

***Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 Suşunda *MisL* Ototransporter Proteininin *In Vitro* Üretimi ^[1]**

Nefise AKÇELİK * Mustafa AKÇELİK * 

[1] Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından desteklenmiştir (10B4240005)

* Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TR-06100 Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-4227

Özet

Salmonella enterica serovar Typhimurium genomunda kodlanan *MisL* ototransporter proteini, enfekte konakçı sisteminde eksprese edilmekte, ancak bu bakterinin laboratuvar kültürlerinde üretilmemektedir. Bu çalışmada, *MisL* ototransporter proteininin *in vitro* koşullarda üretimi; *misL* geninin transkripsiyonunu kontrol eden ve pozitif bir transkripsiyonel regülatör olan *marT* geninin, pBAD24 vektörüne klonlanması ve *marT* geni bloke edilmiş ($\Delta marT$) *S. Typhimurium* 14028 suşuna aktarımı yolu ile gerçekleştirildi. *LacZYA*:*misL* füzyonu içeren rekombinant 14028 suşunda *MisL* üretimi, β -galaktozidaz aktivite testi (460 Miller ünitesi) ve Western blot yöntemi kullanılarak tanımlandı. İmmun elektron mikroskopi çalışmaları sonucunda, *MisL* proteininin bu bakterinin dış yüzeyinde lokalize olduğu saptandı. Bu bulgular *MisL* ototransporter proteininin *S. Typhimurium*'un hücre dışı bir matriks adhezini olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: *MisL*, Klonlama, *In vitro* üretim, *S. Typhimurium*

***In Vitro* Production of *MisL* Autotransporter Protein in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028**

Summary

The *MisL* autotransporter protein is encoded in the genome of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, is expressed within an infected host system but not the laboratory cultures of this bacterium. In this study, *in vitro* production of *MisL* autotransporter protein was produced by cloning of *marT* gene, a positive transcriptional regulator controlling expression of *misL* gene, to the pBAD24 vector and by transforming to *marT* gene blocked ($\Delta marT$) *S. Typhimurium* strain 14028. *MisL* production in *S. Typhimurium* 14028 containing *lacZYA*:*misL* fusion was determined using both β -galactosidase activity test (460 Miller units) and Western blotting. Results of immunoelectron microscopy studies showed that *MisL* was localized to outer surface of this bacterium. These data pointed out that *MisL* is an extracellular matrix adhesin of *S. Typhimurium*.

Keywords: *MisL*, Cloning, *In vitro* production, *S. Typhimurium*

GİRİŞ

Salmonella serotipleri gastroenterit, tifo, bakteriyemi, fokal enfeksiyonlar ve yaşam boyu taşıyıcı duruma kadar geniş bir hastalık spektrumuna yol açabilmektedir. Bu hastalıklar etiyolojik açıdan değerlendirildiğinde birbirinden belirgin farklılıklar içermektedir. Ancak konakçı-patojen ilişkilerinin temel moleküler mekanizmalarının benzerliği, *Salmonella*'yı bu ilişkilerin açıklanmasında model bir mikro-organizma haline getirmiştir. Özellikle *Salmonella*'da patojenite ilişkili moleküler elemanların genetik ve biyokimyasal esasının tanısı, enfeksiyon hastalıklarının temel biyolojik süreçlerinin açıklanmasına öncülük etmektedir ¹⁻⁴.

Salmonella enfeksiyonunun ilk aşaması, konakçı ince bağırsak epiteline patojenin tutunmasının sağlanmasıdır. Bu süreç, *Salmonella*'da, serovariyete özgüllüğü gösteren değişik fimbriya'lar, diğer enterik bakterilerde tanımlanan ototransporter proteinlerle yüksek düzeyde homoloji gösteren *MisL* ve *ShdA* adhezinleri ve kapsül yapıları tarafından gerçekleştirilmektedir ⁵⁻⁹. *Salmonella enterica*'da yapılan DNA dizi analizleri sonucu, *MisL* proteinini kodlayan genin *Salmonella* patojenite adası III (SPI-III) üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Dizi analizi sonuçları, *Salmonella* ototransporter proteinlerinin de diğer bakteri gruplarında tanım-



İletişim (Correspondence)



+90 312 2126720/1119



akcelik@science.ankara.edu.tr

lanan ototransporter proteinlerde olduğu gibi, bir N-terminal sinyal peptit, bir iç domaini ve bir de C-terminal translokator domaini içerdiğine işaret etmiştir. Bu bilgiler ışığında; *MisL* ve *ShdA* proteinlerinin sitoplazmik membrandan geçişleri esnasında sinyal peptidin kesildiği, C terminal bölgesinin dış membranda beta formları oluşturduğu ve iç domaininin hücre yüzeyine salgılandığı öngörülmektedir. Ayrıca, iç domaininin *S. Typhimurium*'un patojenitesindeki fonksiyonunun, konakçı organizma bağırsak sisteminde bulunan hedef epitel hücrelere tutunmayı güçlendirme yönünde olduğu farklı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür¹⁰⁻¹³.

Salmonella ototransporter proteinlerinin kültür koşullarında üretilmemesi nedeniyle, söz konusu proteinlerin hücresel lokasyonu ve patojenitedeki rolleri üzerinde detaylı çalışmalar yapılamamıştır. Bu araştırmada, *MisL* ototransporter proteininin uygun klonlama sistemleri geliştirilerek laboratuvar koşullarında *S. enterica* serovar *Typhimurium*'da üretiminin sağlanması, tespiti ve hücresel lokasyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bakteriyel Suşlar, Plazmidler ve Bakteriyofaj

S. Typhimurium LT2 ve 14028 suşları ile pNK972 ya da T-pop transpozonu (TH3923) içeren varyantları yanında, *Escherichia coli* S17-1 λ pir ve DH5 α suşları, Dr. Andreas BAUMLER'den (Kaliforniya Üniversitesi, Davis, ABD) sağlanmıştır. *E. coli* Top10 hücreleri ve *E. coli* BL21 (DE3) Invitrogen (Carlsbad, CA, ABD) ve Novagen (Madison, WI, ABD), firmalarından satın alınmıştır. Bakteriyofaj P22 HT105/1 int genel transdüksiyonda kullanılmıştır¹⁴.

