

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

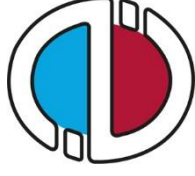
**YFHA-YFHK VE CUSS-CUSR İKİ BİLEŞİKLİ
FOSFORLAMA SİSTEMLERİNİN FARKLI STRES
ŞARTLARINDA (PH, OSMOLARİTE, BAZI
ANTİBİYOTİKLER VE METALLERLE) *ESCHERICHIA
COLI* W3110'NUN YAŞAMINDAKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Özge KAYGUSUZ
Yüksek Lisans

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Cihan DARCAN

BİLECİK, 2016

Ref.No: 10109889



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

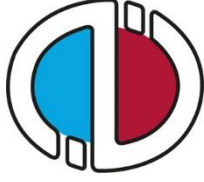
**YFHA-YFHK VE CUSS-CUSR İKİ BİLEŞİKLİ
FOSFORLAMA SİSTEMLERİNİN FARKLI STRES
ŞARTLARINDA (PH, OSMOLARİTE, BAZI
ANTİBİYOTİKLER VE METALLERLE) *ESCHERICHIA
COLI* W3110'NUN YAŞAMINDAKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Özge KAYGUSUZ
Yüksek Lisans

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Cihan DARCAN

BİLECİK, 2016

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 1002 kodlu 113T003 nolu proje ile desteklenmiştir.



ANADOLU UNIVERSITY



**BILECIK SEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

Institute of Science

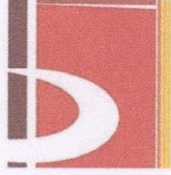
Department of Molecular Biology and Genetics

**YFHA/K and CUSS/R TWO-COMPONENT SYSTEMS
STRESS DIFFERENT CONDITIONS (pH, OSMOLARITY,
SOME ANTIBIOTICS AND METALS) INVESTIGATION
of *ESCHERICHIA COLI* W3110 LIFE in ROLES**

**Özge KAYGUSUZ
Master's**

**Thesis Advisor
Associate Professor Cihan DARCAN**

BILECIK, 2016



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 06/01/2016 tarih ve 115 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/04/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Özge KAYGUSUZ'un "YfhA-YfhK ve CusS-CusR İki Bileşikli Fosforlama Sistemlerinin Farklı Stres Şartlarında (Ph, Osmolarite, Bazı Antibiyotikler ve Metallerle) *Escherichia coli* W3110'nun Yaşamındaki Rollerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Cihan DARCAN

ÜYE : Prof. Dr. Semra İLHAN

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Tuba YAĞCI

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Onur EROĞLU

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Fadime ÖZDEMİR KOÇAK

ANABİLİM DALI BAŞKANI: Doç. Dr. Cihan DARCAN

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŐEKKÖR

Lisans ve yűksek lisans hayatım boyunca hem gűnlűk yaŐamda hemde tez çalıŐmamın tűm evrelerinde desteęini, fikirlerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen ve her tűrlű katkıda bulunan çok deęerli tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. Cihan DARCAN'a,

Tez çalıŐmamı 1002 kodlu 113T003 nolu proje ile destekleyen Tűbitak'a

Laboratuvar çalıŐmalarım sırasında benden desteğini esirgemeyen Uzm. Gűlin ÇETİN'e,

ÇalıŐmalarım ve tez yazımı sırasında katkılarından dolayı değerli arkadaŐım Hűseyin İZGÖRDŲ'ye

Öęrenim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teŐekkűrű bir borç bilirim.

Özge KAYGUSUZ

ÖZET

Bakteriler dış çevresel uyarılara adaptasyon için iki bileşikli sistem olarak ifade edilen bir sinyal transdüksiyon sistemine sahiptirler. Bu sistemlerden CusS-CusR ve YfhK-YfhA iki bileşikli fosforlama sistemlerinin bazı fonksiyonları belirlenmiştir. Ancak bu sistemlerin belirlenen görevlerinden başka, farklı stres şartları altında rolleri olduğu düşünülmektedir. Dolayısı ile ilk adım olarak bu sistemlerin mutantları elde edilerek pH (pH 5.5, 7.0 ve 8.5), osmolarite (0.2 M, 0.1 M, 0.01M), farklı metaller (Cu, Co, Zn) ve antibiyotiklerin (Kanamisin, Tetrasiklin, Streptomisin) etkisine karşı rolleri araştırılmıştır.

Çalışmada yurt dışından elde edilen mutantlar P1 transdüksiyon yöntemi ile *Escherichia coli* W3110 bakterisine aktarılmıştır. Ayrıca aynı şekilde temin edilen plazmitler vasıtasıyla tamamlama testleri yapılarak genlerin çalışılan stres şartlarındaki rollerinin kontrolü sağlanmıştır. Elde edilen veriler t testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Bu analizler sonucunda, nötral pH olan pH 7’de, çalışılan genlerin bir rolünün olmadığı, alkali pH şartlarında yaşam için çalışılan yfhA, cusS ve cusR’nin önemli rolü olduğu, asidik pH da ise yfhK, cusS, cusR’nin önemli olduğu tespit edilmiştir. Osmotik stres altında yaşam için yfhA, yfhK, cusS ve cusR’ nin önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Zn için yfhA, yfhK, cusS ve cusR, Co metale karşı ise yfhA ve cusR hariç diğer genler önemli bir role sahip iken, Cu stresine karşı cusS hariç 3 genin önemli olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Strese karşı korunmada önemsiz olarak belirlenen genlerin rolleri istatistiksel analize göre önemsiz bulunmuştur (p>0.05). Çalışılan antibiyotiklerden özellikle tetrasikline karşı cusS hariç tüm genlerin önemli olduğu belirlenmiştir. Streptomisine karşı dirençte yfhK hariç diğer 3 genin önemli rolü olduğu ve genlerin silinmesi sonucunda direnç ortaya çıktığı belirlenmiştir (p<0.05).

Çalışılan genlerin ilgili stres faktörleri ile direkt ilişkili genleri kontrol edip etmediği bundan sonraki aşamada çalışılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, pH stresi, iki bileşikli fosforlama sistemleri

ABSTRACT

Bacteria have a signal transduction called a two-component system in order to adapt to external environmental stimuli. From these systems, some functions of CusS-CusR and YfhK-YfhA two-component phosphorylation systems have been identified. However, it has been thought that these systems have different roles under different stress conditions other than designated ones. Therefore as a first step, mutants of these systems were obtained and their roles under different conditions were investigated. Their roles were investigated against pH (pH 5.5, 7.0, and 8.5), osmolarity (0.2 M, 0.1 M, 0.01M), various metals (Cu, Co, Zn) and antibiotics (Kanamycin, Tetracycline, Streptomycin) effect.

In the study, mutants obtained from abroad were transferred to the bacteria *Escherichia coli* W3110 through P1 transduction method. In addition, by means of the plasmid obtained from abroad, the roles of the genes in the studied stress conditions were controlled through performing by complementation tests.

At the end of the study, obtained data were analyzed statistically through student t test. As a result of this analysis, it was found that studied genes had no roles in pH 7 which was neutral pH. *yfhA*, *cusS* and *cusR* genes which was studied for life under alkaline pH conditions had important roles. *yfhK*, *cusS* and *cusR* had importance in acidic pH conditions. Under osmotic stress conditions, *yfhA*, *yfhK*, *cusS* and *cusR* had important roles ($p < 0.05$). While *yfhA*, *yfhK*, *cusS* and *cusR* for Zn and other genes except *yfhA* and *cusR* against Co metals had important roles, 3 genes except *cusS* against Cu stress had roles. Genes which was determined unimportant to protect against metal stress, was found insignificant according to statistical analysis. All genes especially against tetracycline 3 genes except *cusS* had roles. 3 genes, except *yfhK*, had important roles against streptomycin, and it was found that resistance occurred as a result of genes deletion.

It has been recommended that it should be studied in the next projects whether studied genes control the directly related genes with stress factors.

Keywords: *Escherichia coli*, pH stress, Two-Component Systems

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER	vi
ŞEKİLLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 <i>Escherichia coli</i> 'nin Genel Özellikleri.....	2
2.2 <i>Escherichia coli</i> 'nin Büyümesini Etkileyen Faktörler	2
2.2.1 Ozmotik stres	3
2.2.2 pH stresi	4
2.2.3 Metal stresi.....	6
2.2.4 Antibiyotik etkisi	9
2.2.4.1 Antibiyotiklere direnç sorunu	10
2.2.4.1.1 Doğal direnç	10
2.2.4.1.2 Kazanılmış direnç	10
2.2.4.1.3 Çapraz direnç	11
2.2.4.2 Bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirme mekanizmaları	11
2.2.4.2.1 Hedef değişikliği.....	11
2.2.4.2.2 Enzimatik inaktivasyonu	11
2.2.4.2.3 Bakteriyel membran değişiklikleri	11
2.2.4.3 İlacın dışarı atılması (Aktif pompa sistemleri)	11
2.3 İki Bileşikli Fosforlama Sistemleri.....	13

2.3.1	CusS/ CusR iki bileşikli fosforlama sistemi	16
2.3.2	YfhA/ YfhK iki bileşikli fosforlama sistemi	18
3.	MATERYAL METOD	20
3.1	Kullanılan <i>E. coli</i> Suşları.....	20
3.2	Besiyerleri.....	20
3.2.1	Nutrient agar besiyeri.....	20
3.2.2	Nutrient broth besiyeri	20
3.2.3	LB agar besiyeri.....	20
3.2.4	LB broth besiyeri	20
3.2.5	Soft agar	20
3.2.6	DM agar	21
3.2.7	SOB medium.....	21
3.2.8	SOC medium.....	22
3.3	<i>Escherichia coli</i> W3110 Mutantlarının Eldesi	22
3.3.1	P1kc fajı ile transdüksiyon.....	22
3.4	Yıkama Tamponu	23
3.5	Transformasyon	23
3.5.1	Plazmid izolasyonu	23
3.5.2	Miktar tayini	23
3.5.3	Transformasyon	24
3.6	Primer Sulandırma.....	24
3.7	Koloni PZR.....	24
3.8	Agaroz Jel Elektroforezi.....	26
3.9	TBE Hazırlama.....	26
3.10	TE Hazırlama.....	26
3.11	Tris-HCl Hazırlama.....	26

3.12	X-gal Hazırlama (5-brom-4klor-3indol-beta-D-galaktopironosid).....	26
3.13	IPTG Hazırlama (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid).....	27
3.14	IPTG ve X-GAL'li Besiyeri Hazırlama	27
3.15	Ringer Solüsyonu	27
3.16	Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) değerlerinin belirlenmesi .	27
3.17	Yaşam Deneyinde Kullanılan Metallerin Hazırlanması.....	27
3.18	Yaşam Deneyinde Kullanılan Antibiyotiklerin Hazırlanması.....	27
3.19	Yaşam Deneyinde Kullanılan NaCl Hazırlanması.....	28
3.20	Fosfat Tampon Hazırlanması	28
3.21	Yaşam Deneyleri	28
3.22	Komplementasyon Testleri:.....	29
3.23	İstatiksel Analiz	29
4.	BULGULAR.....	30
4.1	Mutantların Elde Edilmesi.....	30
4.2	Metaller ve Antibiyotiklerin MİK Değerleri	33
4.3	Yabani Tip ve Mutant Suşların Büyüme Grafiği Sonuçları	33
4.4	Yaşam Deneyi Sonuçları	34
4.4.1	İki bileşikli fosforlama sistemlerinin farklı pH lardaki rollerinin araştırılması	34
4.4.2	Osmotik stresde iki bileşikli fosforlama sistemlerinin rollerinin araştırılması	37
4.4.3	Metal stresinde iki bileşikli fosforlama sistemlerinin rollerinin araştırılması	40
4.4.4	Antibiyotik stresinde iki bileşikli fosforlama sistemlerinin rollerinin araştırılması	42
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	45
	KAYNAKLAR.....	58

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> yabani tip ve mutant suşları.....	21
Çizelge 3.2. Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.....	25
Çizelge 3.3. Transdüksiyon ve transformasyon doğrulaması amacıyla PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	25
Çizelge 3.4. PZR (Thermo) döngü koşulları.....	26
Çizelge 4.1. Yabani tip <i>E.coli</i> W3310 suşunda metaller ve antibiyotiklerin minimal inhibisyon değeri.....	33
Çizelge 4.2. Alkali pH'da yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	36
Çizelge 4.3. Asidik pH'da yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	37
Çizelge 4.4. 0.2 M NaCl varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	38
Çizelge 4.5. 0.1 M NaCl varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	39
Çizelge 4.6. pH 7 fosfat tamponda bakır sülfat varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	40
Çizelge 4.7. pH 7 fosfat tamponda çinko sülfat varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	41
Çizelge 4.8. pH 7 fosfat tamponda kobalt klorür varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	42
Çizelge 4.9. pH 7 fosfat tamponda streptomisin antibiyotiği varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	43
Çizelge 4.10. pH 7 fosfat tamponda tetrasiklin antibiyotiği varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.....	44

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İki bileşenli fosforlama sistemi sinyal yolağı	16
Şekil 2.2. <i>E. coli</i> de bakır homeostaz mekanizması.....	18
Şekil 2.3. Tahmini <i>yfhA/yfhK</i> iki bileşenli sistem mekanizması	19
Şekil 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>yfhA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	30
Şekil 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>yfhK</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	30
Şekil 4.3. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>cusS</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	31
Şekil 4.4. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>cusR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	31
Şekil 4.5. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::yfhA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 4.6. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::yfhK</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::cusS</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 4.8. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::cusR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	33
Şekil 4.9. Yabani tip ve mutant suşların büyüme grafiği.....	34
Şekil 4.10. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 yaşamı üzerine pH'ın etkisi.	35
Şekil 4.11. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların yaşamına alkali pH (8.5) etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	35
Şekil 4.12. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların yaşamına nötral pH (7.0) etkisi.	36
Şekil 4.13. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların yaşamına asidik pH (5.5) etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	36
Şekil 4.14. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110'un yaşamına osmotik stresin etkisi.....	38
Şekil 4.15. 0.2 M NaCl'ün yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	38
Şekil 4.16. 0.1 M NaCl'ün yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	39
Şekil 4.17. 0.01 M NaCl'ün yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi.	39
Şekil 4.18. Bakır metalinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	40
Şekil 4. 19. Çinko metalinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	41
Şekil 4. 20. Kobalt metalinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 <i>E. coli</i> 'ye göre önemlidir ($p<0.05$).....	41

Şekil 4. 21. Kanamisin antibiyotiğinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p<0.05$).43

Şekil 4. 22. Streptomisin antibiyotiğinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p<0.05$).43

Şekil 4. 23. Tetrasiklin antibiyotiğinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p<0.05$).44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

%	: Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum Sülfat
°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikro Molar
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
FeSO ₄	: Demir Sülfat
IPTG	: İzopropil β -D- 1 - Tiogalaktopiranosid
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KCl	: Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	: Trisodyum Sitrat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
Ni	: Nikel
Xgal	: 5- Bromo -4- Kloro -3 - İndoli - β -D- Galaktopiranosid
σ	: Sigma

Kısaltmalar

ADP	: Adenozin Difosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
bç	: Baz Çifti
dk	: Dakika
DMF	: Dimetilformamit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit Trifosfat
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
g	: Gram
Km	: Kanamisin
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani
M	: Molar
mg	: Miligram
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
O.D	: Optik Dansite
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SMM	: Supplemented Minimal Medium
Str	: Streptomisin
Te	: Tetrasiklin
TBE	: Tris- Borat- EDTA
TE	: Tris EDTA

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar ekosistemde farklı ve önemli birçok görev üstlenmektedirler. Bu canlılar yaşamları boyunca doğal çevrelerde pH, osmolarite, sıcaklık, açlık gibi yaşamlarını sınırlandıran birçok stres faktörüne maruz kalmakta ve hayatta kalabilmek için kendilerine çeşitli korunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Grant ve Long, 1981). Bu koruma mekanizmalarından birisi de membran permeabilitesinin değiştirilmesidir. Özellikle önemli bir model organizma olan *Esheria coli*'nin sıcaklık, pH, osmolarite gibi stres koşullarına maruz kaldığında, bu koşullarla başa çıkabilmek için porin proteinleri olan OmpC ve OmpF 'nin ekrespresyon düzeylerini değiştirdiği bilinmektedir (Overbeeke ve Lugtenberg, 1980).

Mikroorganizmalar porin proteinleri haricinde pH ve osmotik stresten korunmada birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Asidik stresten korunmada asit direnç sistemleri, asit şok proteinleri ve alkalın strese karşı sodyum proton antiporterlarından iki bileşikli fosforilaz sistemlerine kadar birçok mekanizmaya sahiptirler (Saito ve Kobayashi, 2003; Foster, 1991; Peng, vd., 2011).

