyofilm oluşumuna ters yönde gerçekleşen bu regülasyonlar biyofilm oluşumunun gözlenmemesine neden olmaktadır.

Bir beta-laktam antibiyotiği olan sefotaksime maruz kalan *Salmonella* suşlarında EnvZ'nin CA alanında meydana gelen mutasyonlarda, ATPaz aktivitesinin etkilendiği ve bu sayede sefotaksime direnç sağladığı belirlenmiştir (Trampari vd., 2022). Bu direnç oluşumuyla birlikte, biyofilm oluşumundan feragat eden *Salmonella* R397H suşunda, *ompC* ve *ompF* porin proteinlerinin ekspresyonu etkilenmiştir. Yabani tipte *ompF* ekspresyonu, *ompC* ile dengeli bir şekilde iken *envZ* mutanlığı R397H'da *ompF* ekspresyonu büyük bir oranda düşmüş ve *ompC* ekspresyonu ise bir miktar artış göstermiştir. Kongo kırmızısı testinde biyofilm biyokütlesinin azaldığı belirlenen mutanlıkta aynı zamanda *csgA* ve *csgB* gen ekspresyonlarının da çok düştüğü belirlenmiştir (Trampari vd., 2022). *ompC* miktarının artmasının hücrenin biyofilm oluşturmasını baskıladığı ortaya koyulan bu çalışmada elde edilen verilere ek olarak, başka bir çalışmada, *ompF* mutant *E. coli* W3110'da biyofilm oluşumunun gözlenmediği belirtilmiştir (Er, 2018). W3110 yabani tipinde de normal şartlarda biyofilm oluşumu gözlenmemişken, putresin varlığında biyofilm oluşturabildiği ortaya koyulmuştur (Er, 2018). Bu iki çalışmada da verilen bilgiler, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla desteklemektedir. *E. coli* W3110 *ompC* gen mutanlığında gerçekleştirdiğimiz farklı pH (6,7 ve 8) denemelerinde de görüldüğü üzere *ompC*'in sentezlenmemesiyle biyofilm oluşumu gerçekleşmektedir. Bu bulgular, Trampari ve arkadaşlarının (2022) *Salmonella*'da elde ettiği *ompC* miktarının artmasıyla biyofilm oluşumunun azalması şeklindeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Enterik bakterilerde bulunan *ompC* ve *ompF*'nin, ozmolarite ve pH değişimi gibi çevresel uyarılara yanıt olarak EnvZ-OmpR tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Kenney ve Anand, 2020). *ompC*'nin mutanlık olmasının EnvZ-OmpR üzerinden *Salmonella*'da düzenlenen biyofilm oluşumuna benzer bir şekilde, *E. coli*'yi biyofilm oluşumuna teşvik ettiği düşünülmektedir. Bu sistem uyarıldıktan sonra, OmpR üzerinden biyofilm oluşumunun ana düzenleyicisi CsgD'nin uyarıldığı ve bu sayede biyofilm oluşumunun gerçekleştiği önerilmektedir.

E. coli'de bulunan *marRAB* operonunda yer alan MarA adlı kodlanmış bir transkripsiyon faktörü, dışa atım pompasını ve porin ifadesini modüle ederek antibiyotik direncinin sağlanmasında görev almaktadır (Kettles vd., 2019). Yakın bir zamanda, MarA'nın *E. coli*'de *ycgZ-ymgABC* promotörünün pozitif düzenleyicisi olduğu ve *ycgZ-ymgABC*'nin MarA tarafından aktivasyonunun, biyofilm üretimini *rcaB* vasıtasıyla azalttığı gösterilmiştir (Kettles vd., 2019). RcsCDB sisteminin aktivasyonu, CsgD ifadesini inhibe eden RprA sRNA'nın üretimini tetiklediğinden curli liflerin üretimi de azalmaktadır (Şekil 4.8) (Kettles vd., 2019). Planktonik büyüme sırasında *mar* yanıtının indüklenmesinin biyofilm oluşumunu engellediği ve ilaç akışı, değişen dış zar geçirgenliği ve DNA onarımı dahil olmak üzere kısa

vadeli hayatta kalma stratejilerini desteklediği düşünülmektedir (Kettles vd., 2019). Aynı zamanda, MarA doğrudan veya dolaylı olarak MicF ifadesini arttırmakta, bu durum da *ompF* mRNA'da transkripsiyon sonrası bir azalmaya ve azalmış OmpF miktarlarına neden olmaktadır (Kettles vd., 2019). Aynı şekilde, *ompF* mutant *E. coli* W3110 suşunun kullanıldığı ve biyofilm oluşumunun araştırıldığı bir çalışmada da, biyofilm oluşumunun *ompF* mutantında gözlenmediği rapor edilmiştir (Er, 2018). *ompF* miktarının biyofilm oluşumunda yüksek seviyede olmasının biyofilm ile ilgili mekanizmaları doğrudan veya dolaylı yoldan etkilediği düşünülmektedir. Aynı şekilde elde ettiğimiz verilere bakılarak, *E. coli* W3110'da *ompA* ve *ompC* genlerinin mutant olmasının biyofilm oluşumunu MarA'nın bilinmeyen bir düzenleyici sistem ile inaktive edilmesiyle, *rscB* vasıtasıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bu sayede, ilk bağlanmada *rscB* üzerinden kolanik asitin inhibe edici etkisi ortadan kalkarken, bir yandan da *csgD* baskılanmadığı için biyofilm ile ilişkili genlerin de artışı gerçekleşmektedir.