Kültür Koşulları

Bakteriler aerobik koşullarda 37°C'de Luria-Bertani (LB) broth ya da agar ortamlarında üretildi. Seleksiyon amacıyla, besi ortamlarına karbenisilin (Cb, 100 mg/l), kloram-

fenikol (Cm, 30 mg/l), ampicilin (Amp, 30 mg/l), kanamisin (Km, 40 mg/l) ve tetrasiklin (Tc, 20 mg/l) ilave edildi. Suşların β -galaktozidaz aktivitesi, LB agar ortamına, litrede 60 mg olacak şekilde 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopyranozit (X-Gal) ilave edilerek belirlendi¹⁵.

misL::lacZYA Füzyonu

İntihar vektörü pFUSE¹⁶, *S. Typhimurium* 14028 suşunda kromozomal *misL::lacZYA* füzyonunun oluşturulması için kullanıldı. *misL* geninin 5' ucunu içeren bir DNA fragmenti, *Tablo 1*'de dizileri belirtilen *misL* [1] primer çifti ile yürütülen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucu çoğaltıldı. Üretilen PZR ürünü *XbaI* ve *SmaI* ile kesildikten sonra pFUSE plazmidine bağlandı ve *E. coli* S17-1 λ pir suşuna transforme edildi. Söz konusu plazmid, konjugasyon ile *S. Typhimurium* 14028 suşuna aktarıldı. Konjugant suş LB + Cm plaklarında seçildikten sonra, aktarılan plazmidin *misL* genine kromozomal entegrasyonu Southern hibridizasyon tekniği¹⁸ ile belirlendi.

marT Geninin Klonlanması ve *MisL* Ototransporter Proteininin Üretimi

marT geni, pBAD24 (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) vektörünün içerdiği arabinoz ile indüklenebilen bir promotörün arkasına klonlandı. Doğal MarT regülatör proteininin pBAD24 üzerindeki arabinoz promotöründen ekspresyonu için *Tablo 1*'de belirtilen *marT* [1] primer çifti kullanılarak, ribozom bağlanma bölgesi yanında başlama ve durma kodonları içeren *marT* PZR fragmenti üretildi. Bu fragmentin klonlandığı pBAD24 vektörü, elektroporasyon ile *S. Typhimurium* 14028 suşuna aktarıldı.

Elektrotransformantlarda MarT regülatör proteinin ekspresyonu, bu hücrelerin gelişme ortamlarına %0.00002-0.2 arasında değişen konsantrasyonlarda L-arabinoz ilave edilerek indüklendi. Üç saat indüksiyon sonucunda kültürlerde *MisL* protein üretimi, hem β -galaktozidaz aktivitesi ve hem de Western blot yöntemleri^{15,19} kullanılarak tespit edildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri

Table 1. Primer pairs used in this study

Primer Adı	Primer Dizisi	Referans
<i>misL</i> [1] ileri	5'-GCTCTAGACTTGCCAACAACATGCG-3'	Bu çalışma
<i>misL</i> [1] geri	5'-GCCCGGGCTGAATCAGAAACTGTATTTC-3'	Bu çalışma
<i>marT</i> [1] ileri	5'-CGATTCACCATGCTCTGCTACGCAG-3'	Bu çalışma
<i>marT</i> [1] geri	5'-ATCTGCAGTTACCCATGTGTCACCCC-3'	Bu çalışma
<i>misL</i> [2] ileri	5'-TACTCACGGCGGAATACT-3'	Bu çalışma
<i>misL</i> [2] geri	5'-ACGTAAATATTGGCCGATCC-3'	Bu çalışma
<i>marT</i> [2] ileri	5'-AATCGCCTGGCTTCATTATC-3'	Bu çalışma
<i>marT</i> [2] geri	5'-GGAACGCCATACCAGTCAG-3'	Bu çalışma
gapA ileri	5'-GGAACGCCATACCAGTCAG-3'	Bu çalışma
gapA geri	5'-AACCCAGAAAACCGTTGAC-3'	Bu çalışma
pBAD24 ileri	5'-ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC-3'	17
pBAD24 geri	5'-GAT TTA ATC TGT ATC AGG-3'	17

Q-PZR Yöntemi İle *MarT* ve *MisL* Üretiminin Tespiti

Q-PZR çalışmasında, *Tablo 1*'de dizileri verilen *misL* [2], *marT* [2] ve *gapA* primer çiftleri kullanıldı. PZR karışımı son konsantrasyonu 200 ng olacak şekilde cDNA, ileri ve geri primerler ve 2X Q-PZR Supermix (BioPioneer, La Jolla, CA, ABD) eklenerek hazırlandı. Reaksiyon koşulları: 95°C'de 15 dak, 40 döngü boyunca 95°C'de 15 sn, 55°C'de 1 dak. ve 72°C'de 30 sn olarak uygulandı ²⁰.