Ekolojik çevrelerde mikroorganizmaların karşılaştığı bir diğer stres faktöründe metallerdir. Metaller gerek endüstriyel atıklarla gerekse deterjan ve dezenfektan maddelerin yapısına katıldıkları için doğada en fazla bulunan maddelerdir. Mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için metallere karşı savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunun yanı sıra metaller aynı zamanda hücre için gerekli olan esansiyel maddelerdir. Bu sebeple hücrelere metallerin alınması içinde bir mekanizmaya ihtiyaç vardır.

Mikroorganizmalarca metalin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanmış sistemlerdir (Egler, vd., 2005).

Hakkında henüz yeterli bilgi bulunmayan YfhA/K ve bakır metali ile alakalı olduğu bilinen CusS/R iki bileşikli sistemlerinin bahsedilen tüm bu faktörlerde bir rolünün olup olmadığı bu çalışma kapsamında belirlenecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Escherichia coli*'nin Genel Özellikleri

Escherichia coli Enterobacteriaceae familyasına ait spor oluşturamayan, çubuk şeklinde Gram negatif bir bakteri türüdür. Basit büyüme ortamlarında optimum 37 °C üreyebilen, glikozu pürivata kadar fermente edebilen ve laktik asite, formik asite dönüştürebilen fakültatif anaerobtur. Tutunmak için fimbriumlara ve hareket etmek için ise peritrik flagellaya sahiptir. Düzgün, parlak yüzeyli, düzgün kenarlı koloniler oluşturmalarına rağmen bazen mukoid koloniler oluşturabilirler (Sussman, 1997).

İlk olarak alman pediatrist Theodor Escherich tarafından memeli bağırsağında tespit edilen fekal orijinli koliform grubu bakterilerdir. İnsan ve sıcakkanlı hayvanların sindirim sisteminde bulunmaktadır. Bu sebeple fekal kirletici indikatörü olarak kullanılırlar (Torres, 2010).

2.2 *Escherichia coli*'nin Büyümesini Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmalar buldukları ortamda, optimum şartlar altında üreme ve gelişme gösterirler. Ancak, bu optimum şartlar uzun bir süre devam etmez ve belli bir zaman sonra, mikroorganizmaların büyümeleri sınırlanır ve durur. Bu olumsuz koşullar değiştirilmezse veya iyileştirilmezse, mikroorganizma popülasyonunda ölümler başlar, giderek artar ve canlı hücre sayısında azalmalar meydana gelir. Öte yandan canlı kalmayı başarabilen hücrelerde de, koloni morfolojisinde bozulma, kamçı ve fimbria oluşumunda varyasyon gibi çeşitli morfolojik değişiklikler ortaya çıkar (Arda, 2000).

Sıcaklık, radyasyon, yüzey gerilimi, osmotik basınç ve hidrostatik basınç gibi fiziksel etmenler mikroorganizmaların yaşamını etkiler. Bunun yanı sıra oksijen, hidrojen iyon konsantrasyonu, redoks tepkimeler, antibiyotikler, dezenfektanlar gibi kimyasal etmenler, basınç, santrifüj, çalkalanma, vibrasyon gibi mekanik faktörler ve biyolojik faktörler mikroorganizmaların büyümesini sınırlandırır (Arda, 2000). Bakteriler tüm bu stres faktörlerine geliştirdikleri çeşitli yanıt mekanizmaları ile direnç kazanırlar ve bu kazanımlarını genomik yapılarına da aktarabilirler. Ayrıca strese yanıt için kazandıkları bu genomik yapılar onların başka bir stres faktörüne karşı korunmasını da (çapraz koruma) sağlayabilmektedir. Örneğin, *Salmonella* ile yapılan çalışmalarda aside karşı dirençli hale getirilen *Salmonella* suşlarının aynı zamanda yüksek ısı, osmolarite, oksidatif strese karşı da tolerans kazandığını ortaya çıkarmıştır (Güven, 2012).

2.2.1 Ozmotik stres

Ozmotik stres, hücre içerisinde çözünen maddelerin yoğunluğundan dolayı suyun hücreye girerken zara yapmış olduğu basınçtır. Mikroorganizmalar içinde üredikleri sıvı besiyerinin ozmotik basıncı ile kendi hücreleri içerisindeki ozmotik basınç arasında bir denge kurmuşlardır. Bu denge yarı geçirici olan hücre membranları yardımı ile regüle edilir ve devam ettirilir. Mikroorganizmaların en iyi üreme gösterdikleri ortam izotonik ortamlardır. Böyle ortamlarda bakteri zarlarından giriş ve çıkış kolay olduğu için bakteri gelişmesine ve üremesine devam eder. Bakterilerin buldukları ortamın ozmotik basıncı azalmış yani hipotonik koşullar oluşmuşsa dışardan bakteri içine fazla su girerek bakteriyi şişirir ve olay devam ederse bakteriyi patlatır. Hipertonik ortamlarda ise, bakteri hücresi içerisinden dışarı fazla suyun çıkması sitoplazmik membranın hücre duvarından ayrılarak büzülmesine ve ortada toplanmasına neden olur (Moat, vd., 2002; Arda, 2000).

Bakteriler ozmotik strese maruz kaldığında yapısında birçok farklılık meydana gelir. Ozmotik stres koşulları altında hücre su alarak hücre hacminde artma, zar gerilimi, turgor basıncı ve membran permeabilitesinde değişiklik meydana gelir. Ayrıca suyun hücreden dışarı atımı ve alımında akua porinler (AqpZ) görevlidir. Çözülebilir maddelerin taşınmasında görevli taşıyıcı sistemler, trehaloz, glisin-betain, prolin ve glutamat gibi özel ozmoprotektan sentezi veya taşıyıcı genlerinde de değişimler söz konusudur (Moat, vd., 2002).

Mikroorganizmaların sitoplazmik membranında ozmotik stresi algılayan ozmosensörler vardır. Bu sensörlerin ozmotik stresi nasıl algıladığı henüz bilinmemektedir. *E.coli* de EnvZ/OmpR iki bileşikli sistemi ozmotik stresi algılamada görevli genlerdir. EnvZ ozmosensör proteini ozmotik şoku hisseder ve OmpR'yi fosforlar. Fosforlanan OmpR dış membran porini OmpC'nin ekspresyonunu artırır. OmpC Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunur ve madde taşınmasında görevlidir. Dış membranda bulunan bir diğer porin proteini ise OmpF'dir. Bu iki protein ozmotik streste görevlidir. Ortam osmolaritesi yüksek ise por çapı küçük olan OmpC'nin EnvZ/OmpR aktivitesi ile uyarılarak miktarı artırılır ve hücrenin dış ortama su vermesi engellenir bu sayede de ozmotik stresten korunmuş olur (Kennedy, 1982).

Osmotik stresten korunmak için bakterilerin geliştirdiği bir diğer mekanizma da hücre içerisinde ozmolit madde biriktirmektir. Bu maddeleri organizma kendi sentezlediği gibi dışarıdan da alabilir. Hücre içerisinde çözünebilen polar yapıları bu

maddeler osmotik basınç ile mücadele edebilmektedir. Prolin, glisin betain ve trehaloz bilinen en yaygın ozmolit maddelerdir (Dikici, 2009).

Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan GSH (glutasyon)'ın da osmotik strese görevli olabileceği düşünülmektedir. GSH, ökaryotik hücrelerin neredeyse hepsinde bulunur. Prokaryotik hücrelerde özellikle *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerde bulunur. GSH, hiperozmotik stres altındaki *E. coli* hücrelerinde sitoplazmadaki konsantrasyonu artan metabolitlerden biridir. Ozmolite artışına yanıtta hücre dışı GSH'un seviyesi önce düşer, sonra yükselir. Olasılıkla ortamdan GSH'un tutulumunun osmotik adaptasyonun başlangıç aşamasında hücre içi GSH'un birikmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Kanat ve Akdemir, 2014).

2.2.2 pH stresi

pH sulu çözeltilerdeki H^+ veya OH^- konsantrasyonlarının ko-logaritmik olarak ifadesidir. Yani hidrojen iyonları aktivitesidir. Her organizmanın gelişmesi için uygun bir pH aralığına ihtiyaç vardır. Mikroorganizmaların büyümesi doğrudan ortamın pH'ı ile ilgilidir. Mikroorganizmalar pH açısından incelendiğinde 3 tiptir. En iyi gelişimi düşük pH değerinde gösterenler asidofiller, nötral pH da gösteren nütrofiller ve yüksek pH da gösterenler ise alkalifillerdir (Madigan, 2010).

Bakteriler, buldukları ortamın pH'sında meydana gelen değişiklikleri algılayıp uyum sağlama yeteneğine sahiptir. Buna pH homeostasis mekanizma denir. Dış ortam pH'sında meydana gelen değişikliklere karşı, sitoplazma pH'sının nötr değerlere yakın kalması bu mekanizma ile sağlanır (Hill, vd., 1995; Öztürk, 2010).

Proton motif güç etkisi sayesinde bakteri sitoplazması dış ortama göre daha baziktir. Bu sebeple bakteriler yaşamlarını devam ettirmek ve hayatta kalabilmek için sitoplazma pH'sını kontrol etmek zorundadırlar (Hickey and Hirshfield, 1990). Bakteri membranı hidrojen iyonlarına karşı tam geçirgen değildir. Bu sebeple dış ortamda meydana gelen pH değişikliklerinden etkilenmezler. Örneğin, *E.coli*'nin sitoplazma pH'sı, dış ortamın pH'sı 4,5 - 7,9 değerleri arasında değişirken yalnızca 0,1 birim değişiklik gösterir (Hill, vd., 1995 ; Tosun, 2003). Ancak pH homestasisi oluşturan bütün bu sistemler bakteriyi etkili bir şekilde pH stresinden koruyamazlar.

Asidik koşullar altında büyüme ve hayatta kalma konusunda birçok çalışma olmasına rağmen alkalın ortamlara adaptasyon mekanizmaları henüz belirsizliğini korumaktadır. Bakterilerin alkalın ortamlara K(Na)/H antiporterları ile adaptasyon

sağlayabildiği bilinmektedir (Saito ve Kobayashi, 2003). Bunun yanısıra bakteriler metabolizmaları gereği asidik ürünler açığa çıkararak buldukları ortamın asiditesini arttırlar. Bu sebeple bakteriler asidik strese bazik stresten daha fazla mekanizma geliştirmişlerdir. Asidik pH değişikliği organizmada flagella hareketinden, proton motif güce, enzimlerin aktivitesinden protein katlanmalarına kadar çok çeşitli yapıları etkiler (Yousef ve Courtney, 2002). Bu da membran permeabilitesini etkileyerek pH dengesini bozar. Bakteriler pH etkisinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan en önemlisi asit şok proteinlerinin üretilmesidir. Düşük pH değerlerinde mikroorganizmalar asit şok proteinleri üreterek kendilerini korumaya almışlardır (Dikici, 2009). Son yıllarda *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* ile yapılan çalışmalarda bakterilerin asidik şartlara uyum sağlama mekanizmalarının olduğu ortaya konulmuştur. Orta dereceli asitli ortamlara bu patojen bakteriler belli bir süre maruz kaldıklarında spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamlarda canlılıklarını sürdürebilmektedir (Foster, 1991; Peng, vd., 2011).

Bakterilerin asidik pH etkisinden korunmasında görevli bir diğer mekanizmada asit direnç sistemleridir. *E. coli*'de 5 asit direnç sistemi vardır. Bunlar glukoz bağımlı AR1, glutamat bağımlı AR2, arjinin bağımlı AR3, lisin bağımlı AR4 ve ornitin bağımlı AR5'dir (Öztürk, 2010). Ayrıca *E. coli*'nin dış membran porin proteinleri OmpF, OmpC ve LamB porin proteinleride nötral ve asidik pH da görev alan bir diğer mekanizmadır. Asidik pH'da *E. coli*'nin OmpF, LamB porininin ve 30 kDa'luk proteinlerinin sentezinde azalma, OmpC sentezinde ise artış olduğu gözlenmiştir (Heyde ve Portalier, 1987). EnvZ ile yapılan çalışmalarda 2 farklı mutasyonun porin sentezindeki kontrolü değiştirdiği görülmüş ve bu mutant suşlardan birisinin *ompF* ve *ompC* genlerinin pH bağımlı düzenlenmesini oldukça etkilediği ifade edilmiştir. Aynı zamanda nötral pH'da ise her iki mutasyonda da bir değişim olmadığı ve OmpR sentezinin pH'dan etkilenmediği ortaya konmuştur (Heyde ve Portalier, 1987). pH bağımlı porin düzenlenmesinin transkripsiyonel düzeyde olduğu, ayrıca *ompF*'nin posttranskripsiyonel düzenlenmesinin de varlığı ifade edilmiştir. Heyde ve Portalier (1987), çalışmalarında *ompF* ve *ompC* genlerinin sentezi üzerine hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel düzeyde pH'ya bağlı olarak regülatör etkinin EnvZ bağımlı olduğunu ortaya koymuşlar, bunun yanında *ompF* sentezi için ayrıca bir düzenlemenin de varlığını vurgulamışlardır. Sato

vd. (2000), ise çalışmalarında asidik pH şartlarında OmpC porin sentezinin EnvZ'den bağımsız başka bir mekanizma ile çalıştığını ortaya koymuşlar, ancak mekanizmanın bilinmediğini ifade etmişlerdir.

Thomas ve Booth (1992), sabit osmotik şartlarda pH 7.8 ve pH 6.0'da yaptıkları çalışmalarında, asidik pH'da üretilen *E. coli* kültürlerinde OmpC porin sentezinin arttığını, fakat OmpF porininin ise pH 7.8'de daha fazla sentezlendiğini ortaya koymuşlardır. Ortamın osmolaritesi arttırıldığında OmpC'nin sentezinin her iki pH'da da, pH'dan bağımsız olarak arttığını, OmpC üzerine pH ve osmolaritenin farklı mekanizmalar ile etkilediğini göstermişlerdir. Farklı karbon kaynakları kullanarak yaptıkları çalışmalarında OmpC'nin sentezinde süksinatta bir değişim olmazken, gliserol içeren ortamda glukozdaki senteze göre bir azalma görüldüğünü ifade etmişlerdir. Sonuç olarak pH bağımlı porin sentezinin yalnızca glukoz kullanıldığı zaman ortaya çıktığını tespit etmişlerdir (Thomas ve Booth, 1992). Aynı çalışmada cAMP'nin pH 6.0'da OmpC sentezini arttırdığını, OmpF sentezine ise etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır. OmpC'nin osmotik düzenlemesinin ise ortamdaki karbon kaynağından bağımsız olduğunu göstermişlerdir (Thomas ve Booth, 1992).

Daha önceki çalışmalarda kompleks ortamlarda üreyen hücrelerde pH bağımlı porin düzenlenmesi ortaya konmuşken (Heyde ve Portalier, 1987; Heyde, vd., 1988), Thomas ve Booth (1992)' un çalışmalarında sadece glukoz karbon kaynağı olarak kullanıldığı zaman porin genlerinde pH bağımlı bir düzenlemenin olduğu ifade edilmiştir (Thomas ve Booth, 1992).

2.2.3 Metal stresi

Dünyada endüstrinin ilerlemesi ile birlikte toksik ağır metaller çevre kirliliğine neden olmaktadır. Ağır metaller biyolojik ayrışmanın güçlü inhibitörleri olarak bilinmektedir. Proteinlerin ve metabolik süreçlerin engellenmesinin başlıca sebebi ağır metallerin toksik etkileridir.

Topraklarda biriken bakır, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, civa ve krom gibi ağır metaller su kaynakları, bitki, hayvan, insan ve sudaki yaşam için toksik konsantrasyonlarda olabilir (Shrivastava, 2013).

Metaller toksik etkileri yanı sıra birer iz element olarak biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynamaktadır. Ca(II), Co(II), Mg(II), Mn(II), Na(I), Ni(II) ve Zn(II) gibi

metaller organizmalar için esansiyeldir ve bu nedenle besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu esansiyel metaller, redoks tepkimelerinde mikrobesein maddeleri olarak, ozmotik basıncı kontrol etmek için ve moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmada enzimlerin bileşenleri şeklinde kullanılırlar. Ancak Ag(I), Al(I), Au(II), Cd(I), Pb(II) ve Hg(II) gibi ağır metaller esansiyel olmadıkları gibi hiçbir biyolojik öneme de sahip değildir. Aynı zamanda mikroorganizmalara son derece toksik etkileri bulunmaktadır (Kılınç ve Dönmez, 2008).

Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açabilir, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilmektedir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yere sahip olduğu açıkça görülmektedir (Bruins, 2000).