Şekil 4.8. MarA üzerinden biyofilm oluşumunun kontrolü

Kaynak: (Kettles vd., 2019: 1619)

Yaptığımız çalışmada, gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre biyofilm ile ilgili genlerin ekspresyonlarındaki değişim mutantların biyofilm oluşturma özelliklerinin mutasyona bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Biyofilm oluşumu için biyofilm genlerinin ifadesi gerekmektedir. Çalıştığımız mutantlarda da bu genler aktifleşmiş, hücreler biyofilm üretmiştir. Ancak porinlerin mutant olmasının hangi gen veya genleri indükleyerek biyofilm ilişkili genleri regüle etmektedir. Bu çalışma sonucunda bu düzenleyiciyi tespit etmiş değiliz. Sonuç olarak, bu çalışmada, porin mutantlarının biyofilm oluşturmalarının nedeni, biyofilm ile ilişkili genlerin artış veya azalışlarıyla doğrulanmıştır. Ancak, *ompA* ve *ompC* genlerinin mutant olmasının neyi nasıl tetiklediğini ve hangi mekanizmayla bu genlerin ifadesinin artışına sebep olduğunu bu çalışmada tespit edemedik.

4.3. Öneriler

Hayatımızın her yerinde yer alan, olumlu ve olumsuz etkileriyle bizi etkileyen biyofilmlerin önemi açıktır. Biyofilmlerin, özellikle sağlık, gıda ve çevresel alanlarda olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılması, olumlu etkilerinde kontrollü bir şekilde artırılması önem arz etmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda, porin proteinleri bakımından mutant olan *E. coli* W3110 suşlarında çeşitli mekanizmalar ile biyofilm oluşumunun desteklendiğini göstermekteyiz. Bu mekanizmalar, çalışmış olduğumuz kısıtlı genler ile belirlenen ve tahmin edilen mekanizmalardır. Daha fazla araştırmanın yapılması ve biyofilm oluşumuna dahil olan bütün unsurların değerlendirilmesiyle, porin mutantlarında biyofilm oluşumunun moleküler mekanizması aydınlatılabilecektir. Biyofilm oluşumuna katıldığı literatürde gösterilen bütün genlerin gerçek zamanlı PZR verilerinin elde edilmesiyle mekanizmanın ortaya çıkarılabileceği gibi, bu verilerle birlikte porin mutantlarında transkriptomik çalışmalarının yapılması, mekanizmanın aydınlatılmasının sağlanmasında öneme sahiptir. Bununla birlikte, hesaba katılmayan diğer genlerin de ekspresyon seviyeleri incelenerek, biyofilm oluşumuyla birlikte indüklenen veya baskılanan genlerin tespiti yapılabilecektir.

Ayrıca, biyofilm meydana getiren porin mutantlarında yapılacak ek mutasyonlar ile biyofilm oluşumuna neden olan mekanizmalar aydınlatılabilir. Biyofilm oluşturan mutantlarda, *E. coli* zarf stresiyle ilişkili olduğu bilinen beş sinyal yolunun ayrı ayrı inaktif hale getirilmesiyle, porin mutantlarında biyofilmin azalması ön görülmektedir. Bunun için faj şok proteini'ne (Psp) ait *pspA* ve *pspC*, sigma E (σE) için *rpoE*, bakteriyel adaptif yanıt (Bae) için *mdtA* ve *acrD*, konjugatif pilus ifadesi (Cpx) için *cpxR* ve kolanik asit sentezinin düzenlenmesi

(Rcs) için *cpsB* ve *cpsG* genleri mutantlarda inaktif hale getirilecektir. Zarf stres genlerine ek olarak, ozmolarite sensör proteini olan EnvZ'nin ve *ompC* ve *ompF* genlerini regüle ettiği bilinen OmpR düzenleyici proteinin de inaktif edilmesiyle biyofilm oluşumunun mutantlarda azalacağı düşünülmektedir.

Biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında, önemi olan ancak fazla hareketliliğe sebep olduğunda da biyofilm oluşumunu bozan flagellanın durumu motilite testleriyle araştırılmalıdır. Motilite testinden sonra, flagellaya özgü antikorlar kullanılarak immünofloresan mikroskopi gibi tekniklerle flagellanın varlığı ve dağılımı gösterilmelidir. Bu sayede biyofilm oluşumunda *E. coli* W3110 porin mutantlarında flagellanın nasıl bir etkisinin olduğu aydınlatılabilecektir.

wza gen kümesinin ekspresyonunun mutantlarda baskılanıp, baskılanmadığını ortaya koymak ve *rcsB* üzerinden nasıl bir düzenleme olduğunu yorumlamak için, FTIR analizi gerçekleştirilip, moleküler yapı analiz edilmelidir.

Yapılacak bu analizler sayesinde, mekanizmaya yönelik çıkarımlar, varsayımların ötesine geçebilecektir ve daha kapsamlı sonuçlar elde edilip, porin mutantlarında biyofilm oluşumu aydınlatılabilecektir.