İmmun Elektron Mikroskopi

S. Typhimurium 14028 transformant suşu LB broth besiyerinde optik yoğunluğu (OD₆₀₀) 0.5'e ulaştıktan sonra kültürler son konsantrasyonu %0.02 olacak şekilde L-arabinoz ilave edilerek 3 saat daha inkübe edildi. *MisL* ototransporter üretiminin teşvikini esas alan bu uygulamadan sonra, anti-*MisL* antiserumu (Anti-tavşan, IgG, Molecular Microbiology and Immunology Department, UC Davis, ABD) kullanılarak, söz konusu proteinin hücre yüzeyindeki lokasyonu immün elektron mikroskopisi ile belirlendi.

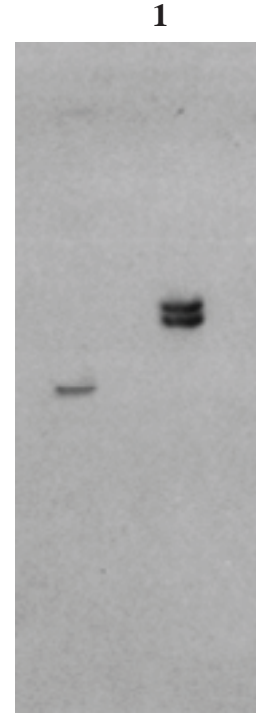
İmmün altın işaretleme aşamasının ilk basamağında, fosfat ile tamponlanmış peptonlu su ile iki kez yıkanan bakteri süspansiyonu, 10 µL olacak şekilde elektron mikroskop gridlerine aktarıldı ve 2 dak. oda sıcaklığında tutuldu. Grid üzerindeki fazla süspansiyon akıtıldıktan sonra, üzerine %1 oranında sığır serum albumini içeren fosfat ile tamponlanmış peptonlu su içerisinde 1/250 oranında seyreltilen *MisL* antikor çözeltisinden 10 µL ilave edilmesinin ardından oda sıcaklığında 20 dak. inkübe edildi. Bu süre sonunda gridler %1 oranında sığır serum albumini içeren fosfat ile tamponlanmış peptonlu su (PBS) ile 1 dak. yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, %1 oranında sığır serum albumini içeren PBS içerisinde 1/20 oranında seyreltilen altın işaretli sekonder antikor (Gold Labelled AntiGoat IgG, Sigma Chem Co. ABD) 10 µL olacak şekilde ilave edildi ve tekrar 20 dak. oda sıcaklığında tutuldu. Son aşamada gridler, %1 oranında sığır serum albumini içeren PBS ile 1 dak. yıkandı ve oda sıcaklığında tutularak kurutuldu. Elektron mikroskopik fotoğraflar Philips CM 120-A elektron mikroskobu kullanılarak alındı ^{10,21}.

BULGULAR

S. Typhimurium 14028 *MisL* ototransporter proteininin ekspresyonunun fenotipik tanısı için, tanımlayıcı genler olarak *lacZYA* kullanıldı. Bu amaçla öncelikle çoğaltılan *misL* geni pFUSE plazmidinde yer alan ve promotor içermeyen *lacZYA* genleri ile füzyona uğratıldı ve homolog bölge rekombinasyonu gerçekleştirilerek *S. Typhimurium* 14028 kromozomuna entegre edildi.

Bu işlem için ilk aşamada; *MisL* ototransporter protein geni için dizayn edilen primerler kullanılarak elde edilen polimeraz zincir reaksiyonu ürünü, ilk aşamada TopoTA klonlama kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) yardımı ile

PCR 2.1 vektörüne bağlandı ve kimyasal kompetent *E. coli* Top 10 hücrelerine aktarıldı. Transformantlar, PCR 2.1 plazmidinin içerdiği kanamisin dirençlilik (Km^r, 100 µg/ml) ve β-galaktozidaz geni tahribi (60 µg/ml X-gal bulunan ortamdaki beyaz koloniler) esasına göre seçildi. *S. Typhimurium* TH340 suşundan izole edilen ve Tn10 transpozonuna ait transpozaz geni ilave edilmiş olan pNK972 plazmidi, elektroporasyon yolu ile, *S. Typhimurium* 14028 suşlarına aktarıldı ve karbenisilin dirençlilik (Cb^r, 100 µg/ml) esas alınarak transformantlar seçildi (pNK972 plazmidi karbenisilin dirençlilik geni taşıyor). *misL* genlerini taşıyan *E. coli* S17 λpir suşu ile (konjugal verici) pNK972 plazmidini taşıyan *S. Typhimurium* 14028 (konjugal alıcı) transformantları arasında gerçekleştirilen konjugasyon sonucunda, *misL* genini taşıyan pFUSE plazmidi, homolog bölge rekombinasyonu yolu ile alıcı suş kromozomuna yerleştirildi. Konjugantlar kloramfenikol ve karbenisilin (kloramfenikol verici suşun, karbenisilin de alıcı suşun dirençlilik markeri) dirençlilik esasına göre seçildi. pFUSE plazmidi bir intihar plazmidi olduğundan; sadece taşıdığı homolog genler (burada *misL* genleri söz konusudur) sayesinde, konjuge edildiği *Salmonella* hücrelerinin kromozomal DNA'sına homolog bölge rekombinasyonu ile girerek, bu hücrelerde kalıcı olmaktadır ^{22,23}. Kromozom dışın-

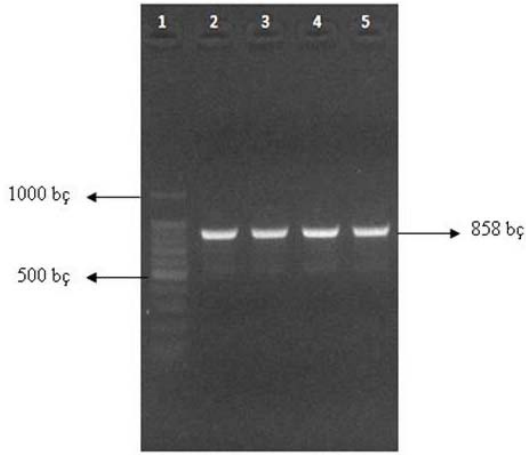


Şekil 1. *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve *misL::lacZYA* füzyonunu içeren konjugantının kromozomal DNA'sının *misL* ile hibridizasyonu