Metal stresi doğada diğer stresler gibi bakterilerin en sık karşılaştıkları stres faktörlerinden birisidir. Ayrıca çeşitli dezenfektan maddelerin yapısında etken madde olarak da metaller kullanılmaktadır. Bakterilerle mücadelede kullanıldığı için metallere karşı direnç mekanizmaları ayrıca önem arz etmektedir. Farklı metallere karşı birçok korunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmaların temelinde ya metalin hücre detoksifiye edilmesinin sağlanmasıdır. Farklı metaller için bu yollardan bazıları içine alınmasının engellenmesi, ya hücre dışına atılmasının artırılması, ya da çeşitli yollarla kullanılarak direnç geliştirilmektedir.

Bakır (Cu), bakterilerde birçok solunum sisteminde ve metabolizmada görev alan enzimler için esansiyel bir metaldir. Ancak, bakırın aktif redoks tepkimesi aerobik hücrelerde ROS'ların oluşumuna neden olmakta ve böylelikle sitotoksik etki yaratmaktadır. Bu yüzden Cu toksisitesinden korunmak için bakteriler bir homeostatik mekanizmaya sahiptirler (Franke, vd., 2003).

Escherichia coli'de, hücrelerden fazla bakırın detoksifikasyonundan sorumlu 2 tane önemli sistem vardır. *E. coli*, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır toksisitesinden korunmak için çoklu koruyucu sisteme sahiptir. Cu homeostazında görevli birden fazla regülatör sistem bulunmaktadır. Bunlardan ilki CueR, sitoplazmik Cu algılamada görevli çoklu bakır oksidazdır. Sitoplazma içerisinde Cu varlığında bu gen CopA ve CueO homeostatik mekanizmasını düzenleyerek sitoplazmadan Cu detoksifikasyonunu sağlar. Ayrıca CueO bakır toksisitesinden

periplazmik proteinleri korumada da görevlidir. Aynı şekilde, hücre zarf stresi algılamada görevli iki bileşik fosforlama siteminin regülatörü olan CpxR de CopA düzenlenmesine etki göstererek yine sitoplazmadan Cu'ın uzaklaştırılmasında görev alır. Hücre içerisinde periplazmik bölgede Cu stresini algılamada görevli bir diğer sistemde CusS/CusR iki bileşenli sistemdir. Bu sistem periplazmadaki Cu'ı algılar ve CusCFBA mekanizmasını devreye sokarak periplazmadan bakır detoksifikasyonu yapar. CusA bakır toleransı için gerekli olan bir bakır-bağlayıcı proteindir. CusB ve CusC *E. coli* içinde, bakır iyonlarının detoksifikasyonuna katılan membran füzyon proteinidir. CusF ise *E. coli* içinde, bakır iyonlarının detoksifikasyonuna katılan periplazmik bir bağlama proteinidir (Franke, vd., 2003). Yine Pco diye bilinen etken faktör, periplazmadan Cu detoksifikasyonu sağlayan genleri kodlar ancak mekanizması henüz çözülmüş değildir (Rensing ve Grass, 2003). Bakır homeostazında görev yapan genler sitoplazmik Cu (I) 'e cevap veren ya da periplazmik Cu (I) algılamada görevli iki bileşenli sistemler MerR benzeri aktivatörler tarafından düzenlenir (Franke, vd., 2003). Ayrıca cusSR iki bileşenli sistemi çapraz düzenleme reaksiyonları göstererek Cu stresi altında YedVW sistemini de aktifleştirmektedir (Yamamoto ve Ishihama, 2005a). *E. coli* de Cu algılamada çok karmaşık bir mekanizma söz konusudur. Bu nedenle hücrede tam anlamı ile bakıra karşı korunmayı sağlayan yapının ne olduğu anlaşılamamıştır (Rensing ve Grass, 2003).

Prokaryotlarda çeşitli kobalt (Co) taşıma mekanizmaları tespit edilmiş olsa da bu mekanizmanın nasıl çalıştığı hala belirsizdir. Birçok iyon taşıyıcısı Co' ın taşınmasında görev yapmaktadır. Bunlar Zn taşıyıcısı ZupT, Mg taşıyıcısı CorA, Mn taşıyıcısı MntH ve Ni taşıyıcılarıdır. Kobaltın affinitesi bilinmemektedir ve diğer genlerle rekabetine bağlı olarak değişmektedir. Nikel taşınmasında görevli olan RcnA ekspresyonunun Co taşımada da görevli olabileceği düşünülmektedir (Rodrigue, vd., 2005).

Çinko (Zn) tüm canlı sistemlerde, proteinlerin önemli bir yapı bileşeni ve enzimlerin katalitik aktivitesinde rol oynayan bir metaldir. Bununla birlikte fazla miktarda hücre içerisine alınan Zn, ciddi toksik etki göstermektedir. Organizmaların hayatta kalabilmek için Zn toksisitesini tolere edebileceği bir mekanizmaya ihtiyaçları vardır. *E. coli* içerisinde Zn taşınımından bir ABC taşıma sistemi olan ZnuABC sistemi sorumludur. (Binet ve Poole, 2000).

Hücre içi oksidasyon durumlarında kadmiyum, çinkoyla birlikte etkinlik gösteren bir metaldir. Çinko, kadmiyum ve demir duyarlı düzenleyici proteinler demir duyarlı Fur

benzeri Zur proteini, ArsR / SMTB ailesinin bir üyesi olan represör CadC ve Mer tipi aktivatör ailesinden ZntR proteinleri metallerin alınması, depolanması ve hücre içerisine taşınmalarına katılmaktadırlar. Zur ve Fur proteinlerinin her ikisi de önemli iki farklı metal bağlanma bölgesi içerirler. Çinko bu proteinlere bağlanabilir ve bu proteinler arasında hücre içerisinde muhafaza edilebilir (Rensing ve Bharati, 2007). ZntA ATPaz aktivitesiyle uyarılan çinkoyla ilişkili bir proteindir. Organizma içerisinde Zn konsantrasyonu yüksek olduğu zaman dışı atım sistemi olan ZntA anahtarı açılır (Binet ve Poole, 2000). Yapılan çalışmalarda ZntA'nın homoloğu olan CadA kullanılmış ve CadA'nın zar veziküllerinde ATP bağımlı çinko ve kadmiyumun hücre içine alımı gösterilmiştir. Aynı zamanda ZntA proteini Cd'un taşınımına katılan bir P-tipi ATPaz'dır (Rensing ve Bharati, 2007). Kadmiyum, çinko ve nikel gibi 3 önemli metal iyonunu bağlayan bir diğer genel stres faktörü de ZinT'dir (Joyce, vd., 2006).

2.2.4 Antibiyotik etkisi

Antibiyotikler, bazı bakteriler, aktinomisetler ve mantarlar tarafından üretilen, başka mikroorganizmalar için öldürücü veya üremeyi durdurucu etki gösteren, infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelerdir. Kimyasal yapıları bilinmekte ve birçoğu bugün sentetik veya yarısentetik yöntemlerle elde edilebilmektedirler (Saran ve Karahan, 2010).

Başlangıçta kimyasal maddelerden sentezlenen kemoterapötikler ile doğal olarak bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenen antibiyotikler ayrı gruplar halinde incelenmiştir. Ancak daha sonra bazı antibiyotiklerin de sentetik ve yarısentetik olarak elde edilebilmeleri bu farkın ortadan kalkmasına neden olmuş ve antibiyotikler kemoterapötik maddelerin bir grubu olarak kabul edilmişlerdir (Kayaalp, 1998).

Mikroorganizmalar üzerine antibiyotikler çeşitli şekillerde etki ederler. Etki mekanizmalarına göre antibiyotikler 5 gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

1. Bakteri hücre duvar sentezini inhibe edenler
2. Sitoplazmik membran permeabilitesini bozanlar
3. Ribozomlarda protein sentezini bozanlar
4. Nükleik asit sentezini bozanlar
 - a) RNA polimerazın inhibisyonunu yapanlar
 - b) DNA replikasyon inhibisyonu yapanlar
 - c) Prokürsör sentezinin inhibisyonunu yapanlar

5. İntermediyer metabolizmayı bozmak suretiyle etki edenler (Saran ve Karahan, 2010).

2.2.4.1 Antibiyotiklere direnç sorunu

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal ilacın öldürme veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir.

Antibiyotik direnci üç tipte sınıflandırılabilir:

1. Doğal direnç
2. Kazanılmış direnç
 1. Mutasyona bağlı kazanılmış direnç
 2. Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç (Plazmid veya transpozon aracılı)
3. Çapraz direnç

2.2.4.1.1 Doğal direnç

Temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması vardır. Bu duruma örnek olarak *M. tuberculosis*'in kalsifiye odaklarda metabolizması yavaşlamış olarak uzun süre canlı kalabilmesi ve bunun sonucunda antitüberküloz ilaçlara dirençli olması verilebilir. Bir diğer örnek hücre duvarı olmayan Mycoplasmaların β -laktam antibiyotiklere olan direncidir (Kayaalp, 1998; Yüce, 2001).

2.2.4.1.2 Kazanılmış direnç

a) **Mutasyona bağlı kazanılmış direnç;** Bu şekilde dirence yol açan mutasyon olayı bakterinin kemoterapötik ilaç ile temasına bağlı değildir. Mutasyon bakteride genellikle spontan olarak oluşmaktadır.

b) **Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç (Plazmid veya transpozon aracılı)**

Plazmidler, ekstrakromozomal genetik elemanlardır. Sirküler yapıda çift zincirli DNA molekülleridir. Direnç genleri taşıyan plazmidlere rezistans plazmidleri (R plazmidleri) adı verilir.

Transpozonlar, rezistansın taşınmasında rol oynayan diğer bir özel DNA parçasıdır. Hem kromozomal DNA üzerine, hem de plazmidler üzerine sokulabilen (rekombine olan) daha ufak ve hareketli DNA parçacıklarıdır (Kayaalp, 1998; Yüce, 2001).

2.2.4.1.3 Capraz direnç

Belli bir ilaca karşı dirençli olan bazı mikroorganizmaların aynı veya benzer mekanizma ile etki eden diğer ilaçlara karşı da direnç geliştirmesi halidir (Yüce, 2001).

2.2.4.2 Bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirme mekanizmaları

2.2.4.2.1 Hedef değişikliği

Bu mekanizma ile ilacın bağlandığı reseptör veya bağlanma bölgesinde değişiklikler sonucu direnç gelişmektedir. Hedef değişikliği beta laktamlar, kinolon, glikopeptid, makrolid, tetrasiklin ve rifampisine direnç gelişmesinde önemlidir (Kayaalp, 1998; Yüce, 2001).

2.2.4.2.2 Enzimatik inaktivasyonu

Beta laktam antibiyotikleri inaktive eden beta laktamazlar pek çok Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde direnç gelişiminde önemli rol oynar. Aminoglikozidleri inaktive eden asetilaz, adenilaz ve fosforilaz enzimleri, kloramfenikölü inaktive eden asetil transferaz ve eritromisini inaktive eden esteraz enzimleri de enzimatik dirençte önemli rol oynar (Kayaalp, 1998; Yüce, 2001).

2.2.4.2.3 Bakteriyel membran değişiklikleri

İç ve dış membran permeabilitesindeki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan direnç ya ilacın hücre içine alınmadaki azalmadan ya da ilacın hızla dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanan dirençtir. Gram negatif bakterilerin dış membranlarındaki porin kanallarındaki değişiklikler özellikle *P. aeruginosa* nın beta laktam ilaçlara direnç kazanmasında önemli bir mekanizmadır. Dış zar geçirgenliğinin azalması kinolon ve aminoglikozid direncinde de önemlidir. İç membran ya da sitoplazmik membran geçirgenliğinin azalması aminoglikozidlere direnç gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Aktif pompa sisteminden kaynaklanan direnç tetrasiklinler, kinolonlar, makrolidler, kloramfenikol ve beta laktamlara dirençte etkilidir ve pek çok bakteride bulunur (Kayaalp, 1998; Yüce, 2001).

2.2.4.3 İlacın dışarı atılması (Aktif pompa sistemleri)

İlacın hücre içerisinde birikmesini engelleyen ve hücreden dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemleri vardır. Bu sistem ilk kez yaklaşık 30 yıl önce tetrasiklin antibiyotiği için belirlenmiştir. Tetrasiklin enerjiye bağımlı bir aktif pompa sistemi ile

hücreden atılır ve birikmez. Bu tip direncin kontrolü plazmid ve kromozom üzerindedir (Yüce, 2001).

E.coli de en az 9 tane çoklu direnç aktif pompa sistemi vardır. Bunlar *emrE*, *acrEF*, *emrAB*, *emrD*, *acrAB-TolC*, *mdfA*, *tehA*, *acrD* ve *yhiV*'dir. Bu genler yapı ve genetik olarak tanımlanmış 3 aileden birine aittir. *emrD*, *mdfA*, *emrB* ana yönetici süper ailesine (MFS), *acrB*, *acrF*, *acrD*, *yhiV* hücre bölünmesindeki direnç ailesine (RND) ve *emrE*, *tehA* küçük çoklu direnç ailesine (SMR) aittir (Viveiros, vd., 2005).

Bu genlerden TolC dış membran proteini, *acrD* muhtemel aminoglikozid efflux pomposu, *mdfA* kloromfenikol rezistans pompası, *tehA* DNA hasarına neden olan etidyum ve proflavin direnç pompası, *yihV* muhtemel şeker kinaz, *acrA/B* agriflavin direnci ve diğerleri ise çoklu ilaç direnç genleridir (Viveiros, vd., 2005).

Kullanılan Antibiyotikler;

Streptomisin, aminoglikozid sınıfı antibiyotikler arasında yer alır. Bu sınıftan keşfedilen ilk ilaçtır ve tüberküloz tedavisinde kullanılan ilk antibiyotiktir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerine oldukça etkilidir. Streptomisin, *Streptomyces griseus*'tan elde edilir (Singh ve Mitchison, 1954). Bakterilerin protein sentezini inhibe eder. 30S bakteriyel ribozom alt ünitesine bağlanarak S12 proteininin sentezini engeller (Sharma, vd., 2007).

Kanamisin de streptomisin gibi aminoglikozid sınıfı bir antibiyotiktir. *Streptomyces kanamyceticus* bakterisinden izole edilmiştir. Bakteri hücre membranını aktif transportla geçen ve hızlı bakterisid etki gösteren bir ilaçtır. Bakterilerin protein sentezini inhibe eder. 30S bakteriyel ribozom alt ünitesine bağlanarak S12 proteininin sentezini engeller (Akalin, 1992).

Tetrasiklin, *Streptomyces rimosus* isimli bakteriden sentezlenir. Çeşitli bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılır. 1950 yıllarında, Pfizer şirketinde Lloyd Conover tarafından keşfedilmiştir. Formülü, $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot H_2O$, 1952 yılında Woodward tarafından keşfedilmiş ve 1955 yılında ise patenti alınmıştır (Chopra ve Roberts, 2001).

Alkol, aseton ve propilen glikolde çözünür. Gram pozitif, Gram negatif bakteriler, riketsiyalar, klamidialar, mikoplazmalar ve amipler gibi büyük bir mikrobik saha içinde etkilidir (Kenneth, 2012).

Tetrasiklin hücre büyümesini, protein sentezini (translasyon) engelleyerek etki eder. Bakteri ribozomlarının, 30S alt-ünitelerine bağlanır ve amino-asil tRNA' nın ribozoma bağlanmasını önler. Bakteriyostatik etkisi vardır (Mehta, 2012).

2.3 İki Bileşikli Fosforlama Sistemleri

Bakteriler duyu, yanıt ve hayatta kalmak için yaşadıkları ortama uyum sağlamak zorundadırlar. Bu sebeple iki bileşikli fosforlama sistemlerini kullanırlar (Palonen, 2015). İki bileşikli fosforlama sistemleri prokaryotlardan ökaryotlara kadar bütün hücresel formlarda kullanılan sinyal aktarım sistemleridir (Hoch, 2000). Bakterilerde iki bileşikli sistemler, arkealar ve ökaryotların aksine sinyal iletiminin en temel sistemidir (Egger vd., 1997). Bakterilerin iki bileşikli fosforlama sistemlerinin sensörlerinin çoğu, membranla ilişkili histidin kinazlar ve sitoplazmada yer alan cevap regülatörleridir (Palonen, 2015). Bu sensörler çevreden gelen sinyalleri algılamada kendinde korunmuş olan histidin rezidüsünü fosforlar. Transmitter alan olarak adlandırılan histidin kinazın sitoplazmik bölgesinin karboksil ucu, ATP bağlama alanı ve kendini fosforillemesi için korunmuş olan histidin rezidüsünü içeren H kutusu alanını içerir. Sonuç olarak histidin kinaz, histidine bağlı fosforil grubunu, cevap regülatörü üzerindeki spesifik aspartat rezidüsüne transfer eder. Aktive olmuş bu cevap regülatörü çoğu zaman çevreden gelen sinyallere cevap olarak bir seri genin transkripsiyonunu indükler veya baskılar (Yamamoto, vd., 2005).