KAYNAKÇA

- Abraham, W.-R.** (2016). Going beyond the control of quorum-sensing to combat biofilm infections. *Antibiotics*, 5(1), 3.
- Acheson, J. F., Ho, R., Goularte, N. F., Cegelski, L., & Zimmer, J.** (2021). Molecular organization of the E. coli cellulose synthase macrocomplex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(3), 310-318.
- Ageorges, V., Monteiro, R., Leroy, S., Burgess, C. M., Pizza, M., Chaucheyras-Durand, F., & Desvaux, M.** (2020). Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic Escherichia coli (DEC): From bacterial adhesion to biofilm formation. *FEMS microbiology reviews*, 44(3), 314-350.
- Ahmad, I., Cimdins, A., Beske, T., & Römling, U.** (2017). Detailed analysis of c-di-GMP mediated regulation of csgD expression in Salmonella typhimurium. *BMC microbiology*, 17(1), 1-12.
- Alva, A., Sabido-Ramos, A., Escalante, A., & Bolívar, F.** (2020). New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of Escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 1463-1479.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L.** (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature reviews microbiology*, 16(7), 397-409.
- Ballén, V., Cepas, V., Ratia, C., Gabasa, Y., & Soto, S. M.** (2022). Clinical Escherichia coli: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. *Microorganisms*, 10(6), 1103.
- Barbau-Piednoir, E., Denayer, S., Botteldoorn, N., Dierick, K., De Keersmaecker, S. C., & Roosens, N. H.** (2018). Detection and discrimination of five E. coli pathotypes using a combinatory SYBR® Green qPCR screening system. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(7), 3267-3285.
- Barrios, A. F. G., Zuo, R., Ren, D., & Wood, T. K.** (2006). Hha, YbaJ, and OmpA regulate Escherichia coli K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnology and bioengineering*, 93(1), 188-200.
- Belas, R.** (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in microbiology*, 22(9), 517-527.

- Beloin, Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J. r., Ghigo, J.-M., & Dobrindt, U.** (2006). The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *188*(4), 1316-1331.
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M.** (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, *322*, 249-289. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_12
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., . . . Arbeille, B.** (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology*, *51*(3), 659-674.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V.** (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbial biofilms*, 163-199.
- Besharova, O., Suchanek, V. M., Hartmann, R., Drescher, K., & Sourjik, V.** (2016). Diversification of gene expression during formation of static submerged biofilms by *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1568.
- Bessaiah, H., Anamalé, C., Sung, J., & Dozois, C. M.** (2021). What flips the switch? Signals and stress regulating extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbriae (pili). *Microorganisms*, *10*(1), 5.
- Borgersen, Q., Bolick, D. T., Kolling, G. L., Aijuka, M., Ruiz-Perez, F., Guerrant, R. L., . . . Santiago, A. E.** (2018). Abundant production of exopolysaccharide by EAEC strains enhances the formation of bacterial biofilms in contaminated sprouts. *Gut microbes*, *9*(3), 264-278.
- Buck, L. D., Paladino, M. M., Nagashima, K., Brezel, E. R., Holtzman, J. S., Urso, S. J., & Ryno, L. M.** (2021). Temperature-Dependent Influence of FliA Overexpression on PHL628 *E. coli* Biofilm Growth and Composition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 1282.
- Carniello, V., Peterson, B. W., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J.** (2018). Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Science*, *261*, 1-14.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., & Brandl, M. T.** (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157: H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food microbiology*, *57*, 81-89.

- Choi, U., & Lee, C.-R.** (2019). Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 953.
- Christensen, D., Baumgartner, J., Xie, X., Jew, K., Basisty, N., Schilling, B., . . . Wolfe, A.** (2019). Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes. *MBio*, *10*(2), e02708-02718.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., & Beachey, E. H.** (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*, *37*(1), 318-326.
- Cohen, N., Zhou, H., Hay, A. G., & Radian, A.** (2019). Curli production enhances clay-*E. coli* aggregation and sedimentation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *182*, 110361.
- Corsini, P. M., Wang, S., Rehman, S., Fenn, K., Sagar, A., Sirovica, S., . . . Dorgan, B.** (2022). Molecular and cellular insight into *Escherichia coli* SslE and its role during biofilm maturation. *NPJ biofilms and microbiomes*, *8*(1), 9.
- Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E.** (2018). Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1636.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M.** (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, *49*(1), 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, *284*(5418), 1318-1322.
- Culler, H. F., Couto, S. C., Higa, J. S., Ruiz, R. M., J. Yang, M., Bueris, V., . . . Sircili, M. P.** (2018). Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Genes*, *9*(5), 253.
- Darcan, C.** (2004). Karadeniz suyunda PH, osmolarite ve açlık stresinin *Escherichia coli*'nin dış membran porin protein sentez düzeyine etkisinin araştırılması.
- Darcan, C., Özkanca, R., & İdil, Ö.** (2009). The role of RpoS, H-NS and AcP on the pH-dependent OmpC and OmpF porin expressions of *Escherichia coli* at different pH. *African Journal of Biotechnology*, *8*(9).