Hatlar: 1) *S. Typhimurium* 14028, 2) *misL::lacZYA* füzyonunu içeren konjugant suş

Fig 1. Hybridization of chromosomal DNA regions with *misL* probe in *S. Typhimurium* 14028 wild type strain and its conjugant, containing *misL::lacZYA* fusion

Lanes: 1) *S. Typhimurium* 14028, 2) The conjugant strain, containing *misL::lacZYA* fusion



Şekil 2. *S. Typhimurium* 14028 suşu genomik DNA'sından çoğaltılan *marT* geni PZR ürünleri

Hatlar: 1) 100 bç moleküler marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 bç, New England BioLabs), 2-5) *marT* geni PZR ürünleri

Fig 2. PCR products of *marT* gene, amplified from the genomic DNA of *S. Typhimurium* 14028 strain

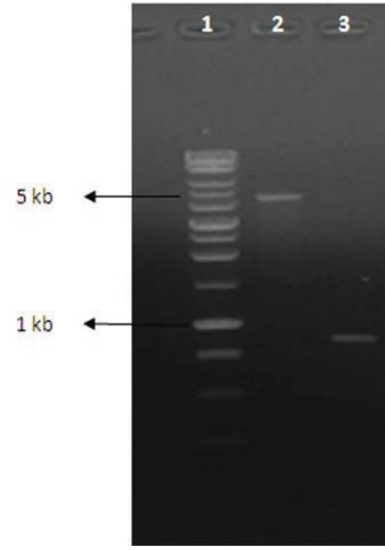
Lanes: 1) 100 bp molecular marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 bp, New England BioLabs), 2-5) *marT* gene PZR products

da bağımsız replikasyon yeteneği yoktur. Dolayısı ile homolog bölge rekombinasyonunun gerçekleşmemesi durumunda aktarıldığı konakçıdan elimine olur²¹. pFUSE plazmidinin konjugantta doğru bölgeye girip girmediği, konjuganttan izole edilen kromozomal DNA'nın; *misL* geninin hemen dışında iki kesim bölgesi bulunan *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi ve Southern blot yöntemi ile problemlenmesi ile kontrol edilerek söz konusu suşun *misL::lacZYA* füzyonu içerdiği tanımlandı (Şekil 1). Bu durumda *MisL* promotöründen önce *lacZYA* genlerinin, ardından da *misL* ototransporter proteininin ekspresyonu söz konusudur. Dolayısı ile bu bakteride β -galaktozidaz aktivitesi, *misL* proteininin ekspresyonunu gösterdi.

MisL ototransporter proteininin üretiminde; *misL* geninin pozitif regülatörü olan *marT* geni, pBAD24 vektörüne arabinoz varlığında indüklenen promotordan eksprese edilecek şekilde klonlandıktan sonra, *misL::lacZYA* füzyonu içeren *S. Typhimurium* 14028 suşuna aktarımı yapıldı. Bu amaçla, öncelikle 18 saatlik *S. Typhimurium* 14028 suşundan bakteriyel genomik DNA kiti (NA2120, Sigma, Chem. Co. ABD) ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve izole edilen genomik DNA örneğinden *marT* genine özgü primer çifti kullanılarak, *marT* geni çoğaltıldı (Şekil 2).

Uygun primerler kullanılarak çoğaltılan *marT* geni (858 bç) QIAquick PCR saflaştırma kiti (Qiagen, Valencia, CA, ABD) ile saflaştırıldı ve pBAD24 vektörüne aktarılmadan önce hem pBAD24 vektörü hem de *marT* geni *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile ikili kesime tabi tutuldu (Şekil 3).

Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi gerçekleştirilen ve kesimin doğru şekilde meydana geldiği agaroz jel elektroforezi ile belirlenen plazmid DNA örneklerinde,



Şekil 3. pBAD24 plazmid vektörü ve *marT* geninin ikili restriksiyon endonükleaz enzim kesim fragmentleri

Hatlar: 1) 1 kb DNA marker, 2) pBAD24 vektörünün *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesimi, 3) *marT* geninin *EcoRI* ve *PstI* enzimleri ile kesimi

Fig 3. Dual restriction endonuclease enzyme digestion fragments of pBAD24 plasmid vector and *marT* gene