E. coli'de yaklaşık 30 tane iki bileşikli fosforlama sistemi olduğu bilinmektedir (Mizuno,1997). Bu sistemlerde 30 histidin kinaz ve 34 cevap regülatörü belirlenmiştir.

Yamamoto vd. (2005), çalışmalarında laboratuvar ortamında 25 histidin kinazın (ArcB, AtoS, BaeS, BarA, BasS, CheA, CpxA, CreC, CusS, DcuS, EnvZ, EvgS, HydH, KdpD, NarQ, NarX, NtrB, PhoQ, PhoR, RstB, TorS, UhpB, YedV, YehU ve YfhK) otofosforilasyon yapabildiğini göstererek histidin kinazlar arasındaki farklılığın otofosforilasyon oranındaki farklılıktan kaynaklandığını göstermiştir. Ayrıca eskiden bu sistemlerin belirli stres sinyallerine cevap verdiği ve bu streslere spesifik oldukları ifade edilmekteyken Wanner'ın 1992 yılındaki derlemesinde, bu sistemler arasında çapraz düzenlemeler olduğu da belirtilmiştir. Yani bir sensörün birden fazla cevap regülatörünü fosforlayabildiği gibi iki sensörün bir regülatörü fosforlayabildiğini belirtmiştir. Örnek olarak ise CheA sensörünün hem CheB hem de CheY regülatörü ile, ArcB ve CpxA

sensörlerinin ise ArcA regülatörü ile çalıştığı gösterilmiştir (Wanner, 1992; Yamamoto, vd., 2005).

Yamamoto vd. (2005), çalışmalarında BarA histidin kinazın, cevap regülatörü olan UvrY'yi fosforlayarak aktifleştirir iken aynı zamanda doğrudan ilişkili olmadığı CusR, NarL ve NarP cevap regülatörlerini de fosforlayabildiğini tespit etmişlerdir. Verhamme vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada ise ArcB sensörünün ArcA regülatörü haricinde NtrC, PhoB ve UhpA regülatörlerini de fosforladığı belirtilmiştir. Böylece bu çapraz düzenlemeler ile farklı stres şartlarında kompleks bir global ağ ortaya çıktığı görülmektedir (Yamamoto, vd., 2005; Verhamme, vd., 2002).

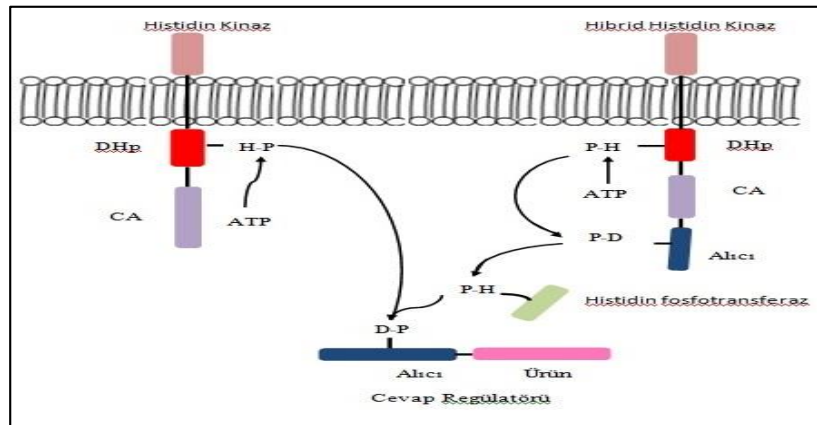
E. coli'de bulunan iki bileşikli sistemlerin birçoğu karakterize edilmiş ve temel olarak çeşitli stres faktörlerine cevap vermede sorumlu oldukları belirlenmiştir. Tanımlanan iki bileşikli sistemlerden ilk keşfedileni EnvZ-OmpR iki bileşikli fosforlama sistemidir. EnvZ-OmpR sistemi dış membranda yer alan OmpC ve OmpF porin proteinlerinin osmotik adaptasyonundan sorumludur (Yamamoto, vd., 2005). Sensör olarak görev alan EnvZ, osmolaritedeki değişimleri algılayıp OmpR'nin fosforlanmasını veya defosforile olmasını düzenleyen bir histidin kinazdır. OmpR fosforlandığında OmpC ve OmpF porin proteinlerinin genlerinin ekspresyon düzeyleri düzenlenmektedir. Ancak OmpR'nin sadece porin genlerini düzenlemediği belirlenmiştir. Başka birçok genin ekspresyonunda da görev aldığı bilinmektedir (Yamamoto, vd., 2005). ArcB/ArcA'nın, anaerobik koşullar altında solunum ve fermantasyon metabolizmasında (Luchi ve Lin, 1988; 1991), PhoR/PhoB'nin fosfat metabolizmasında (Wanner, 1993; 1996; Stock vd., 1989; Baek ve Lee, 2007), NtrB/NtrC (GlnG/GlnL)'nin, azot asimilasyonunda (Zimmer, vd., 2000), AtoS/AtoC'nin, asetoasetat metabolizmasında (Jenkins ve Nunn, 1987), BarA/UvrY'nin karbon metabolizmasında (Pernesting, vd., 2003), CreC/CreB'nin minimal medyumlarda glikolitik karbon kaynaklarını fermente etmede (Cariss, vd.,2008), CusS/CusR'nin, metal direncinde (Munson, vd., 2000; Sigman, vd., 1991), BasS/BasR'nin anaerobik ve asidik şartlarda gelişimde ve metallere cevap oluşturmada (Hagiwara, vd., 2004; Lee vd., 2005), DcuS/DcuR'nin, fumarat solunumunda (Zientz, vd., 1998; Golby, vd.,1999; Janausch, vd., 2002), CitA/CitB'nin, anaerobik şartlarda sitrat metabolizmasında (Kaspar ve Bott, 2002; Yamamoto, vd., 2008), iki histidin kinaz sensörü (NarX ve NarQ) ve iki cevap regülatöründen (NarL ve NarP) oluşan Nar sisteminin, elektron yakalayıcısı olan nitrit ve nitrata cevap oluşturmada

(Lee, vd., 1999; Bearson, vd., 2002; Stewart, vd., 2002), TorS/TorR'nin, trimetilamin oksit (TMAO) varlığında TMAO redüktaz solunumunda (Me'jean, vd., 1994), PhoP/PhoQ'nun, Mg^{+2} taşınmasında (Kato, vd., 1999; Groisman, 2001), UhpB/UhpA'nın, glikoz 6 fosfatın taşınmasında (Webber ve Kadner, 1997), KdpD/KdpE'nin potasyum taşınmasında (Walderhaug vd., 1992; Gassel, vd., 1999), BaeS/BaeR'nin, çoklu ilaç direncinde (Baranova ve Nikaido, 2002; Nagakubo, vd., 2002), RcsC/RcsB'nin kapsül oluşumunda (Laubacher ve Ades, 2008), CpxA/CpxR'nin bazik pH, biyofilm oluşumu ve aşırı sentezlenen salgı proteinleri gibi hücre zarf stresleri ile ilişkili şartlarda (Danese ve Silhavy, 1998; Langen, vd., 2001; Snyder, vd., 1995) ve ayrıca hücre yüzeyindeki bozulmalarda (Otto ve Silhavy, 2002; Danese, vd., 1995), EvgS/EvgA'nın, logaritmik fazdaki hücrelere asit direnci kazandırmada (Itou, vd., 2009; Ma, vd., 2004; Masuda ve Church, 2002; 2003), hücrelerarası haberleşmeden sorumlu olan QesC/QesB'nin flagella regulonunun ekspresyonunda (Sperandio, vd., 2002), CheA/CheB'nin kemotaksis düzenlenmesinde, CheA/CheY'nin flagellanın hareketinde ve HydH/HydG (ZraS/ZraR)'nin, çinko ve kurşun varlığına duyarlı olup bu maddelere karşı direnç mekanizmasında (Noll, vd., 1998) görevli oldukları belirlenmiştir. Ayrıca tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen YehU/YehT'nin çalışmasının siklik AMP (cAMP), cAMP reseptör proteinine (CRP) bağlı olduğu (Kraxenberger, vd., 2012) ve YpdA/YpdB'nin ise hücre dışındaki pirüvat tarafından uyarılarak direnç proteini olduğu düşünülen *yhjX* geninin ekspresyonunu düzenlediği (Fried, vd., 2013) tanımlanmıştır. Tanımlanan iki bileşikli sistemler arasında bulunan YehW/YehV, YfhK/YfhA, RstB/RstA'nın ise henüz hangi şartlarda hangi genleri kontrol ettikleri tespit edilememiştir.

Genel olarak iki bileşikli sistemler, yukarıda görüldüğü gibi bir sensörden (HK) ve bir cevap regülatöründen (RR) oluşur (Hoch, 2000). Ancak şimdiye kadar sensörü olmayan sadece cevap regülatöründen oluşan RssB, FimZ, YgeK ve YhjB iki bileşikli sistemlerde bulunmuştur. Bu sistemlerden FimZ ve YhjB'nin fosforlanmasını sağlayan herhangi bir çapraz düzenleme belirlenememesine rağmen RssB'yi ArcB, CheA ve UhpB histidin kinazlar fosforlarken YgeK'yı ise BarA ve UhpB histidin kinazların fosforladığı belirlenmiştir (Yamamoto, vd., 2005).

Son 10 yılda bu sistemler üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi iki bileşikli fosforlama sistemlerinin sensörleri, regülatörleri veya iki proteinde farklı stres koşullarında görev alabilmektedir.

Ayrıca moleküler çalışmalar, bilim dünyasında kontrollü ortamlar olması için minimal besiyerleri gibi içeriği bilinen besiyerlerinde yapılmakta ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmektedir. Ancak doğal şartlar altında bir çok farklı stres altında yaşamak zorunda kalan mikroorganizmalar, farklı stres şartlarına adaptasyonda global bir kontrol ortaya koyarak kendi yaşamlarını sağlamaya çalışmaktadırlar. Organizmalar açlık, pH, osmolarite, toksik kimyasal maddeler gibi birçok stresi aynı anda yaşamaktadırlar. Bu nedenle moleküler çalışmalarda ortaya konulan sonuçların çoğunlukla doğada farklı olduğunu görmekteyiz. Bundan dolayı kendi rolleri belirlenmiş olan bazı genlerin karışık stres şartlarında da çalışması, doğal ortamda ya da doğala yakın şartlarda araştırılması da gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı moleküler mekanizmaları henüz tam olarak çözülmemiş CusSR, özellikle hakkında neredeyse hiçbir bilgi olmayan YfhKA bu tez kapsamında farklı stres koşulları altında yaşam deneyleri ile görevleri analiz edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.1. İki bileşenli fosforlama sistemi sinyal yolağı (Laub ve Goulaian, 2007).

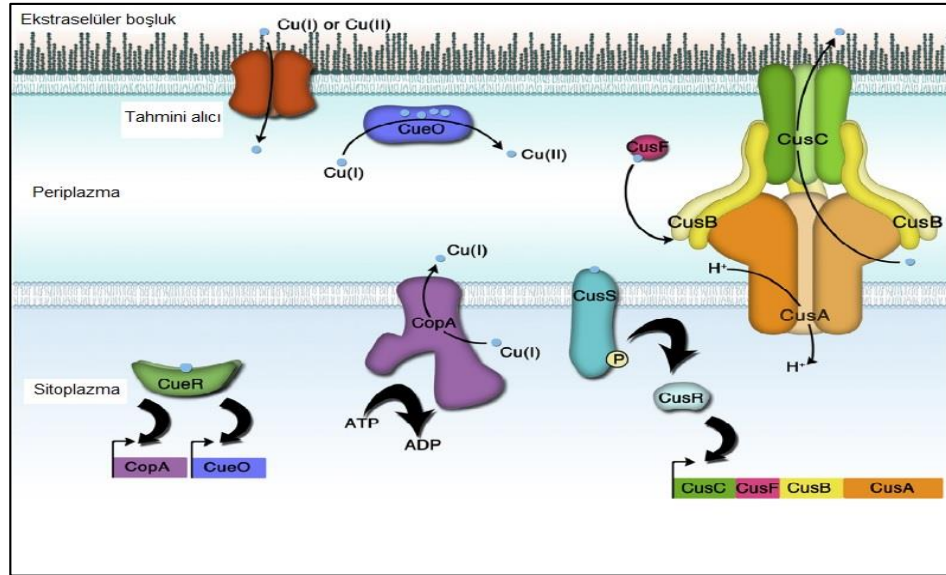
2.3.1 CusS/ CusR iki bileşikli fosforlama sistemi

Bakır (Cu), bakterilerde birçok solunum sisteminde ve metabolizmada görev alan enzimler için esansiyel bir metal olmasına, dioksijen ve reaktif oksijen türlerinin zararlarının azaltılmasında bir rol oynamasına rağmen fazlalığı oldukça toksik olan bir metaldir. Toksik özelliği nedeni ile tarımsal alanlarda birçok antifungal ve antibakteriyel

kimyasalın yapısında kullanılmaktadır. Aynı zamanda bakır yıllardır klinik ve klinik olmayan mikroorganizmaların baskılanmasını sağlayan antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden Cu toksisitesinden korunmak için bakteriler bir homeostatik mekanizmaya sahiptirler (Gudipaty, vd., 2012).

Escherichia coli'de, hücrelerden fazla bakırın detoksifikasyonunda görevli iki tane kromozomal sistem olarak Cue ve Cus sistemlerinin olduğu belirlenmiştir. Bu sistemlerden ilki cue sistemi olup, *copA* ve *cueO* genlerini Cu düzenleme proteini olan CueR'nin regüle ettiği sistemdir. Diğeri ise CusSR iki bileşikli fosforlama sistemidir. Bu iki bileşikli fosforlama sistemi Cu konsantrasyonuna göre CusCFBA genlerini kontrol ederek hücrenin Cu toksisitesinden korunmasında görev alır. (Munson, vd., 2000; Petersen ve Moller, 2000; Stoyanov, vd., 2001; Grass ve Rensing, 2001; Rensing ve Grass, 2003). Bu *CusCFBA* genlerinin ürünleri *E.coli* de ABC grup translokasyonu ile periplazmadan bakırın taşınmasında görevlidir. CusA sitoplazmik membranda bulunur ve bakırı dışarı atan pompa merkezidir. CusC periplazma ile ekstraselüler boşluk arasında bağlantı sağlar ve bakır iyonlarının geçebileceği bir yol sağlar. CusB, cusC ve CusA'yı birbirine bağlayan bir sıkıştırma proteinidir. *cusF* ise *cusCBA* effluxundan bağımsız periplazmada bakır iyonunu bağlayan küçük metalloşaperon proteinidir. (Larsen, 2011).

CusSR aynı zamanda gümüş tarafından da indüklenerek gümüşe karşı korunmada da rol oynar. İki sistemin aerobik ve anaerobik şartlarda farklı çalıştıkları belirlenmiştir (Outten, vd., 2001). Düşük ve orta düzeydeki bakır toksisitesinde *cue* sistemi, yüksek bakır düzeylerinde ise *cus* sistemi devreye girmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmada zarf stres cevabını düzenleyen CpxR-CpxA ikili sisteminin bakır homeostatik genlerin düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir (Yamamoto ve Ishihama, 2006). İki bileşikli fosforlama sistemlerinin çapraz düzenlemelerde rol aldığı düşünüldüğünde bu sistemin antibiyotik gibi kimyasal maddelere karşı direnç gösterilmesinde görev alabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sıcaklık, pH ve diğer stres koşullarında nasıl tepki gösterdiği bilinmemektedir.



Şekil 2.2. *E. coli* de bakır homeostaz mekanizması (Kim, vd., 2011).