- Debnath, I., Norton, J. P., Barber, A. E., Ott, E. M., Dhakal, B. K., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A.** (2013). The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, *81*(5), 1450-1459.
- Díaz-Salazar, C., Calero, P., Espinosa-Portero, R., Jiménez-Fernández, A., Wirebrand, L., Velasco-Domínguez, M. G., . . . Govantes, F.** (2017). The stringent response promotes biofilm dispersal in *Pseudomonas putida*. *Scientific reports*, *7*(1), 1-13.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., & Wood, T. K.** (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental microbiology*, *9*(2), 332-346.
- Echeverz, M., García, B., Sabalza, A., Valle, J., Gabaldón, T., Solano, C., & Lasa, I.** (2017). Lack of the PGA exopolysaccharide in *Salmonella* as an adaptive trait for survival in the host. *PLoS genetics*, *13*(5), e1006816.
- Er, F.** (2018). *E. coli*'deporin proteinlerinin biyofilm oluşumunda rollerinin araştırılması. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Fahs, A., Quilès, F., Jamal, D., Humbert, F., & Francius, G. g.** (2014). In situ analysis of bacterial extracellular polymeric substances from a *Pseudomonas fluorescens* biofilm by combined vibrational and single molecule force spectroscopies. *The Journal of Physical Chemistry B*, *118*(24), 6702-6713.
- Fernández-Coll, L., & Cashel, M.** (2020). Possible roles for basal levels of (p) ppGpp: growth efficiency vs. surviving stress. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 592718.
- Fleming, D., & Rumbaugh, K. P.** (2017). Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms*, *5*(2), 15. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-2607/5/2/15>
- Flemming, H.-C.** (2016). EPS—then and now. *Microorganisms*, *4*(4), 41.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J.** (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, *8*(9), 623-633.
- Friedlander, R. S., Vogel, N., & Aizenberg, J.** (2015). Role of flagella in adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces. *Langmuir*, *31*(22), 6137-6144.
- Fu, D., Wu, J., Gu, Y., Li, Q., Shao, Y., Feng, H., . . . Qi, K.** (2022). The response regulator OmpR contributes to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Poultry Science*, *101*(4), 101757.

- Gaviria-Cantin, T., Vargas, A. F., Mouali, Y. E., Jiménez, C. J., Cimdins-Ahne, A., Madrid, C., . . . Balsalobre, C.** (2022). Gre Factors Are Required for Biofilm Formation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by Targeting Transcription of the *csgD* Gene. *Microorganisms*, *10*(10), 1921.
- Girard, M. E., Gopalkrishnan, S., Grace, E. D., Halliday, J. A., Gourse, R. L., & Herman, C.** (2018). DksA and ppGpp regulate the σ S stress response by activating promoters for the small RNA DsrA and the anti-adaptor protein IraP. *Journal of bacteriology*, *200*(2), e00463-00417.
- Gori, A., Harrison, O., Mlia, E., Nishihara, Y., Chan, J., Msefula, J., . . . Nobbs, A.** (2020). Pan-GWAS of *Streptococcus agalactiae* highlights lineage-specific genes associated with virulence and niche adaptation. *mBio* *11*: e00728-20. In.
- Grabski, H., Ginosyan, S., & Tiratsuyan, S.** (2021). Molecular simulations and Markov state modeling reveal inactive form of quorum sensing regulator SdiA of *Escherichia coli*. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, *18*(6), 2835-2840.
- Guan, H., Sun, Y., Hou, W., Zhao, W., Wang, P., Zhao, S., . . . Wang, D.** (2023). Infection behavior of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L). *Food Research International*, 112487.
- Guo, R., Luo, X., Liu, J., & Lu, H.** (2021). Mass spectrometry based targeted metabolomics precisely characterized new functional metabolites that regulate biofilm formation in *Escherichia coli*. *Analytica Chimica Acta*, *1145*, 26-36.
- Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B.** (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, *2*(4), 1242-1267.
- Han, M.-J., Lee, S.-Y., & Hong, S.-H.** (2012). Comparative analysis of envelope proteomes in *Escherichia coli* B and K-12 strains. *Journal of microbiology and biotechnology*, *22*(4), 470-478.
- Henderson, J. C., Zimmerman, S. M., Crofts, A. A., Boll, J. M., Kuhns, L. G., Herrera, C. M., & Trent, M. S.** (2016). The power of asymmetry: architecture and assembly of the Gram-negative outer membrane lipid bilayer. *Annual review of microbiology*, *70*, 255-278.
- Heras, B., Totsika, M., Peters, K. M., Paxman, J. J., Gee, C. L., Jarrott, R. J., . . . Schembri, M. A.** (2014). The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of

autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(1), 457-462.

Hermans, K., Roberfroid, S., Thijs, I. M., Kint, G., De Coster, D., Marchal, K., . . . Steenackers, H. P. (2016). FabR regulates Salmonella biofilm formation via its direct target FabB. *BMC genomics*, *17*(1), 1-15.

Heyde, M., & Portalier, R. (1987). Regulation of major outer membrane porin proteins of Escherichia coli K 12 by pH. *Molecular and General Genetics MGG*, *208*, 511-517.

Hirakawa, H., Suzue, K., Takita, A., & Tomita, H. (2021). Roles of OmpA in Type III Secretion System-Mediated Virulence of Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Pathogens*, *10*(11), 1496.

Hu, B., Khara, P., & Christie, P. J. (2019). Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(28), 14222-14227.

Hufnagel, D. A., DePas, W. H., & Chapman, M. R. (2014). The disulfide bonding system suppresses CsgD-independent cellulose production in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *196*(21), 3690-3699.

Irving, S. E., Choudhury, N. R., & Corrigan, R. M. (2021). The stringent response and physiological roles of (pp) pGpp in bacteria. *Nature reviews microbiology*, *19*(4), 256-271.