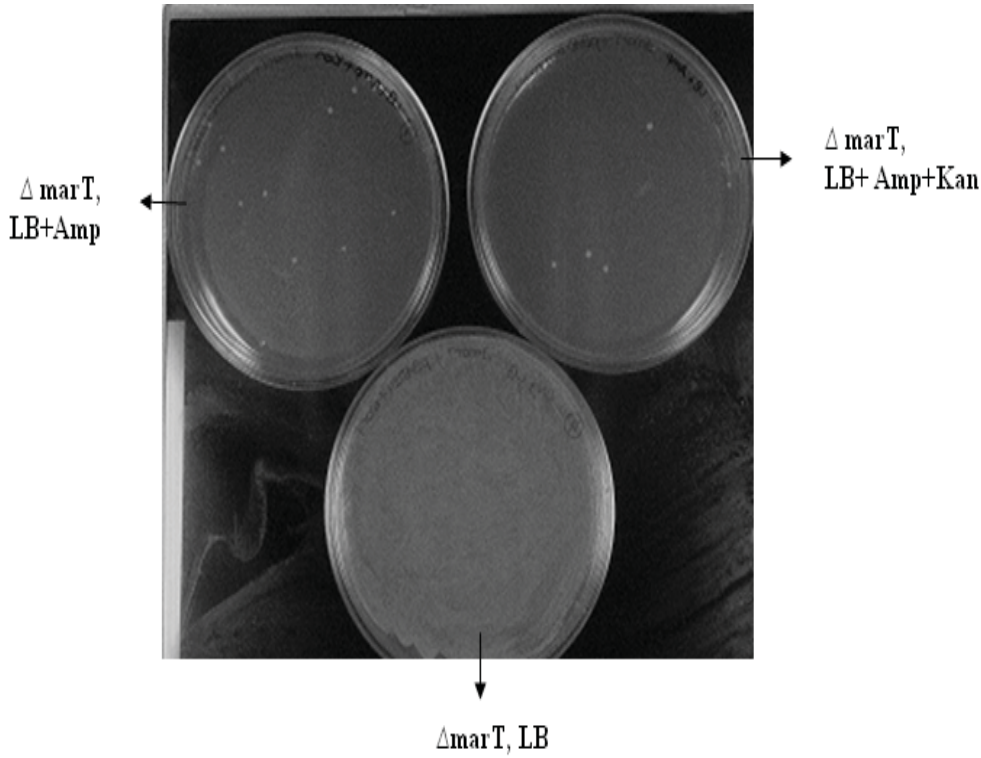
Lanes: 1) 1 kb DNA marker, 2) *EcoRI* and *PstI* enzyme digestion of pBAD24 vector, 3) *EcoRI* and *PstI* enzyme digestion of *marT* gene

bir sonraki basamakta defosforilasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilerek plazmid vektörünün 5' fosfat grubu uzaklaştırılarak ligasyon etkinliğinin artırılması sağlandı. Bu aşamadan sonra, defosforile pBAD24 plazmidini ile *marT* geninin ligasyonu ve ardından kompetent *S. Typhimurium* 14028 (*misL::lacZYA* ve $\Delta marT$) suşuna transformasyonu gerçekleştirildi (Şekil 4). *marT* geni ileve edilen pBAD24 vektörü, pNA01 olarak adlandırıldı.

pBAD24 plazmidinin içerdiği ampisilin ve *S. Typhimurium* 14028 $\Delta marT$ suşunun içerdiği kanamisin dirençlilik özelliklerine göre seçilen transformantlarda hedef *marT* genini taşıyan plazmidlerin varlığı, moleküler büyüklükleri esas alınarak doğrulandı (Şekil 5).

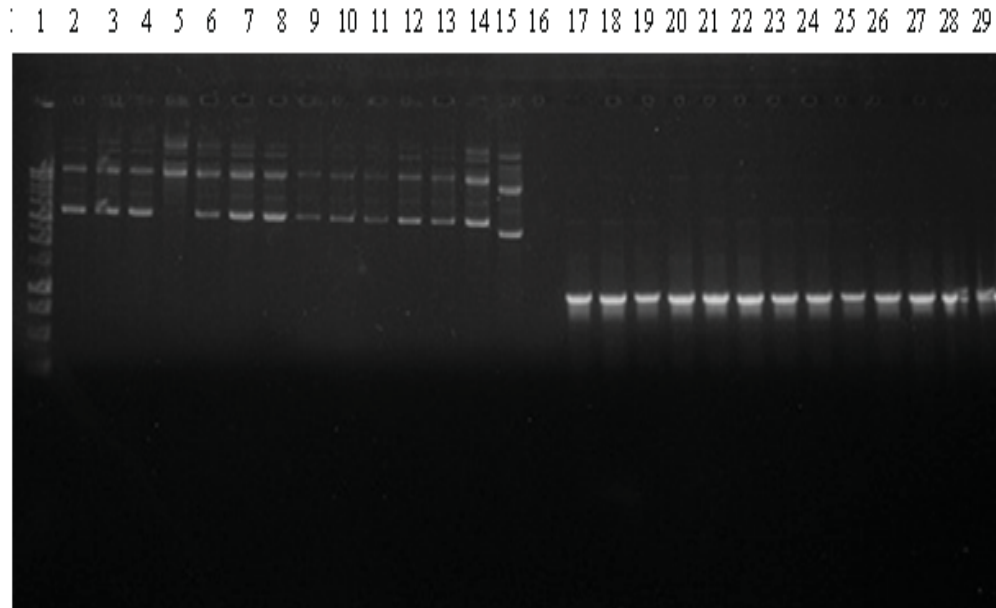
pNA01 plazmidine *marT* geninin giriş yönünün nihai kontrolü için; izole edilen plazmidlerin klonlama bölgeleri, genel pBAD24 primerleri (Tablo 1) ile (Retrogene, Forster City, CA, ABD) çoğaltılarak dizi analizine tabi tutuldu (Vaccine Research Institute, San Diego, CA, ABD). Aktarılan genin, *marT* ve vektöre giriş yönünün doğru olduğu dizi analizi sonucunda kesin olarak belirlendi (Şekil 6).