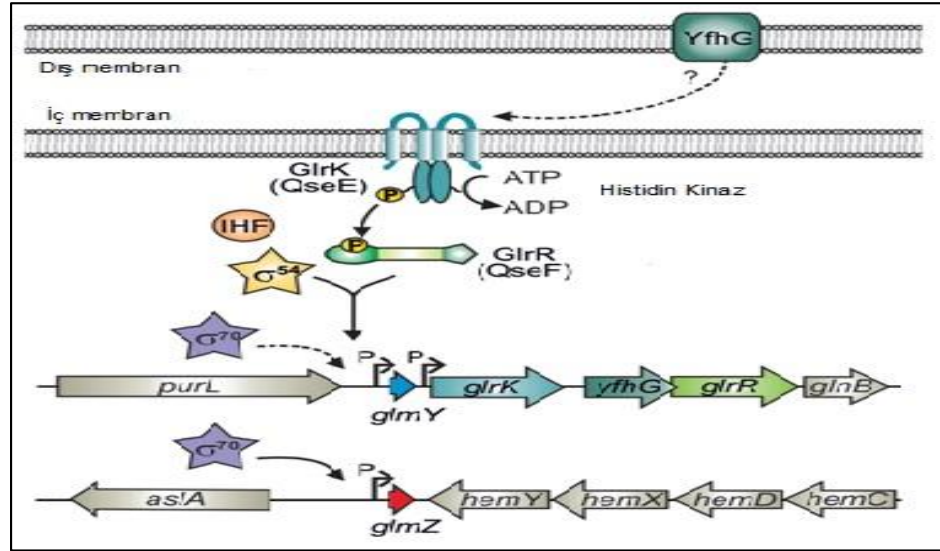
2.3.2 YfhA/ YfhK iki bileşikli fosforlama sistemi

YfhA-YfhK iki bileşikli fosforlama sisteminin fonksiyonları ile ilişkili henüz net bir bilgi tespit edilememiştir. Ancak literatürdeki bazı bilgilere göre YfhA ve YfhK iki bileşikli fosforlama sistemlerinin alternatif sigma faktörleri ve küçük RNA'lar ile ilişkili oldukları saptanmıştır. Son araştırmalarla *E. coli* 'de amino şeker metabolizmasının GlmY ve GlmZ sRNA'ları tarafından post transkripsiyonel düzeyde kontrol edildiği ortaya konmuştur. GlmY ve GlmZ küçük RNA'ları Enterobacteriaceae ailesinde GlmS enzim sentezinin feedback mekanizmasını düzenleyen kaskadı oluşturur (Göpel, vd., 2011). Reichenbach vd. (2009) yaptıkları çalışmalarda GlmY transkripsiyonunun σ 54-bağımlı promotörün aktivasyonu ile artırılabilirdiğini ve bu aktivasyonu GlmY'nin downstream de bulunan ikinci bir aktivatör YfhA ve YfhK iki bileşikli sistemi ile kodlandığını bulmuşlardır. Cevap regülatörü YfhA'nın σ 54 etkileşim modülü içerdiğini ve üç korunmuş bölgeye bağlanarak glmY transkripsiyonunu aktive ettiğini saptamışlardır ve bu nedenle işlevi bilinmeyen bu iki bileşenli sistemin adının değiştirilmesi önerisinde bulunmuşlardır. İlgili genlerin *glrK* ve *glrR* olarak yeniden adlandırılmasını önermişlerdir (Reichenbach, vd., 2009). Aynı zamanda bu genler literatürde QseE ve QseF olarak da bilinmektedir (Göpel, vd., 2014).

Flamez vd. (2007), Enterobacteriaceae ailesine ait *Yersinia pseudotuberculosis* ile yapmış oldukları çalışmalarında *yfhA* mutantının hidrojen peroksite yüksek oranda

duyarlı ve polimiksin B antibiyotiğine ise dirençli olduğunu bulmuşlardır (Flamez, vd., 2007).

Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'le yapılan başka bir çalışmada ise katekol siderofor olan bacillibactin sentezinde Fe^{+3} 'ün hücreye alımında *yfhA* geninin bir rolünün olduğu saptanmıştır (Yu ve Ye, 2016).



Şekil 2.3. Tahmini yfhA/yfhK iki bileşenli sistem mekanizması (Göpel, vd., 2014).

Bu çalışma kapsamında 2 tane iki bileşikli fosforlama sisteminin farklı stres şartlarında rolleri araştırılmıştır. Özellikle hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan yfhA-yfhK iki bileşikli fosforlama sisteminin bir fonksiyonunu tespit etmek literatürel bilgi açısından oldukça önemlidir.

3. MATERYAL METOD

3.1 Kullanılan *E. coli* Suşları

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* yabancı tip ve mutant suşları yurt dışından temin edildi (Japon Ulusal Genetik Merkezi). Elde edilen suşlar ve bu çalışmada yapılan suşlar Çizelge 3.1' de gösterildi. Yurt dışından temin edilen bu suşların antibiyotik dirençleri PZR ile doğrulandı. %20 gliserol (Merck) içeren LB stokları hazırlandı ve -80 °C'de derin dondurucuda (Panasonic) saklandı.

3.2 Besiyerleri

3.2.1 Nutrient agar besiyeri

Besiyeri yaşam deneylerinde koloni sayımı için kullanıldı. 20 g Nutrient agar (Merck) 1 L distile suda eritilerek 121 °C' de 15 dk otoklavda (Nüve) steril edildi.

3.2.2 Nutrient broth besiyeri

Nutrient brot besiyeri, bakteri kültürlerinin üreme ortamı olarak kullanıldı. 8 g Nutrient brot (Merck) tartılarak 1 L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.3 LB agar besiyeri

Transdüksiyon, transformasyon deneylerinde ve mutant suşların +4°C' de buzdolabında saklanmasında kullanıldı. 25 g LB (Merck) ve 15 g agar (Merck) tartılarak 1L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.4 LB broth besiyeri

Transdüksiyon ve transformasyon deneylerinde kullanıldı. 25 g LB tartılarak 1L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.2.5 Soft agar

Transdüksiyon deneyinde kullanıldı. 1 g tripton (Merck), 0,5 g yeast extract (Merck), 0,6 g KCl (Merck), 0,7 g agar tartılarak 100 ml distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi. Elle tutulabilir sıcaklığa geldiğinde 1ml % 50' lik glukoz (Riedel-de haén) çözeltisi ve 0,2 ml 1M CaCl₂ (Merck) eklendi.

3.2.6 DM agar

Transdüksiyon deneyinde kullanıldı. 1,4 g K₂HPO₄ (Merck), 0,4 g KH₂PO₄ (Merck), 0,1 g Na₃C₆H₅O₇ (Merck), 0,2 (NH₄)₂SO₄ (Merck), 3 g agar tartılarak 200 ml distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C’ de 15 dk otoklav ile steril edildi. Elle tutulabilir sıcaklığa geldiğinde 0,4 ml 1M MgSO₄ (Merck), 0.8 ml % 50’ lik glukoz çözeltisi, 2 ml 10 mM FeSO₄ (Merck), 0,2 ml 20 mg/ml tiamin (Sigma) ve uygun antibiyotik eklendi petrilere dökülerek hazırlandı.

3.2.7 SOB medium

Transformasyon deneyinde kullanıldı. 4 g bacto tryptone (BD), 1 g yeast extract, 0,4 ml 5M NaCl (Emsure), 0,25 ml 2M KCl 200 ml distile suda eritildi ve pH metre ile (Ohaus) pH 7’ ye ayarlandı. Daha sonra 121 °C’ de 15 dk otoklav ile steril edildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *E. coli* yabancı tip ve mutant suşları.

Suş numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Yabancı tip	Lab stok
JW2538	BW25113 <i>yfkA::km</i>	Keio Koleksiyonu
JW5407	BW25113 <i>yfhK::km</i>	Keio Koleksiyonu
JW5082	BW25113 <i>cusS::km</i>	Keio Koleksiyonu
JW0560	BW25113 <i>cusR::km</i>	Keio Koleksiyonu
OK100	W3110 <i>yfkA::km</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK101	W3110 <i>yfhK::km</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK102	W3110 <i>cusS::km</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK103	W3110 <i>cusR::km</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK104	W3110 <i>yfkA::km pnt3::yfhA</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK105	W3110 <i>yfkK::km pnt3::yfhK</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK106	W3110 <i>cusS::km pnt3::cusS</i>	Bu çalışmada yapıldı
OK107	W3110 <i>cusR::km pnt3::cusR</i>	Bu çalışmada yapıldı
Plazmitler		
b2554	<i>pnt3:yfhA</i>	Mobil Plazmit
JW5407	<i>pnt3:yfhK</i>	ASKA Klone
JW5082	<i>pnt3:cusS</i>	ASKA Klone
JW0560	<i>pnt3:cusR</i>	ASKA Klone

3.2.8 SOC medium

Transformasyon deneyinde kullanıldı. Bir örnek için 1,96 ml steril SOB medium içerisine 20 µl 2M Mg (Merck) ve 14,4 µl % 50' lik glukoz çözeltisi eklenerek hazırlandı.

3.3 *Escherichia coli* W3110 Mutantlarının Eldesi

Keio koleksiyondan elde edilen Çizelge 3.1'de verilen *E. coli* BW25113 suşlarından hedef 4 gen bölgesi yabancı tip *E. coli* W3110'a Sato vd. (2000) nin kullandığı P1kc fajı ile transdüksiyon metodu kullanılarak aktarıldı ve bu şekilde çalışmada kullanılan 4 mutant *E. coli* W3110 da elde edilerek kullanıldı.

3.3.1 P1kc fajı ile transdüksiyon

4 ml LB brot içerisine 1M CaCl₂'den final konsantrasyonu 2.5 mM olacak şekilde ve 25 mg/ml olarak hazırlanmış kanamisin (Sigma) antibiyotiğinden final konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde eklendi. Çizelge 3.1'de verilen JW kodlu yfhA, yfhA, cusS ve cusR suşlarından besiyerlerine tek koloni ekim yapıldı ve O.D₆₀₀ değeri 0,4-0,45 absorbansa gelene kadar 37 °C çalkalamalı inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında O.D₆₀₀ değeri 0,4- 0,45 olan bakteriden steril bir cam tüp içerisine 0,2 ml bakteri ve 10 µl P1kc fajından konuldu. 37 °C' de 20 dk inkübatörde (nüve) ekletildikten sonra üzerine yaklaşık 50 °C olan soft agardan 2,5 ml ve %50'lik glukozdan 25 µl eklendi ve karıştırıldı daha sonra LB agar üzerine dökülerek petrinin yüzeyine yayıldı. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası petriye 2ml LB brot ve 2-3 damla kloroform (Merck) eklendi. Daha sonra 2 saat boyunca 4 °C' de aralıklarla çalkalanarak bekletildi. 1,5 ml' lik ependorflara petrideki sıvı bakteri kültüründen 1 ml alındı ve üzerine 50 µl kloroform eklenerek 12000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant(P1kc) +4 °C' de saklandı.

P1kc fajını elde ettikten sonra 5 ml LB brot içerisine yabancı tip *E. coli* W3110 suşundan tek koloni ekim yapıldı. O.D₆₀₀ değeri 0,3' e gelene kadar 37 °C' de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1,5 ml' lik ependorflara 1 ml aktarıldı ve 10000 rpm' de 10 dk 0 °C' de santrifüj (Termal) edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml yıkama tamponu eklendi ve tekrar 10000 rpm' de 10 dk 0 °C' de santrifüj edildi. Yine supernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml yıkama tamponu eklendi.

Alıcı hücre olan yabancı tip *E.coli* W3110 içerisine uygun oranda P1kc fajı eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakikadan fazla bekletildi. Vortex (Wisemix) yapılarak 12000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 0,1 ml yıkama tamponu eklendi. Km' li DM agar üzerine hücreler aktarıldı. DM agar sıvıyı absorbe edene kadar oda sıcaklığında bekletildi. 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üreyen bakteriler DM agardan Km' li LB agara seçilerek aktarıldı. 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Km'li LB agarda üreyen bakteriler tekrar Km-Xgal-IPTG içeren LB agara ekildi ve 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından üreyen kolonilerden mavi renk verenler seçildi ve Çizelge 3.3'de verilen primerler ile PZR doğrulaması yapıldı.

3.4 Yıkama Tamponu

Transdüksiyon deneyinde kullanıldı. Steril olarak bulunan 9,88 ml LB brot, 0,1 ml % 50' lik glukoz çözeltisi ve 20 µl CaCl₂ karıştırıldı.

3.5 Transformasyon

3.5.1 Plazmid izolasyonu

Çizelge 3.1' de verilen plazmidlerden ayrı ayrı 5 ml' lik LB broth içerisine tek koloni ekimi yapıldı. Çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elde edilen bakteri kültürleri ayrı ayrı 5 adet, 1,5 ml' lik ependorf içerisinde 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Plazmid izolasyonu İnvitroGen Purelink Quick Mini Prep plazmid izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Ticari olarak elde edilen kitin prosedürü kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidin bir kısmı miktar tayini için kullanıldı ve elde edilen plazmidler -20°C' de saklandı.

3.5.2 Miktar tayini

5 µl izole edilen plazmid 1 µl yükleme boyası ile boyandıktan sonra agaroz jelde yürütülerek (Clever) jel görüntüleme cihazında görüntülendi. Bant büyüklükleri ve kalınlığı GeneRuler marka DNA Ladder mix (Thermo) markera bakılarak karşılaştırıldı ve non-kuantitatif olarak miktarı belirlendi.

3.5.3 Transformasyon

2 ml LB brot içerisine 25 mg/ml km' den 2 µl eklendi ve ardından çalışmada yapmış olduğumuz Çizelge 3.1' de verdiğimiz W3110 mutantlarının bu besiyerine ayrı ayrı ekimi yapıldı. 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakılarak transformasyon için ön kültür hazırlandı.

Ertesi gün steril 9.9 ml SOB medium üzerine steril 100 µl 2 M Mg⁺², 10 µl 25 mg/ml km ve hazırlanan ön kültürden 50 µl eklenerek O.D₆₀₀ değeri 0,3' e gelene kadar 37 °C' de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı.

Aseptik koşullarda hücreler steril 10 adet santrifüj tüpüne aktararak 5 dk buzda soğutuldu. 12000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Supernatantlar atıldı. 2 santrifüj tüpüne 1 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ eklenerek 10 ayrı santrifüj tüpündeki peletler 2 ayrı santrifüj tüpüne toplandı. Yeniden süspansiyon edilerek 10 dk buzda bekletildi. 12000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüp başına 0,1 M soğuk 200 µl CaCl₂ eklendi. Daha sonra yeniden süspansiyon edildi. 30 dk buzda bekletildi.

1,5 ml 2 adet steril santrifüj tüpünde bulunan 200 µl kompetent hücre üzerine 10-100ng olacak şekilde 2 farklı konsantrasyonda plazmit konularak 30 dakikadan fazla buzda bekletildi. Daha sonra hücre süspansiyonları cam tüpe aktarıldı. 42 °C' de 2 dk ısı şoku uygulandı ve 2 dk buzda bekletildi. 0,8 ml SOC medium eklenerek 37 °C' de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Transfer hücrelerinin 0,5ml'si 1,5 ml' lik ependorflara alındı. 5000 rpm 1 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 100 µl SOC medium eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Uygun antibiyotik içeren LB agar üzerine yayıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.6 Primer Sulandırma

10 mM Tris-HCl (Merck) 1 mM EDTA (Sigma) ile hazırlanan pH 7,5 TE kullanıldı. +4°C' de saklanan primerler çıkarıldı. pH 7,5 TE' den nanomolüne göre 10 kat sulandırıldı. 5-10 dakika çözünmesi beklendi ve daha sonra mini spin atırıldı. 10 µl bir ependorfa alındı ve 90 µl 10mM pH 7,5 Tris-HCl eklendi. -20°C' de dondurucuda saklandı.

3.7 Koloni PZR

Transdüksiyon ve transformasyon sonrasında elde ettiğimiz mutantların doğrulamasında koloni PZR yöntemi kullanıldı. Bunun için elde edilen mutantlar 20 µl

distile su içinde süspansiyon edildi ve 2,5 µl si 0,2ml'lik PZR tüpüne konuldu. Bakteri süspansiyonu üzerine Çizelge 3.2 deki reaksiyon karışımından 7,5 µl dağıtıldı. Her bir genin doğrulaması için uygun primerler de Çizelge 3.3'de gösterildi.

PZR reaksiyonu hazırlandıktan sonra Çizelge 3.4' deki reaksiyon döngü koşullarına göre PZR yapıldı.

Çizelge 3.2. Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.

10x ThermaPol Reaksiyon Buffer(Biolab)	1,0 µl
10mM dNTP Mix	0,2 µl
10µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
2mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µl
0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µl
dH ₂ O	4,65 µl
Bakteri süspansiyonu	2.5 µl
Total	10 µl

Çizelge 3.3. Transdüksiyon ve transformasyon doğrulaması amacıyla PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Evrensel K1 geri primeri	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'
W3310:: <i>yfhA</i> ileri primeri	5' TGGATACATTGCGCCAGCAA 3'
W3310:: <i>yfhK</i> ileri primeri	5' CGAATGACGCACAACAAGGT 3'
W3310:: <i>cusS</i> ileri primeri	5' TATGCCGCCAACTTTACTCG 3'
W3310:: <i>cusR</i> ileri primeri	5' GTAGCTTCCCAGCAACAGTT 3'
pnt3:: <i>yfhA</i> ileri primeri SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
pnt3:: <i>yfhA</i> geri primeri 21M13	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'
pnt3:: <i>yfhK</i> ileri primeri	5' GCCAAACGCTGGCCCGTTTTTCC 3'
pnt3:: <i>yfhK</i> geri primeri	5' CCTTTCGTGTTTTTCGACGACGG 3'
pnt3:: <i>cusS</i> ileri primeri	5' GCCGTCAGTAAGCCATTTTCAGCG 3'
pnt3:: <i>cusS</i> geri primeri	5' CCAGCGGGTAATGTGATAACAAA 3'
pnt3:: <i>cusR</i> ileri primeri	5' GCCAAACTGTTGATTGTGGAAGA 3'
pnt3:: <i>cusR</i> geri primeri	5' CCCTGACCATCCGGCACCTCAAG 3'

Çizelge 3.4. PZR (Thermo) döngü koşulları.