Ishihama, A., & Shimada, T. (2021). Hierarchy of transcription factor network in Escherichia coli K-12: H-NS-mediated silencing and Anti-silencing by global regulators. *FEMS microbiology reviews*, *45*(6), fuab032.

Iyer, R., Moussa, S. H., Durand-Reville, T. F., Tommasi, R., & Miller, A. (2017). Acinetobacter baumannii OmpA is a selective antibiotic permeant porin. *ACS infectious diseases*, *4*(3), 373-381.

Jin, Q., & Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, *6*, 21.

Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Lazzaroni, J.-C., Lejeune, P., & Dorel, C. (2005). CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *187*(6), 2038-2049.

- Kaplan, J. á.** (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*, 89(3), 205-218.
- Karatan, E., & Watnick, P.** (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 73(2), 310-347.
- Kenney, L. J., & Anand, G. S.** (2020). EnvZ/OmpR two-component signaling: an archetype system that can function noncanonically. *EcoSal Plus*, 9(1).
- Kettles, R. A., Tschowri, N., Lyons, K. J., Sharma, P., Hengge, R., Webber, M. A., & Grainger, D. C.** (2019). The Escherichia coli MarA protein regulates the ycgZ-yngABC operon to inhibit biofilm formation. *Molecular microbiology*, 112(5), 1609-1625.
- Khambhati, K., Patel, J., Saxena, V., & Jain, N.** (2021). Gene regulation of biofilm-associated functional amyloids. *Pathogens*, 10(4), 490.
- Khan, F. M., & Gupta, R.** (2020). Escherichia coli (E. coli) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. *Sustainable Development of Water and Environment: Proceedings of the ICSDWE2020*, 225-235.
- Kim, C., & Ndegwa, E.** (2018). Influence of pH and temperature on growth characteristics of leading foodborne pathogens in a laboratory medium and select food beverages.
- Kimkes, T. E., & Heinemann, M.** (2020). How bacteria recognise and respond to surface contact. *FEMS microbiology reviews*, 44(1), 106-122.
- Kint, G., De Coster, D., Marchal, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C.** (2010). The small regulatory RNA molecule MicA is involved in Salmonella enterica serovar Typhimurium biofilm formation. *BMC microbiology*, 10, 1-8.
- Konovalova, A., Mitchell, A. M., & Silhavy, T. J.** (2016). A lipoprotein/ β -barrel complex monitors lipopolysaccharide integrity transducing information across the outer membrane. *Elife*, 5, e15276.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J.** (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010306.
- Lai, Y.-W., Ridone, P., Peralta, G., Tanaka, M. M., & Baker, M. A.** (2020). Evolution of the stator elements of rotary prokaryote motors. *Journal of bacteriology*, 202(3), e00557-00519.

- Lam, L. N., Wong, J. J., Matysik, A., Paxman, J. J., Chong, K. K. L., Low, P. M., . . . Kline, K. A.** (2019). Sortase-assembled pili promote extracellular electron transfer and iron acquisition in *Enterococcus faecalis* biofilm. *BioRxiv*, 601666.
- Lee, & Yoon.** (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*, 27(6), 1053-1064. doi:10.4014/jmb.1611.11056
- Lee, K., & Yoon, S. S.** (2017). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness.
- Li, S., Zhang, W., Zhang, D., Xiu, W., Wu, S., Chai, J., . . . Yang, Y.** (2023). Migration risk of *Escherichia coli* O157: H7 in unsaturated porous media in response to different colloid types and compositions. *Environmental Pollution*, 121282.
- Li, W., Xue, M., Yu, L., Qi, K., Ni, J., Chen, X., . . . Xue, T.** (2020). QseBC is involved in the biofilm formation and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *PeerJ*, 8, e8833.
- Li, Y.-H., & Tian, X.** (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12(3), 2519-2538.
- Liao, C., Liang, X., Yang, F., Soupir, M. L., Howe, A. C., Thompson, M. L., & Jarboe, L. R.** (2017). Allelic variation in outer membrane protein A and its influence on attachment of *Escherichia coli* to corn stover. *Frontiers in Microbiology*, 8, 708.
- Lin, F., Yuan, S., & Han, W.** (2021). Effective prevention of *Escherichia coli* biofilm on materials by nano-vibration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 608, 125610.
- Little, D. J., Li, G., Ing, C., DiFrancesco, B. R., Bamford, N. C., Robinson, H., . . . Howell, P. L.** (2014). Modification and periplasmic translocation of the biofilm exopolysaccharide poly- β -1, 6-N-acetyl-d-glucosamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), 11013-11018.
- Liu, Z., Niu, H., Wu, S., & Huang, R.** (2014). CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerging microbes & infections*, 3(1), 1-5.
- Lower, B. H., Yongsunthon, R., Vellano III, F. P., & Lower, S. K.** (2005). Simultaneous force and fluorescence measurements of a protein that forms a bond between a living bacterium and a solid surface. *Journal of bacteriology*, 187(6), 2127-2137.