Bir sonraki basamakta, bakteri üreme ortamına arabinoz ilave edilerek geliştirilen mutant ve doğal tip *S. Typhimurium* suşlarından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu sonrasında uygulanan Q-PCR yöntemi ile *marT* geninin protein ürününün ortama arabinoz ilavesinden 20 dak. ve 1 saat sonra maksimum düzeye ulaştığı belirlendi. pBAD24 vektörü aktarılan *S. Typhimurium* 14028 suşunda yürütülen indüksiyon çalışmaları sonucunda; β -galaktozidaz aktivitesinin, üreme ortamında %0.0002 ara-



Şekil 4. *S. Typhimurium* 14028 suşuna ($\Delta marT$), pNA01 (*marT* geninin aktarıldığı pBAD24 vektörü) plazmidinin transformasyonu sonucu elde edilen transformantların uygun antibiyotikleri içeren LB agar plaklarında gelişimi

Fig 4. Growth of the transformants, obtained by the transformation of pNA01 (*marT* gene cloned variant of pBAD24 vector) to *S. Typhimurium* 14028, on the LB agar plates, containing appropriate antibiotics



Şekil 5. pNA01 plazmid DNA'sı ve bu plazmid kullanılarak çoğaltılan *marT* geni PZR ürünleri

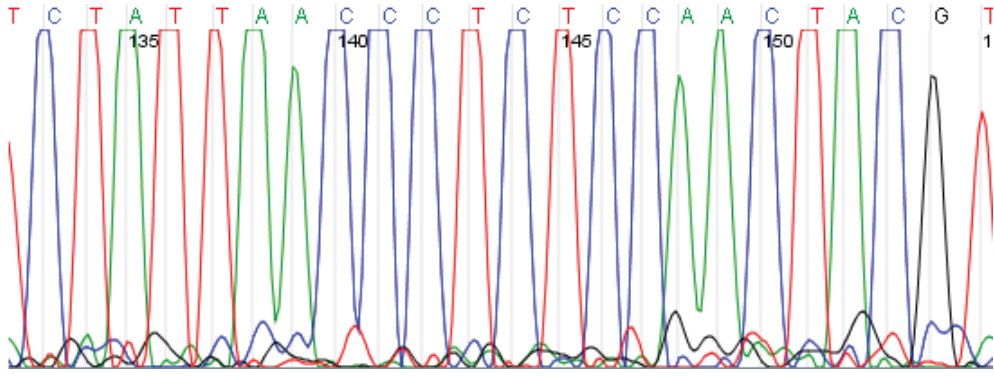
Hatlar: 1) 1 kb moleküler marker, 2-14) Farklı $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028 transformantlarından izole edilen pNA01 plazmid DNA, 15) pBAD24, 16) Negatif kontrol (su), 17-29) pNA01 plazmid DNA'sından çoğaltılan *marT* geni PZR ürünleri

Fig 5. pNA01 plasmid DNA and *marT* gene PCR fragments, amplified on this plasmid.

Lanes: 1) 1 kb molecular marker, 2-14) pNA01 plasmid DNA, isolated from different transformants of $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028, 15) pBAD24, 16) Negative control (water), 17-29) *marT* gene PCR products, amplified from pNA01 plasmid DNA

binöz varlığında, indüksiyon yapılmayan koşullardan farklılaşmaya başladığı ve %0.02 arabinöz varlığında 460 Miller ünitesine ulaştığı saptandı. Arabinöz bulunmayan ortamda geliştirilen *S. Typhimurium* 14028 suşunda ise bu düzey 40 Miller ünitesi düzeyinde bulundu. Bu suşta aynı arabi-

noz konsantrasyonunda yürütülen indüksiyon çalışmaları sonucunda ise, Western blot tekniği ile tespit edilebilen MisL proteini üretiminin %0.000002 arabinöz varlığında başladığı ve arabinöz konsantrasyonu varlığına bağlı olarak arttığı belirlendi.



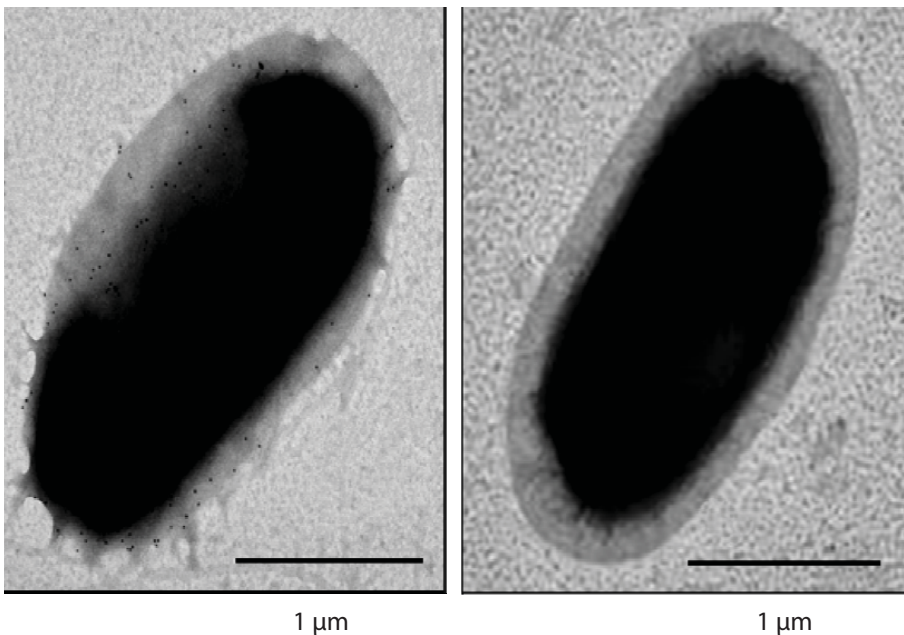
CGCTTTTTATCGCNCTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCAGGAGGAATTCA
CCATGTCCTGCTACGCAGCCACAGCATCAGACTATACTCAGTGGTGTCTATTAACCCCTCTCCAA
 CTACGTTATGTTTTGGCATGGTAACAATGCGATGTTATGGATAATTAACGATAATATTGAATTTA
 ATCCAGAAATGAATCGCCTGGCTTCATTATCGAGGCCAGATCTCAACATTATTCTGACAACGCC
 GCCAGCCGCTGCTTGGCCTTCTGCTGGAAAACGCCCCCTCCGTCGTCTCACAACAAACATTCTT
 TCAAAAAGTGTGGGAAGAAGACGGCATGGTGGTGTGCGCAAATACGCTTTATCAGAATATCTCC
 ATTATTCGCCGCGGATTACGTACCGTTGGCGAAAATGAAGATACGCTGATAATCACGGTCCGC
 GTAGAGGCTTTTCAGATTGAGCCAGGTGTGAGCCTCATGACCATCCGCAAAGACTTCGCTCAGGC
 AATAGAAAAAAGGGTGAGACGCCACCGCGTATGTCAGGGCGTTGGTTTAAACATTATGTACCT
 GTACTTTGGATGACCGGGACATTTGCTGTCGGTATTTTGCTTGGCACTATAAGCTGGCAAACCGT
 TCCCGATAAGGATTTTTACGATCGCTACACGCTGGTTGAAACAACCTCAGGGCTGTCATTTTTTCT
 CGCGGAATGAAGATATCGAAAGCGGCAGCCGCTTTGCAAGCTATAAGTCAATGATTCTAAAAAC
 CGGTATGGATTGTCAGAAATACCCATGGGTCTATTTCCCTTCCAGCAGTCGCACCCAGCGGTTA
 CNGGCATTGATTTGTCAGCAA