94 °C	3dk	1 döngü
94 °C	1dk	30 döngü
58 °C	1dk	
72 °C	1,5dk	
4 °C	10dk	1 döngü

3.8 Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik agaroz hazırlamak için 1 g agaroz (Sigma) ve 100 ml 1x TBE kullanıldı. Mikrodalga'da ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Üzerine 10 mg/ml EtBr (Sigma) stoğundan 1 µl EtBr eklendi. Elektroforez cihazının tankına hazırlanan agaroz jeli döküldü. Donduktan sonra 5 µl DNA 1 µl loading dye (Sigma) ile karıştırılarak jele yüklendi.

3.9 TBE Hazırlama

10x TBE hazırlamak için 54 g TRİS (Ultrapure), 0,5 M pH 8 EDTA 20 ml, 27,5 g borik asit (Merck) kullanıldı. Üzerine 500 ml saf su eklendi.

3.10 TE Hazırlama

1 M Tris-HCl' den final konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde 2ml, 0,5 M EDTA'dan final konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde 400 µl konuldu ve üzerine 200 ml saf su eklendi.

3.11 Tris-HCl Hazırlama

1M Tris-HCl hazırlamak için 15,76 g/mol Tris-HCl tartılıp üzeri 100 ml distile su ile tamamlanır.

3.12 X-gal Hazırlama (5-brom-4klor-3indol-beta-D-galaktopironosid)

X-gal (Sigma), 20 mg/ml olacak şekilde hazırlanıldı. 100 mg X-gal 5ml DMF (dimetilformamit)'de çözüldü. 1,5ml'lik ependorflara 1'er ml konularak etrafı folyolandı ve daha sonra -20 °C' de saklandı.

3.13 IPTG Hazırlama (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid)

IPTG (Sigma) 0,1 M olarak hazırlandı. 0, 238 g IPTG ile 9,9 ml saf su çözdürüldü. Daha sonra filtre edilerek steril edildi. 1,5ml'lik ependorflara 1'er ml aktarıldı. Etrafı folyolonarak -20 °C' de saklandı.

3.14 IPTG ve X-GAL'li Besiyeri Hazırlama

0,1 M IPTG stoğundan 20 μ l ve 20 mg/ml X-gal stoğundan 40 μ l alınarak 15 ml'lik LB besiyerine eklendi.

3.15 Ringer Solüsyonu

Yaşam deneyleri sırasında bakteri dilüsyonları için kullanıldı. Ticari olarak satılan Ringer (Merck) tabletlerinden 1 tablet 500 ml saf suda çözülerek hazırlandı. 121 °C' de 15 dk otoklav ile steril edildi. 1/9 oranı göz önünde bulundurularak 900 μ l ependorflara steril olarak dolduruldu.

3.16 Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) değerlerinin belirlenmesi

Antibiyotik ve metallerin MİK değerlerinin belirlenmesi için tek bir bakteri kolonisi 5 ml nutrient broth besiyerinde 37 °C de 18 saat çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bakterilerin absorbansı 600 nm dalga boyunda 0,1'e ayarlandı. Daha sonra 60 ml'de 400 μ l olacak şekilde stok bakteri kültürü hazırlandı. Bu kültürden 96 kuyucuklu mikro plakaya ilk kuyucuk 180 μ l diğer kuyucuklar 100 μ l olacak şekilde kültür eklendi. 180 μ l'lik kuyucuğa projede yer alan antibiyotik ve metallerden 20 μ l eklenerek seri sulandırma yapıldı. Plakalar 37 °C de 24 saat inkübe edildi ve MİK değerleri belirlendi.

3.17 Yaşam Deneyinde Kullanılan Metallerin Hazırlanması

CoCl₂, CuSO₄ ve ZnSO₄ metalleri minimal inhibisyon değerlerinin belirlenmesi ve yaşam deneylerinde fosfat tampon içerisine atılmak üzere 0,2 M olacak şekilde moleküler ağırlıklarına göre hazırlandı ve filtre yardımı ile steril edildi.

3.18 Yaşam Deneyinde Kullanılan Antibiyotiklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan 0,1 mg/ml kanamisin antibiyotiği stoğunu hazırlamak için 10 mg kanamisin antibiyotiği 10 ml saf suda çözdürüldü. 0,1 mg/ml tetrasiklin antibiyotiği stoğu için 10 mg tetrasklin antibiyotiği 10 ml saf suda çözdürüldü.

0,1 mg/ml streptomisin antibiyotiği stoğu için 10 mg streptomisin antibiyotiği 10 ml saf suda çözdürüldü ve filtre ile steril edildi. -20 °C' de saklandı.

3.19 Yaşam Deneyinde Kullanılan NaCl Hazırlanması

Osmolarite deneylerinde kullanılmak üzere 5M NaCl hazırlamak için 10g NaCl 50ml distile suda çözdürüldü ve filtre yardımı ile steril edilerek hazırlandı.

3.20 Fosfat Tampon Hazırlanması

Tamponlar 0.5 M Na₂HPO₄ (Merck) ve 0.5M NaH₂PO₄ (Merck) hazırlandı. Bunlar belirli oranlarda karıştırılarak 10 mM pH 5.5, pH 7 ve pH 8.5 tamponlar hazırlandı.

3.21 Yaşam Deneyleri

+4 °C' de buzdolabında muhafaza edilen petrilere tek koloni bakteri 20 ml' lik Nutrient Brot besiyeri içeren erlenlere ekildi. 37 °C' de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bakterilerin spektrofotometrede OD₆₀₀' de yoğunluğu ölçüldü. Bakterilerin yoğunluğu OD₆₀₀'de 1.0 absorbansa ayarlanarak 1,5 ml'lik ependorflara 1 ml alındı ve 10.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, 2 kez ringer ile yıkanarak süspansiyon edilen bakteri tekrar santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından supernatant kısım ependorftan tekrar uzaklaştırıldı ve ependorfa 1 ml ringer çözeltisi eklendi. Daha sonra bakteriler tekrar süspansiyon edildi. Süspansiyon halindeki ependorftan 100 µl bakteri alındı ve 50 ml pH 5.5, pH 7.0 ve pH 8.5 tamponlarını içeren farklı erlenlere ayrı ayrı ilave edildi. Metaller ve antibiyotiklerle yapılacak olan yaşam deneyi için de pH 7.0 tamponunda MİK değerlerinin yarı konsantrasyonu olacak şekilde antibiyotikler ve metaller eklendi. Ayrıca osmolarite deneyleri için 0.2 M, 0.1 M ve 0.01 M NaCl'li pH 7 tamponlar hazırlandı. Tampon-bakteri karışımından 900 µl ringer solüsyonu bulunan ependorfa 100 µl alındı ve erlenler 37 °C deki inkübatöre kaldırıldı. Erlenlerden ringer solüsyonuna alınan bakteriler 10⁴e kadar seri sulandırma yapıldı ve nütrient agar besiyerine drigalski spatülü yardımı ile yayıldı ve 37 °C bir gece inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra petrileredeki bakteri kolonileri sayıldı. Belirlenen aralıklarla tamponlardan 100 µl örnek alındı ve bakteri sayısındaki değişiklikler analiz edildi.

3.22 Komplementasyon Testleri:

Çalışmalar sonunda istatistiki olarak stres şartlarında önemli rolü olduğu belirlenen genlerin komplementasyon testleri ile doğrulaması yapıldı. Bunun için çalıştığımız gen bölgelerini taşıyan plazmitleri içeren *E. coli*'den bu plazmitler plazmit izolasyon metodu (Alkaline lizis metodu) ile izole edildi ve izole edilen plazmit elde ettiğimiz *E. coli* W3110 mutant suşlar içine transformasyon (Miller 1992) ile aktarıldı. Böylece ana kromozomda mutant olan gen bölgesi plazmit üzerinde eksprese edilerek tamamlanmış oldu. Bu şekilde mutasyona uğratılan genin tamamlanması ile stress şartlarında görevinin sağlanması yapılmış oldu.

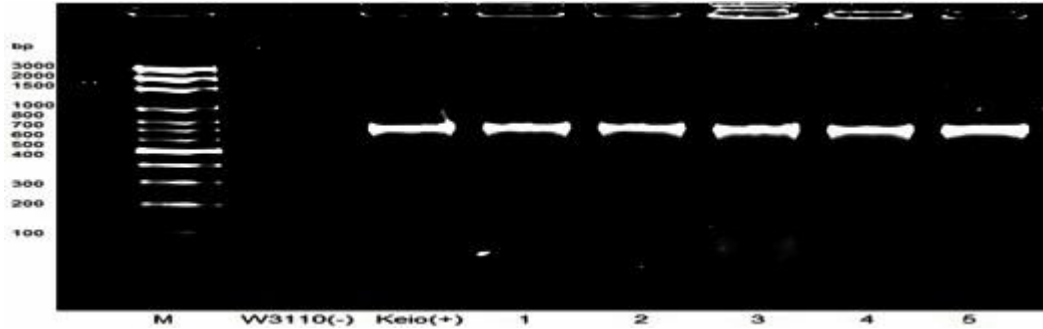
3.23 İstatiksel Analiz

Bu çalışmada *E. coli* W3110 suşunda *yfhA*, *yfhK*, *cusS* ve *cusR* olmak üzere 4 farklı gen bölgesi ile yapılan yaşam deneyleri sonuçlarının istatiksel analizi student T-Testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ sistemine göre önem derecesi belirlendi. Sonuçlar 4 bağımsız tekrarın ortalaması alınarak hesaplandı. Grafiklerdeki * işaretleri önemlilikleri ve hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

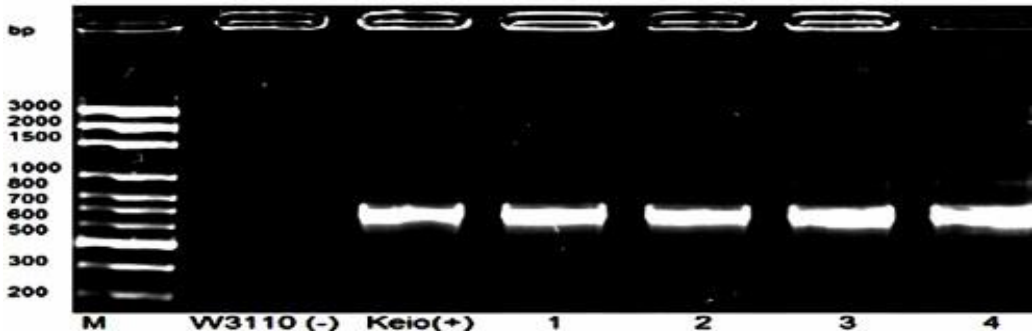
4. BULGULAR

4.1 Mutantların Elde Edilmesi

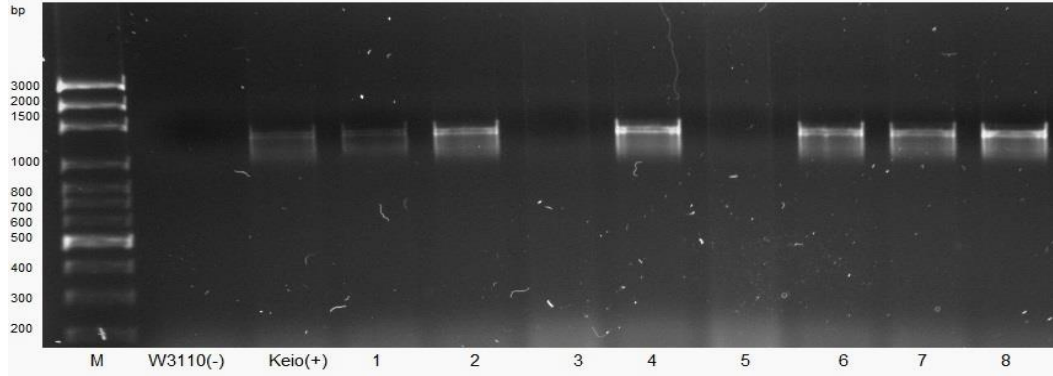
Transdüksiyon sonrasında Xgal-IPTG'li ortamda mavi koloni veren tek koloni bakteriler Km besiyerine ekildikten sonra buradan seçilen kolonilerden Çizelge 3.3' deki her bir gen için kendisine ait ileri primer ve K1 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Elde edilen mutantların PZR görüntüleri Şekil 4.1 - 4.4 da verilmiştir. Negatif kontrol olarak yabancı tip *E. coli* W3110 kullanılırken pozitif kontrol olarak her bir genin keio koleksiyondan alınan *E.coli* BW25113 suşundaki mutantlar kullanıldı. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi 1-5'e kadar olan kuyucuklarda f-k1 primerleri ile elde edilen *yfhA::km* mutanları bulunmaktadır ve 683 bp bant büyüklüğüne sahip PZR ürünü elde edilmiştir. Aynı şekilde 688 bp bant büyüklüğünde *yfhK::km* (Şekil 4.2), 1306 bp bant büyüklüğünde *cusS::km* (Şekil 4.3), 1403 bp bant büyüklüğünde *cusR::km* (Şekil 4.4) mutantları bulunmaktadır.



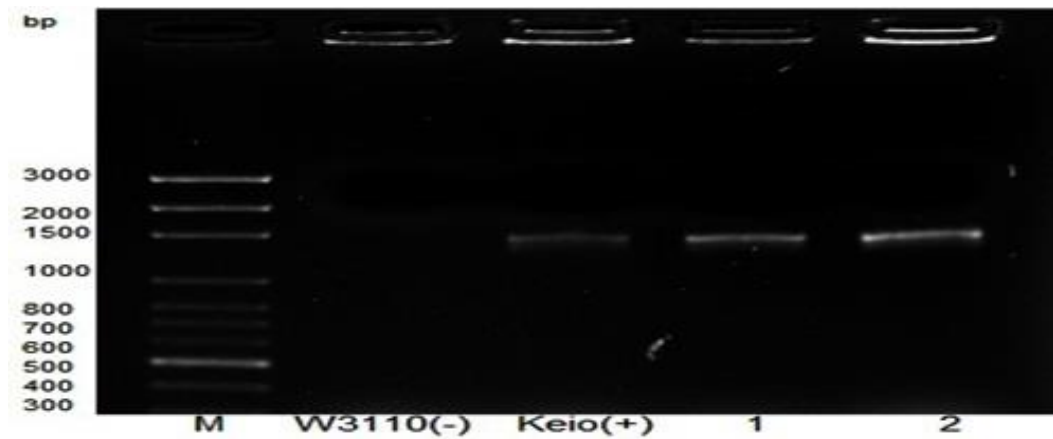
Şekil 4.1. Yabancı tip *E. coli* ve *yfhA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.2. Yabancı tip *E. coli* ve *yfhK* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



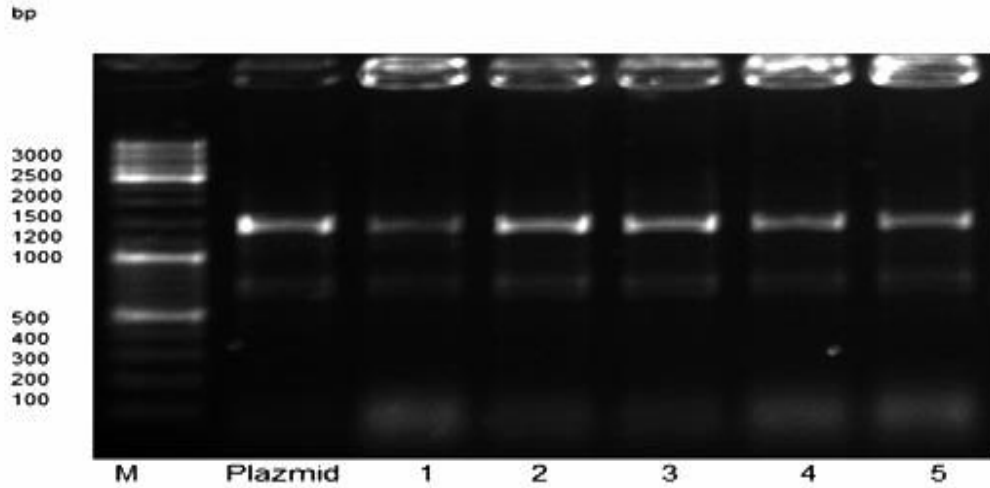
Şekil 4.3. Yabani tip *E. coli* ve *cusS* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



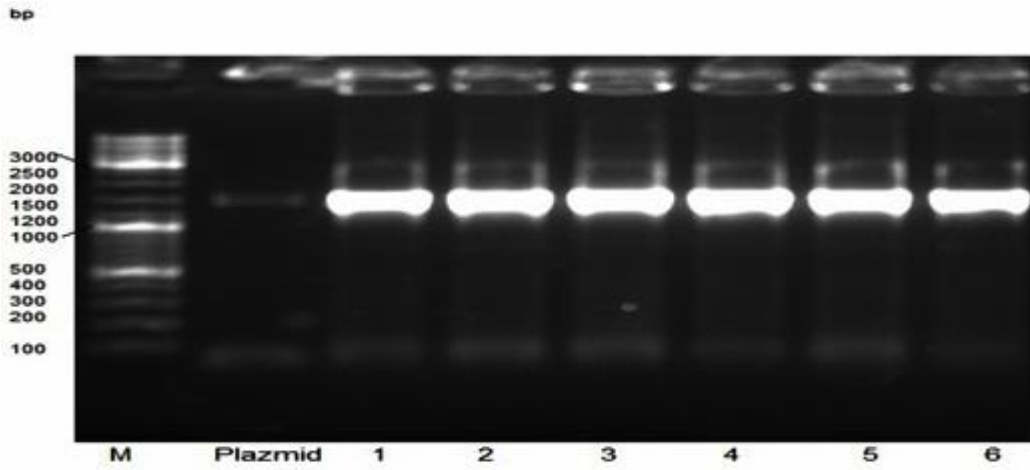
Şekil 4.4. Yabani tip *E. coli* ve *cusR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

Şekil 4.1-4.4 de elde edilen jel görüntüleri incelenerek her bir genle ilişkili bir mutant seçildi ve Çizelge 3.1' de gösterilen suş numaraları verildi. Daha sonra elde edilen saf kültürlerden -80°C ' de stoklanmak üzere gliserol stokları hazırlandı.