- Luvsandorj, B.** (2017). The QseB/QseC Signaling Affects Initiation of Chromosomal Replication through Regulating Expression of the DnaA Protein in *E. coli*. *European Journal of Molecular Biotechnology*(5), 66-73.
- Ma, Q., & Wood, T. K.** (2009). OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environmental microbiology*, 11(10), 2735-2746.
- Majdalani, N., & Gottesman, S.** (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 379-405.
- Maldarelli, G. A., Piepenbrink, K. H., Scott, A. J., Freiberg, J. A., Song, Y., Achermann, Y., . . . Donnenberg, M. S.** (2016). Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(6), ftw061.
- Manan, S., Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Shi, Z., Gauthier, M., & Yang, G.** (2022). Bacterial cellulose: Molecular regulation of biosynthesis, supramolecular assembly, and tailored structural and functional properties. *Progress in Materials Science*, 100972.
- Markova, J., Anganova, E., Turskaya, A., Bybin, V., & Savilov, E.** (2018). Regulation of *Escherichia coli* biofilm formation. *Applied biochemistry and microbiology*, 54(1), 1-11.
- Marouf, R. S., Mbarga, J. A. M., Ermolaev, A. V., Podoprighora, I. V., Smirnova, I. P., Yashina, N. V., . . . Martynenkova, A. V.** (2022). Antibacterial activity of medicinal plants against uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 14(1), 1.
- Mathlouthi, A., Pennacchietti, E., & De, B. D.** (2018). Effect of temperature, pH and plasmids on in vitro biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*, 10(4 (39)), 129-132.
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J.** (2021). *Listeria monocytogenes* biofilms in the food industry: is the current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen? *Microorganisms*, 9(1), 181.
- McNamara, J. T., Morgan, J. L., & Zimmer, J.** (2015). A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 84, 895-921.
- Meng, J., Xu, J., Huang, C., & Chen, J.** (2020). Rcs phosphorelay responses to truncated lipopolysaccharide-induced cell envelope stress in *Yersinia enterocolitica*. *Molecules*, 25(23), 5718.

- Meng, J., Young, G., & Chen, J.** (2021). The Rcs system in Enterobacteriaceae: envelope stress responses and virulence regulation. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 627104.
- Mirus, O., Hahn, A., & Schleiff, E.** (2010). Outer membrane proteins. *Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistry*, 175-228.
- Mitchell, A. M., & Silhavy, T. J.** (2019). Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity. *Nature reviews microbiology*, *17*(7), 417-428.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., . . . Huang, T.** (2020). Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 928.
- Myint, S. L., Zlatkov, N., Aung, K. M., Toh, E., Sjöström, A., Nadeem, A., . . . Wai, S. N.** (2021). Ecotin and LamB in Escherichia coli influence the susceptibility to Type VI secretion-mediated interbacterial competition and killing by Vibrio cholerae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1865*(7), 129912.
- Nakamura, A., Ooga, T., & Matsumoto, M.** (2019). Intestinal luminal putrescine is produced by collective biosynthetic pathways of the commensal microbiome. *Gut microbes*, *10*(2), 159-171.
- Nguyen, Y., Nguyen, N. X., Rogers, J. L., Liao, J., MacMillan, J. B., Jiang, Y., & Sperandio, V.** (2015). Structural and mechanistic roles of novel chemical ligands on the SdiA quorum-sensing transcription regulator. *MBio*, *6*(2), e02429-02414.
- Nord, A., & Pedaci, F.** (2020). Mechanisms and dynamics of the bacterial flagellar motor. *Physical Microbiology*, 81-100.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R.** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, *54*(1), 49-79.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Molecular microbiology*, *30*(2), 295-304.
- Ogasawara, H., Ishizuka, T., Hotta, S., Aoki, M., Shimada, T., & Ishihama, A.** (2020). Novel regulators of the csgD gene encoding the master regulator of biofilm formation in Escherichia coli K-12. *Microbiology*, *166*(9), 880-890.

- Orme, R., Douglas, C. I., Rimmer, S., & Webb, M.** (2006). Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics*, 6(15), 4269-4277.
- Ozer, E., Yaniv, K., Chetrit, E., Boyarski, A., Meijler, M. M., Berkovich, R., . . . Alfonta, L.** (2021). An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. *Science advances*, 7(24), eabg8581.
- Ozma, M. A., Khodadadi, E., Rezaee, M. A., Asgharzadeh, M., Aghazadeh, M., Zeinalzadeh, E., . . . Kafil, H. S.** (2022). Bacterial proteomics and its application in pathogenesis studies. *Current pharmaceutical biotechnology*, 23(10), 1245-1256.
- Öztürk, F. Y., Darcan, C., & Kariptaş, E.** (2022). The Determination, Monitoring, Molecular Mechanisms and Formation of Biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1007/s42770-022-00895-y
- Pakharukova, N., Tuittila, M., Paavilainen, S., Malmi, H., Parilova, O., Teneberg, S., . . . Zavalov, A. V.** (2018). Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5558-5563.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L.** (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature reviews microbiology*, 14(9), 576-588.
- Paxman, J. J., Lo, A. W., Sullivan, M. J., Panjikar, S., Kuiper, M., Whitten, A. E., . . . Tan, L.** (2019). Unique structural features of a bacterial autotransporter adhesin suggest mechanisms for interaction with host macromolecules. *Nature communications*, 10(1), 1967.
- Petrova, O. E., Schurr, J. R., Schurr, M. J., & Sauer, K.** (2012). Microcolony formation by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* requires pyruvate and pyruvate fermentation. *Molecular microbiology*, 86(4), 819-835.
- Pinel, I., Biškauskaitė, R., Pal'ová, E., Vrouwenvelder, H., & van Loosdrecht, M.** (2021). Assessment of the impact of temperature on biofilm composition with a laboratory heat exchanger module. *Microorganisms*, 9(6), 1185.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O.** (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, 7(4), 493-512.