Şekil 6. $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028 transformantından izole edilen pNA01 plazmidinin DNA dizisi

Diziler: pNA01) AGGAG dizisinin arkasında, AGGAG) Ribozom bağlanma bölgesi, ATG) başlama kodonu) ve *marT* bölgesi) ATG dizisinin önünde

Fig 6. DNA sequence of the plasmid pNA01, isolated from the transformant of $\Delta marT$ *S. Typhimurium* 14028

Sequences: pNA01) behind to AGGAG sequence, AGGAG) Ribosome binding site, ATG) start codon and *marT* region) in front of ATG sequence



Şekil 7. LB broth (L-arabinoz ilave edilmemiş, A) ve misL üretimi induksiyonu yapılmış LB broth (%0.02 L-Arabinoz ilave edilmiş, B) ortamında geliştirilen *S. Typhimurium* 14028 transformantının immün elektron mikroskopi görüntüsü

Mikroskop büyütmesi: 27500

Fig 7. Immunelectron microscopy images of *S. Typhimurium* 14028 transformant, cultured in LB broth with the presence (0.02%, A) and absence (B) of L-arabinose

Microscope magnification: 27500

Mevcut çalışmada *S. Typhimurium* 14028 transformantında arabinoz induksiyonu yapılmayan (Şekil 7A) ve yapılan (Şekil 7B) koşullarda elde edilen immün elektron mikroskopi görüntüleri; MisL proteininin, dış yüzeye salgılanarak kapsüler polisakkaritlerin üzerinde biriktigi ve hücreye düzensiz dallanan bir dış yapı özelliği kazandırdığına işaret etmektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

S. Typhimurium'da *misL::lacZYA* transkripsiyonel füzyonu ile yürütülen çalışmalar, MisL ototransporter proteininin *in vitro* koşullarda üretilmediğini göstermiştir. Bununla birlikte *S. Typhimurium*'un makrofajlara girişi aşamasında, bu proteinin üretildiği Western blot yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır^{24,25}. Bu özelliği, bir adhezin olması nedeniyle, *S. Typhimurium*'un patojenitesinin ilk aşamasında önemli bir rol oynadığı düşünülen MisL ototransporter proteininin fonksiyonel analizini güçleştiren ana unsurdur. Bugüne dek MisL üretiminin homolog konakçılarda pBAD vektörleri kullanılarak ifade edilmesinde, bir salgı vektörü olmayan pBAD/gIII A'dan yararlanılmıştır^{10,11,26}. pBAD vektörlerinde bulunan ve arabinoz tarafından indüklenen promotör, hem pozitif ve hem de negatif bir regülatör olan AraC proteini tarafından kontrol edilmektedir. Arabinoz varlığında promotör aktive edilmede, arabinoz yokluğunda ise promotörden transkripsiyon çok düşük düzeyde gerçekleşmektedir²⁷. Seçilen vektörün, bir salgı vektörü olmaması durumunda, MisL ototransporter proteininin *in vitro* üretimi gerçekleştirilebilirse bile, bu durumda söz konusu proteinin patojenitede oynadığı rolün model sistemler kullanılarak tanımlanabilmesi mümkün değildir. Çalışmamızda oluşturulan pBAD24 rekombinantı (pNA01), MisL proteininin ekspresyonu ve salgılanması esas alınarak düzenlenen ilk vektördür. Bu anlamda; pNA01 vektörü ve MisL ototransporter proteininin üretimi gerçekleştirilen *S. Typhimurium* 14028 konakçı suşu, söz konusu proteinin *Salmonella*'nın patojenitesinde oynadığı rolün moleküler düzeyde tanımlanmasında temel biyomateryal görevi üstlenecek özellik göstermektedir.