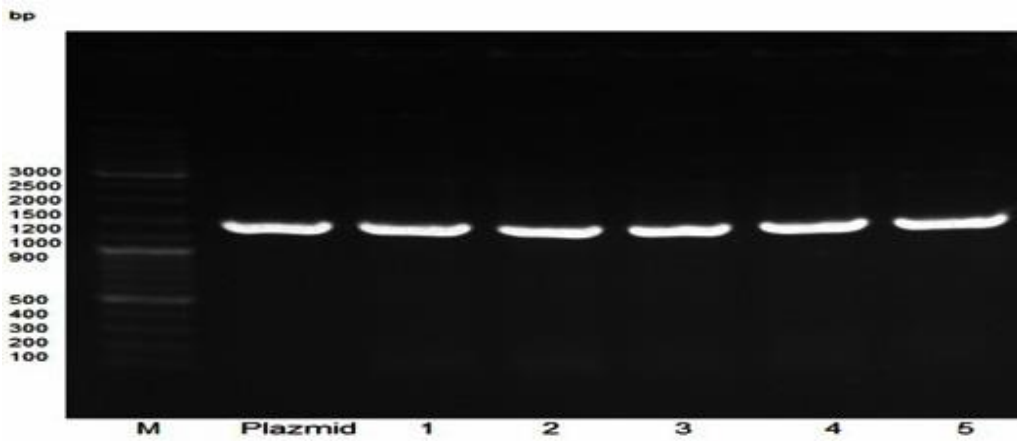
Tamamlama testleri için yukarıda elde ettiğimiz mutantlara keio koleksiyondan temin edilen ilgili genleri içeren plazmitler izole edilip transforme edildi. Transformasyon sonrasında oluşan koloniler uygun antibiyotik kontrolünün ardından PZR ile doğrulandı. Seçilen kolonilerden Çizelge 3.3' deki her bir gen için kendisine ait olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR ile doğrulama yapıldı. Elde edilen mutantların ve pozitif kontrol BW25113 plazmidinin PZR görüntüleri Şekil 4.5-4.8' de verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlardan *pnt3::yfhA* mutanı 1397 bç (Şekil 4.5), *pnt3::yfhK* mutanı 1474 bç (Şekil 4.6), *pnt3::cusS* mutanı 1489 bç (Şekil 4.7), *pnt3::cusR* mutanı 730 bç (Şekil 4.8) bant uzunluğuna sahiptir.



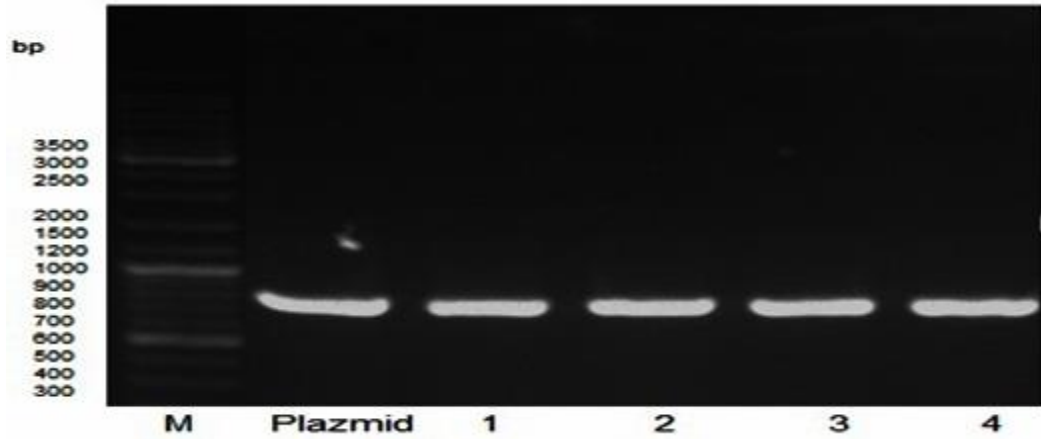
Şekil 4.5. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::yfhA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.6. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::yfhK* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.7. *E. coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::cusS* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.8. *E.coli* BW25113 plazmidi ve pnt3::cusR mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

4.2 Metaller ve Antibiyotiklerin MİK Değerleri

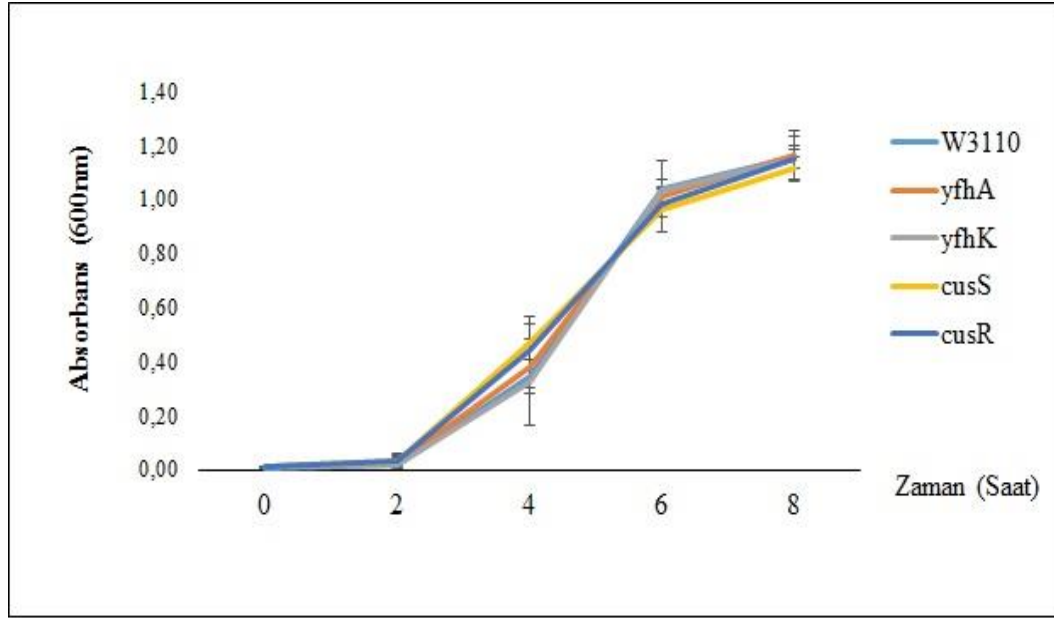
E. coli W3110 ile 3 farklı metalin ve 3 farklı antibiyotiğin minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yabani tip *E.coli* W3310 suşunda metaller ve antibiyotiklerin minimal inhibisyon değeri

Metaller ve Antibiyotikler	MİK Konsantrasyonu($\mu\text{g/ml}$)
CoCl ₂	74,35 $\mu\text{g/ml}$
CuSO ₄	234,37 $\mu\text{g/ml}$
ZnSO ₄	66,79 $\mu\text{g/ml}$
Kanamisin	1,83 $\mu\text{g/ml}$
Tetrasiklin	1,56 $\mu\text{g/ml}$
Streptomisin	0,58 $\mu\text{g/ml}$

4.3 Yabani Tip ve Mutant Suşların Büyüme Grafiği Sonuçları

Yabani tip W3110 ve mutant suşlar NB besiyerlerinde 37 °C’de optimum sıcaklık değerinde ve 160 rpm de büyümeye tabi tutulmuştur. 2 saat aralıklarla örnek alınarak OD₆₀₀ de spektrofotometrik okumalarla yabani tip ve mutantların büyümeleri arasında bir fark olmadığı ortaya konulmuştur.

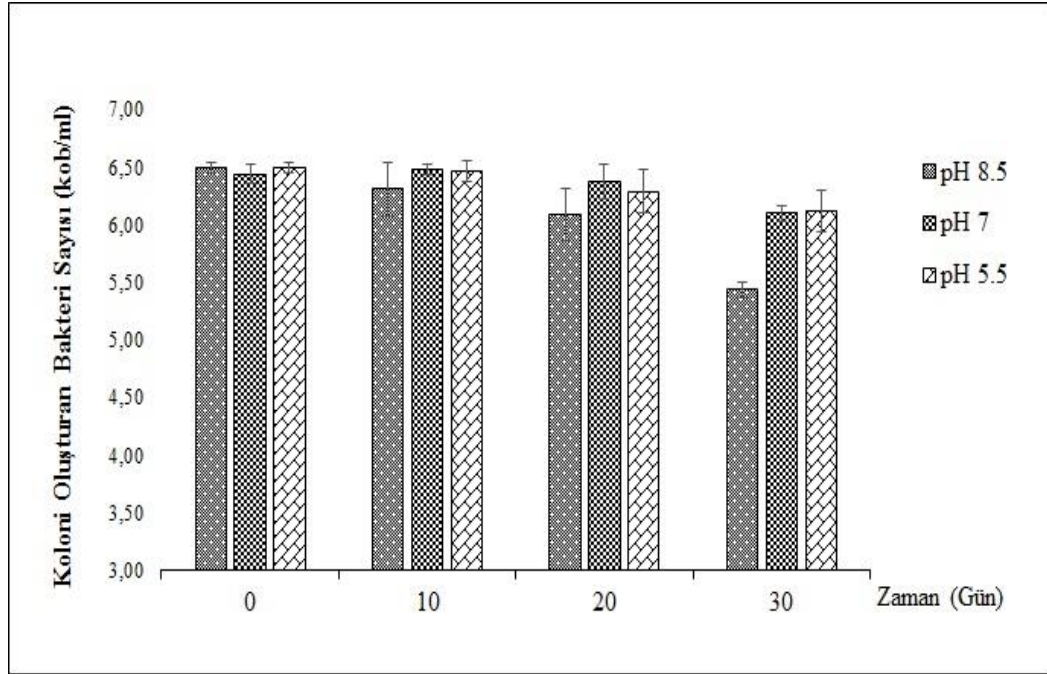


Şekil 4.9. Yabani tip ve mutant suşların büyüme grafiği.

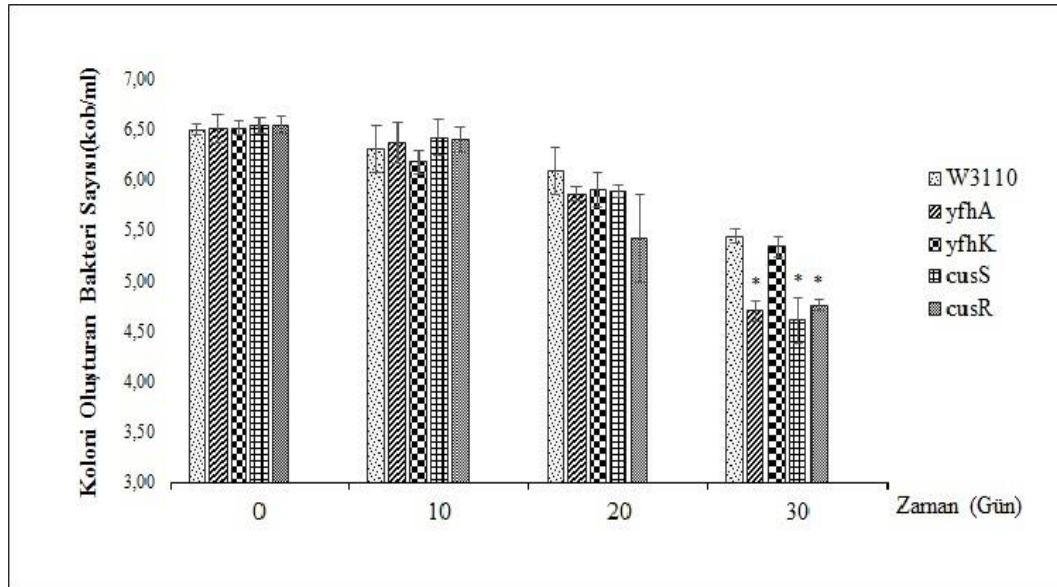
4.4 Yaşam Deneyi Sonuçları

4.4.1 İki bileşikli fosforlama sistemlerinin farklı pH lardaki rollerinin araştırılması

pH stresinde çalışılan genlerin rolünün olup olmadığı 3 farklı pH aralığı çalışılarak belirlendi. pH 8.5 de yabani tip *E.coli* W3110 57 günde 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanı 33 gün, *yfhK* mutanı 49 gün, *cusS* mutanı 31 gün ve *cusR* mutanı 34 günde 2 logaritmik azalma göstermektedir (Şekil 4.11; Çizelge 4.2). pH 7.0 de yabani tip *E.coli* W3110 t_{99} değerine göre 176 günde 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanı 142 günde, *yfhK* mutanı 132 günde, *cusS* mutanı 160 günde ve *cusR* mutanı 182 günde 2 logaritmik azalmayı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12). Aynı şekilde pH 5.5 da yabani tip *E. coli* W3110 t_{99} değerine göre 160 günde, *yfhA* mutanı 175 günde, *yfhK* mutanı 69 günde, *cusS* mutanı 88 günde ve *cusR* mutanı 34 günde 2 logaritmik azalmaya ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.13; Çizelge 4.3).



Şekil 4.10. Yabani tip *E. coli* W3110 yaşamı üzerine pH'ın etkisi.

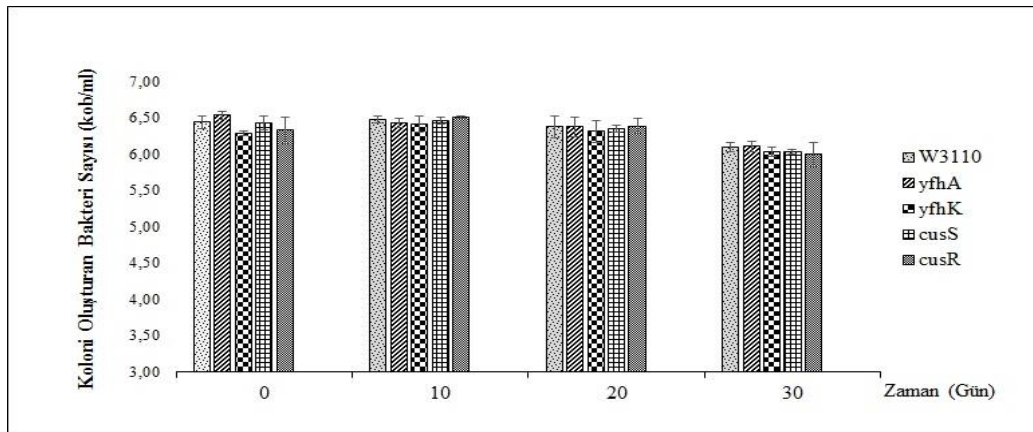


Şekil 4.11. Yabani tip *E. coli* ve mutantların yaşamına alkali pH (8.5) etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli* 'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

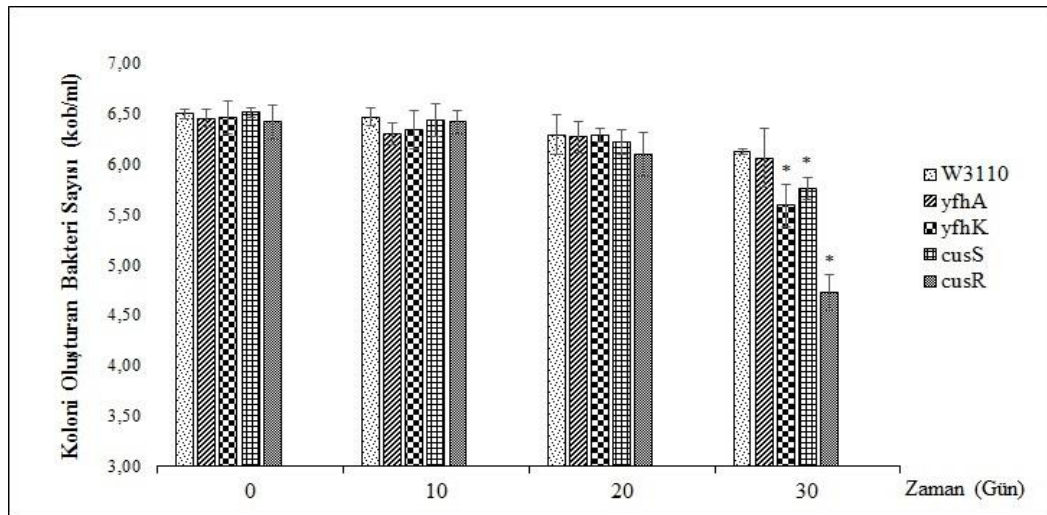
Çizelge 4.2. Alkali pH da yabani tip ve mutantların t₉₉ değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
pH 8.5	t ₉₉ (gün)	pH 8.5	t ₉₉ (gün)
W3110	57	W3110	61
<i>yfhA</i>	33	<i>yfhA</i>	59
<i>yfhK</i>	49	<i>yfhK</i>	#
<i>cusS</i>	31	<i>cusS</i>	62
<i>cusR</i>	34	<i>cusR</i>	61

İstatiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0.05$).