- Raivio, T. L., Leblanc, S. K., & Price, N. L.** (2013). The Escherichia coli Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *Journal of bacteriology*, *195*(12), 2755-2767.
- Reddy, K. R., Reddy, P. A., Reddy, C. V., Shetti, N. P., Babu, B., Ravindranadh, K., . . . Naveen, S.** (2019). Functionalized magnetic nanoparticles/biopolymer hybrids: synthesis methods, properties and biomedical applications. In *Methods in microbiology* (Vol. 46, pp. 227-254): Elsevier.
- Reisner, A., Haagensen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L., & Molin, S.** (2003). Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. *Molecular microbiology*, *48*(4), 933-946.
- Rodrigo-Navarro, A., Sankaran, S., Dalby, M. J., del Campo, A., & Salmeron-Sanchez, M.** (2021). Engineered living biomaterials. *Nature Reviews Materials*, *6*(12), 1175-1190.
- Römling, U., & Galperin, M. Y.** (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in microbiology*, *23*(9), 545-557.
- Römling, U., Gomelsky, M., & Galperin, M. Y.** (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular microbiology*, *57*(3), 629-639.
- Ruhal, R., & Kataria, R.** (2021). Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, *251*, 126829.
- Samsudin, F., Ortiz-Suarez, M. L., Piggot, T. J., Bond, P. J., & Khalid, S.** (2016). OmpA: a flexible clamp for bacterial cell wall attachment. *Structure*, *24*(12), 2227-2235.
- Sano, K., Kobayashi, H., Chuta, H., Matsuyoshi, N., Kato, Y., & Ogasawara, H.** (2023). CsgI (YccT) Is a Novel Inhibitor of Curli Fimbriae Formation in Escherichia coli Preventing CsgA Polymerization and Curli Gene Expression. *International journal of molecular sciences*, *24*(5), 4357.
- Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa, T., & Kobayashi, H.** (2000). Expression of outer membrane proteins in Escherichia coli growing at acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(3), 943-947.
- Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S.** (2016). Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, *7*, 56-66.

- Schmitt, C., Bafna, J. A., Schmid, B., Klingl, S., Baier, S., Hemmis, B., . . . Voll, L. M.** (2019). Manipulation of charge distribution in the arginine and glutamate clusters of the OmpG pore alters sugar specificity and ion selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861(10), 183021.
- Scotti, R., Stringaro, A., Nicolini, L., Zanellato, M., Boccia, P., Maggi, F., & Gabbianelli, R.** (2021). Effects of Essential Oils from *Cymbopogon* spp. and *Cinnamomum verum* on Biofilm and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157: H7. *Antibiotics*, 10(2), 113.
- Seyll, E., & Van Melderen, L.** (2013). The ribonucleoprotein Csr network. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22117-22131.
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U.** (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-10.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R.** (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*, 121(2), 309-319.
- Shen, D., Langenheder, S., & Jürgens, K.** (2018). Dispersal modifies the diversity and composition of active bacterial communities in response to a salinity disturbance. *Frontiers in Microbiology*, 2188.
- Shetty, D., Abrahante, J. E., Chekabab, S. M., Wu, X., Korber, D. R., & Vidovic, S.** (2019). Role of CpxR in biofilm development: Expression of key fimbrial, O-antigen and virulence operons of *Salmonella* Enteritidis. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 5146.
- Shi, H., Zhou, X., Zou, W., Wang, Y., Lei, C., Xiang, R., . . . Wang, H.** (2018). Co-occurrence of biofilm formation and quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype typhimurium carrying an IncHI2-type oqxAB-positive plasmid. *Microbial pathogenesis*, 123, 68-73.
- Sicard, J.-F., Vogeleer, P., Le Bihan, G., Rodriguez Olivera, Y., Beaudry, F., Jacques, M., & Harel, J.** (2018). N-Acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of *Escherichia coli*. *Gut pathogens*, 10(1), 1-10.
- Silva, S. S., Monfardini, M. V., & Scaletsky, I. C.** (2020). Large plasmids encoding antibiotic resistance and localized-like adherence in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC microbiology*, 20, 1-8.

- Somorin, Y. M., Vollmerhausen, T., Waters, N., Pritchard, L., Abram, F., Brennan, F., & O’Byrne, C.** (2018). Absence of curli in soil-persistent *Escherichia coli* is mediated by a C-di-GMP signaling defect and suggests evidence of biofilm-independent niche specialization. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1340.
- Soria-Bustos, J., Saldaña-Ahuactzi, Z., Samadder, P., Yañez-Santos, J. A., Laguna, Y. M., Cedillo-Ramírez, M. L., & Girón, J. A.** (2022). The Assembly of Flagella in Enteropathogenic *Escherichia coli* Requires the Presence of a Functional Type III Secretion System. *International journal of molecular sciences*, *23*(22), 13705.
- Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N., & Slonczewski, J. L.** (2002). pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *184*(15), 4246-4258.
- Štaudová, B., Mícenková, L., Bosák, J., Hrazdilová, K., Slaninková, E., Vrba, M., . . . Bureš, J.** (2015). Determinants encoding fimbriae Type 1 in fecal *Escherichia coli* are associated with increased frequency of bacteriocinogeny. *BMC microbiology*, *15*(1), 1-9.
- Steinchen, W., Zegarra, V., & Bange, G.** (2020). (p) ppGpp: magic modulators of bacterial physiology and metabolism. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2072.
- Stepanović, S., Vuković, D., Ježek, P., Pavlović, M., & Švabic-Vlahović, M.** (2001). Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *20*(7), 502-504.
- Sturbelle, R. T., de Avila, L. F. d. C., Roos, T. B., Borchardt, J. L., Dellagostin, O. A., & Leite, F. P. L.** (2015). The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Veterinary microbiology*, *180*(3-4), 245-252.
- Styles, M. J., Early, S. A., Tucholski, T., West, K. H., Ge, Y., & Blackwell, H. E.** (2020). Chemical control of quorum sensing in *E. coli*: identification of small molecule modulators of Sdia and mechanistic characterization of a covalent inhibitor. *ACS infectious diseases*, *6*(12), 3092-3103.
- Suchanek, V. M., Esteban-López, M., Colin, R., Besharova, O., Fritz, K., & Sourjik, V.** (2020). Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *113*(4), 728-739.