Bu öngörünün ilk sonuçları, çalışmamız kapsamında immün elektron mikroskopi denemelerinden elde edilmiştir. Bu bulgular MisL ototransporter proteininin *S. Typhimurium*'da hücre dış yüzeyine salgılandığını ve hücre ile ilişkili olarak kaldığını kanıtlamaktadır. *S. Typhimurium* LT2 suşu genomunda tanımlanan *misL* gen dizisi esas alınarak, bu genin kodladığı MisL proteininin; özellikle enteropatogenik *E. coli*'de bulunan AIDA-1 (%43), *Shigella flexneri*'de bulunan VirG (%38) ve *Yersinia pestis*'de bulunan YapD ve YapH ototransporter proteinleri ile yüksek düzeyde benzerlik içerdiği saptanmıştır. MisL ile homoloji gösteren bu proteinlerin, hücre ile ilişkili olacak şekilde dış yüzeye salgılandığı ve patojenin konakçı sistem hedef hücrelerine tutunmada rol aldığı belirlenmiştir^{20,28-32}. İmmün elektron mikroskopi sonuçları, MisL proteininin hü-

resel lokasyonunu deneysel olarak kanıtlayan ve diğer ototransporter proteinlerle bu anlamda benzerliğini tanımlayan ilk deneysel bulgulardır. Bu bulgular söz konusu proteinin *Salmonella* patojenitesinde, önemli bir rol oynadığı görüşünü desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L: Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413, 852-856, 2001.
2. Morgan E, Bowen AJ, Carnell SC, Wallis TS, Stevens MP: SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun*, 75, 1524-1533, 2007.
3. Srivatsan A, Wang JD: Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr Opin Microbiol*, 11, 100-105, 2008.
4. Mirhosseini SZ, Seidavi A, Shivazad M, Chamani M, Sadeghi AA, Pourseify R: Detection of *Salmonella* spp. in gastrointestinal tract of broiler chickens by polymerase chain reaction. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 965-970, 2009.
5. Boekema BKHL, Van Putten JPM, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE: Host cell contact-induced transcription of the Type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun*, 72, 691-700, 2004.
6. Tükel Ç, Raffatellu M, Humphries AD, Wilson RP, Andrews-Polymeris HL, Gull T, Akçelik M, Adams G, Baumler AJ: CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol Microbiol*, 58, 289-304, 2005.
7. Tükel Ç, Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Akçelik M, Baumler AJ: Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46, 320-329, 2006.
8. Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW: AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 153, 1131-1140, 2007.
9. Galan JE: Energizing Type III secretion machines: What is fuel? *Nat Struct Mol Biol*, 15, 127-128, 2008.
10. Dorsey CW, Laarakker MC, Humphries AD, Weening EH, Baumler AJ: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol*, 57, 196-211, 2005.
11. Tükel Ç, Akçelik M, de Jong MF, Şimşek Ö, Tsois RM, Baumler AJ: MarT activates expression of the *MisL* autotransporter protein of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *J Bacteriol*, 189, 3922-3926, 2007.
12. Burkholder KM, Bhunia AK: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Gut Pathogens*, 1, 14-22, 2009.
13. Hamilton S, Bongaerts RJ, Mulholland F, Cochrane B, Porter J, Lucchini S, Lappin-Scott HM, Hinton JCD: The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, 10, 599, 2009.
14. Rappleye CA, Roth JR: A Tn10 derivative (T-POP) for isolation of conditional (tetracycline-dependent) phenotypes. *J Bacteriol*, 179, 5827-5833, 1997.
15. Miller JH: Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. pp. 352-355 (466 p), 1972.
16. Baumler AJ, Tsois RM, Bowe FA, Kusters JG, Hoffmann S, Heffron F: The *pef* fimbrial operon of *S. Typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun*, 64, 61-68, 1996.
17. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J: Tight regulation,

modulatoin and high level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177, 4121-4130, 1995.

18. Sambrook J, Russell DW: Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor, New York, USA*, 2001.

19. Harlow E, Lane D: *Using Antibodies*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.

20. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Villagra NA, Morgado J, Mora GC: Modified intracellular-associated phenotypes in a recombinant *Salmonella* Typhi expressing *S. Typhimurium* SPI-3 sequences. *PLoS One*, 5, 9394-9402, 2010.

21. Chessa D, Winter MG, Nuccio SP, Tükel C, Baumler AJ: RossE repress std fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Mol Microbiol*, 68, 573-587, 2008.

22. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tükel Ç, Akçelik M, Baumler AJ: Capsule-mediated immune evasion: A new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun*, 74, 19-27, 2006.

23. Uthe JJ, Royae A, Lunney JK, Stabel TJ, Zhao SH, Tuggle CK, Bearson SMD: Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Mol Immunol*, 44, 2900-2914, 2007.

24. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser JB, Groisman, EA: The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 181, 998-1004, 1999.

25. Eriksson S, Chambers BJ, Rhen M: Nitric oxide produced by

murine dendritic cells is cytotoxic for intracellular *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *Scandinavian J Immunol*, 58, 493-502, 2003.

26. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR: The autotransporter secretion system. *Res Microbiol*, 155, 53-60, 2004.

27. Chessa D, Dorsey CW, Winter MG, Baumler AJ: Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem*, 28, 8118-8124, 2008.

28. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D: Type V protein secretion pathway: The autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 692-744, 2004.

29. Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M: Characterisation of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol*, 186, 5883-5898, 2004.

30. Shultis DD, Purdy MD, Banchs CN, Wiener MC: Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science*, 312, 1396-1399, 2006.

31. Scaria J, Palaniappan UM, Ckiu D, Phan JA, Ponnala L, McDonough P, Grohn YT, Porwollik S, McClelland M, Chiou CS, Chu C, Chang YF: Microarray for molecular typing of *Salmonella enterica* serovars. *Mol Cell Probe*, 22, 238-243, 2008.

32. Dieye Y, Ameiss K, Mellata M, Curtiss RIII: The *Salmonella* pathogenicity island (SPI) 1 contributes more than SPI-II to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol*, 9, 1-14, 2009.