- Swedan, S., Shubair, Z., & Almaaytah, A.** (2019). Synergism of cationic antimicrobial peptide WLBU2 with antibacterial agents against biofilms of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, *12*.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H.** (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*, *21*(22), 8671.
- Thongbhubate, K., Nakafuji, Y., Matsuoka, R., Kakegawa, S., & Suzuki, H.** (2021). Effect of spermidine on biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, *203*(10), e00652-00620.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N.** (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *80*(1), 7-12.
- Trampari, E., Zhang, C., Gotts, K., Savva, G. M., Bavro, V. N., & Webber, M.** (2022). Cefotaxime exposure selects mutations within the CA-domain of *envZ* which promote antibiotic resistance but repress biofilm formation in *Salmonella*. *Microbiology Spectrum*, *10*(3), e02145-02121.
- Trebino, M. A., Shingare, R. D., MacMillan, J. B., & Yildiz, F. H.** (2021). Strategies and approaches for discovery of small molecule disruptors of biofilm physiology. *Molecules*, *26*(15), 4582.
- van Wolferen, M., Orell, A., & Albers, S.-V.** (2018). Archaeal biofilm formation. *Nature reviews microbiology*, *16*(11), 699-713.
- Verbeke, F., De Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele, E., Van de Wiele, C., & De Spiegeleer, B.** (2017). Peptides as quorum sensing molecules: measurement techniques and obtained levels in vitro and in vivo. *Frontiers in neuroscience*, *11*, 183.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., & Lejeune, P.** (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *Journal of bacteriology*, *180*(9), 2442-2449.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C.** (2020). Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes*, *11*(11), 1239.

- Visnapuu, A., Van der Gucht, M., Wagemans, J., & Lavigne, R.** (2022). Deconstructing the phage–bacterial biofilm interaction as a basis to establish new antibiofilm strategies. *Viruses*, *14*(5), 1057.
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J.** (2014). Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 317.
- Wagh, P., & Escobar, I. C.** (2019). Biomimetic and bioinspired membranes for water purification: a critical review and future directions. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *38*(3), e13215.
- Wang, C., Zhang, H., Wang, J., Chen, S., Wang, Z., Zhao, L., & Wang, X.** (2020). Colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is dependent on lipopolysaccharide structure and glucose availability. *Microbiological Research*, *239*, 126527.
- Wu, D., Baigalmaa, L., Yao, Y., Li, G., Su, M., & Fan, L.** (2021). The *Escherichia coli* QseB/QseC signaling is required for correct timing of replication initiation and cell motility. *Gene*, *773*, 145374.
- Wu, L., Lin, X.-m., & Peng, X.-x.** (2009). From proteome to genome for functional characterization of pH-dependent outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Proteome Research*, *8*(2), 1059-1070.
- Yang, B., Zhang, D., Wu, T., Zhang, Z., Raza, S. H. A., Schreurs, N., . . . Qian, A.** (2019). Maltoporin (LamB protein) contributes to the virulence and adhesion of *Aeromonas veronii* TH0426. *Journal of fish diseases*, *42*(3), 379-389.
- Yang, K., Meng, J., Huang, Y.-c., Ye, L.-h., Li, G.-j., Huang, J., & Chen, H.-m.** (2014). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in epinephrine-enhanced motility and biofilm formation by *Escherichia coli*. *Cell biochemistry and biophysics*, *70*, 391-398.
- Yawata, Y., Nomura, N., & Uchiyama, H.** (2008). Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(17), 5429-5435.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J.** (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International journal of molecular sciences*, *20*(14), 3423.

Zahra, R., Khan, A., & Sajid, M. (2019). *Hydrodynamic Evaluation of Microtiter Plate Assay Using Computational Fluid Dynamics for Biofilm Formation*. Paper presented at the Fluids Engineering Division Summer Meeting.

Zhao, Z., Xu, Y., Jiang, B., Qi, Q., Tang, Y.-J., Xian, M., . . . Zhao, G. (2022). Systematic Identification of CpxRA-Regulated Genes and Their Roles in Escherichia coli Stress Response. *Msystems*, 7(5), e00419-00422.

Zhou, G., Wang, Y.-s., Peng, H., Li, S.-j., Sun, T.-l., Li, C.-l., . . . Xie, X.-b. (2023). ompX contribute to biofilm formation, osmotic response and swimming motility in *Citrobacter werkmanii*. *Gene*, 851, 147019.