Şekil 4.12. Yabani tip *E. coli* ve mutantların yaşamına nötral pH (7.0) etkisi.



Şekil 4.13. Yabani tip *E. coli* ve mutantların yaşamına asidik pH (5.5) etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

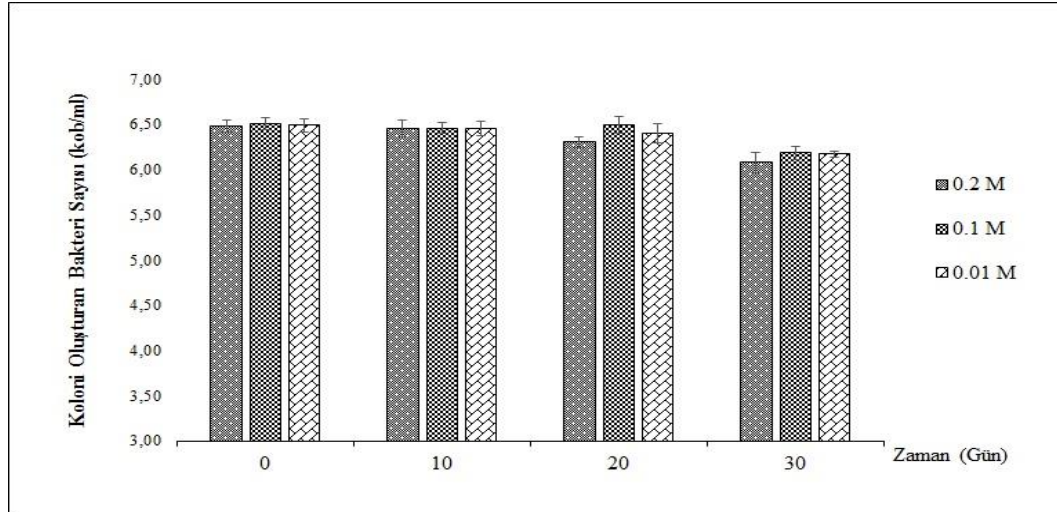
Çizelge 4.3. Asidik pH da yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
pH 5.5	t_{99} (gün)	pH 5.5	t_{99} (gün)
W3110	160	W3110	172
<i>yfhA</i>	175	<i>yfhA</i>	#
<i>yfhK</i>	69	<i>yfhK</i>	165
<i>cusS</i>	88	<i>cusS</i>	160
<i>cusR</i>	34	<i>cusR</i>	168

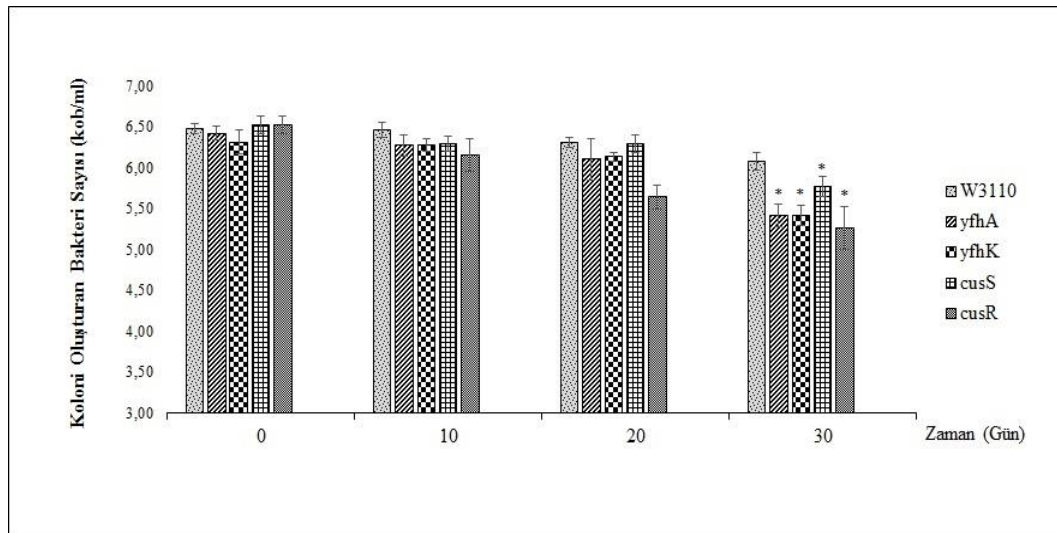
İstatiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0.05$).

4.4.2 Osmotik streste iki bileşikli fosforlama sistemlerinin rollerinin araştırılması

Osmotik strete çalışılan genlerin rolünün olup olmadığını belirlemek amacı ile yapılan deneyde pH 7.0 de 0.2 M, 0.1 M ve 0.01 M NaCl'li ortamda yaşam deneyleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.15-4.17' de gösterilmiştir. 0.2 M NaCl'li ortamda yabani tip *E. coli* W3110 t_{99} değerine göre 150 günde 2 logaritmik azalma gösterirken, *yfhA* mutanı 60 günde, *yfhK* mutanı 67 günde, *cusS* mutanı 80 günde ve *cusR* mutanı 48 günde 2 logaritmik azalma göstermektedir (Şekil 4.15; Çizelge 4.4). 0.1 M NaCl'li ortamda yabani tip *E. coli* W3110 t_{99} değerine göre 187 günde 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanı 62 günde, *yfhK* mutanı 186 günde, *cusS* mutanı 61 günde ve *cusR* mutanı 75 günde 2 logaritmik azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.16; Çizelge 4.5). Aynı şekilde 0.01 M NaCl varlığında yabani tip *E. coli* W3110 t_{99} değerine göre 187 günde, *yfhA* mutanı 173 günde, *yfhK* mutanı 186 günde, *cusS* mutanı 184 günde ve *cusR* mutanı 173 günde 2 logaritmik azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.17).



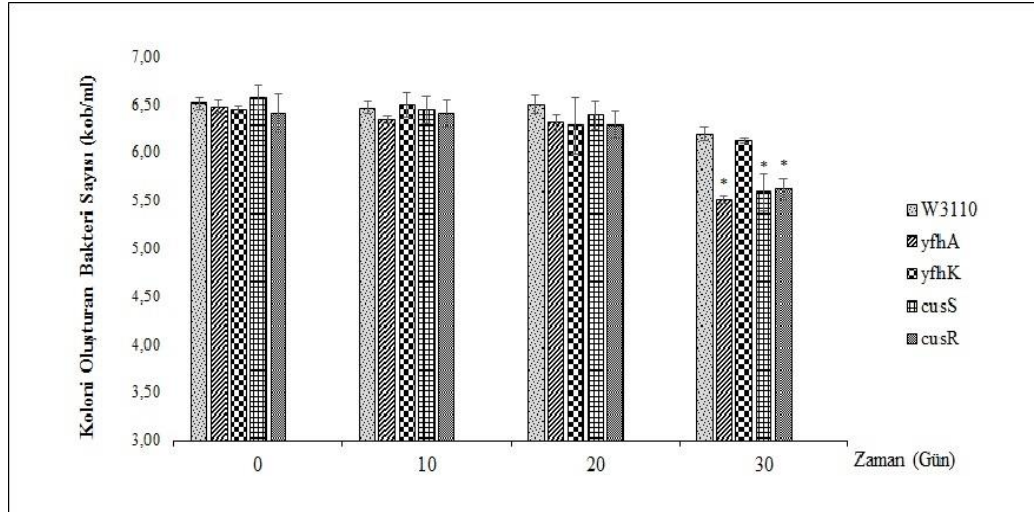
Şekil 4.14. Yabani tip *E. coli* W3110'un yaşamına osmotik stresin etkisi.



Şekil 4.15. 0.2 M NaCl'in yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli* 'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.4. 0.2 M NaCl varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
0.2 M NaCl	t_{99} (gün)	0.2 M NaCl	t_{99} (gün)
W3110	150	W3110	168
<i>yfhA</i>	60	<i>yfhA</i>	169
<i>yfhK</i>	67	<i>yfhK</i>	174
<i>cusS</i>	80	<i>cusS</i>	170
<i>cusR</i>	48	<i>cusR</i>	171

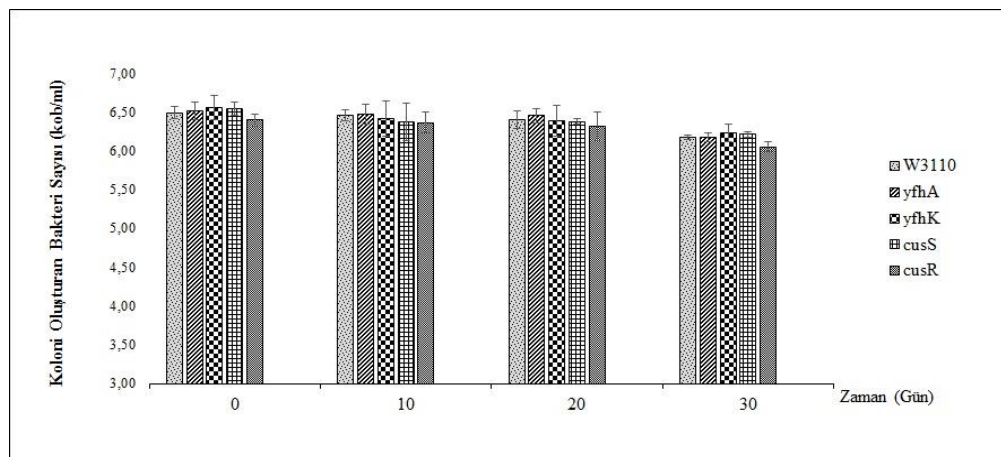


Şekil 4.16. 0.1 M NaCl'ün yabancı tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabancı tip W3110 *E. coli* 'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.5. 0.1 M NaCl varlığında yabancı tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
0.1 M NaCl	t_{99} (gün)	0.1 M NaCl	t_{99} (gün)
W3110	187	W3110	202
<i>yfhA</i>	62	<i>yfhA</i>	198
<i>yfhK</i>	186	<i>yfhK</i>	#
<i>cusS</i>	61	<i>cusS</i>	192
<i>cusR</i>	75	<i>cusR</i>	195

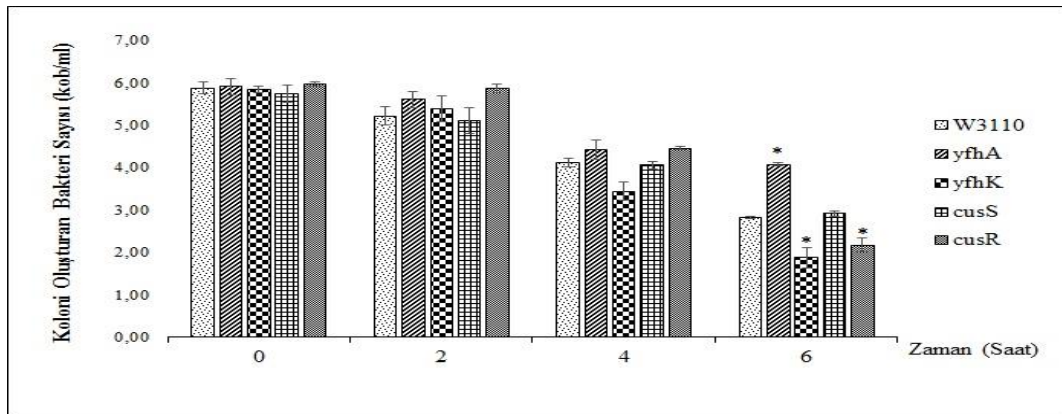
İstatistiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0.05$).



Şekil 4.17. 0.01 M NaCl'ün yabancı tip ve mutantların yaşamına etkisi.

4.4.3 Metal stresinde iki bileşik fosforlama sistemlerinin rollerinin araştırılması

Bakır metal varlığında yabancı tip *E.coli* W3110 3,9 saatte 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanıtı 6,6 saatte, *yfhK* mutanıtı 3,03 saatte, *cusS* mutanıtı 3,8 saatte ve *cusR* mutanıtı 3,1 saatte 2 logaritmik azalma göstermektedir (Şekil 4.18; Çizelge 4.6). Çinko metal varlığında yabancı tip *E.coli* W3110 t_{99} değerine göre 43,3 günde 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanıtı 18 günde, *yfhK* mutanıtı 17,3 günde, *cusS* mutanıtı 22,7 günde ve *cusR* mutanıtı 34,3 günde 2 logaritmik azalma gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.19; Çizelge 4.7). Kobalt metal varlığında ise yabancı tip *E. coli* W3110 t_{99} değerine göre 10,08 günde, *yfhA* mutanıtı 10,02 günde, *yfhK* mutanıtı 15,1 günde, *cusS* mutanıtı 9,4 günde ve *cusR* mutanıtı 9,9 günde 2 logaritmik azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.20; Çizelge 4.8).

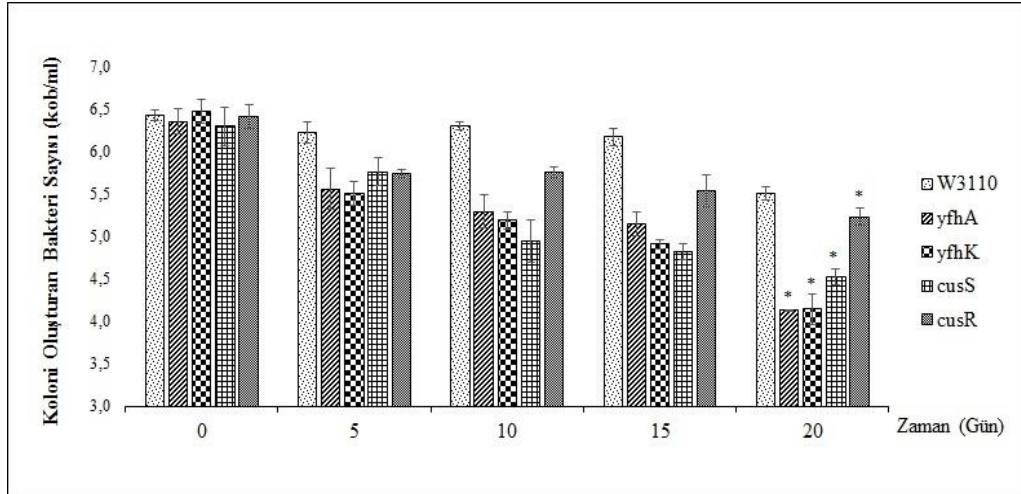


Şekil 4.18. Bakır metalinin yabancı tip ve mutanıtın yaşama etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabancı tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.6. pH 7 fosfat tamponunda bakır sülfat varlığında yabancı tip ve mutanıtın t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
MİK/2 CuSO ₄	t_{99} (saat)	MİK/2 CuSO ₄	t_{99} (saat)
W3110	3,9	W3110	3,8
<i>yfhA</i>	6,6	<i>yfhA</i>	3,9
<i>yfhK</i>	3,03	<i>yfhK</i>	3,9
<i>cusS</i>	3,8	<i>cusS</i>	#
<i>cusR</i>	3,1	<i>cusR</i>	3,9

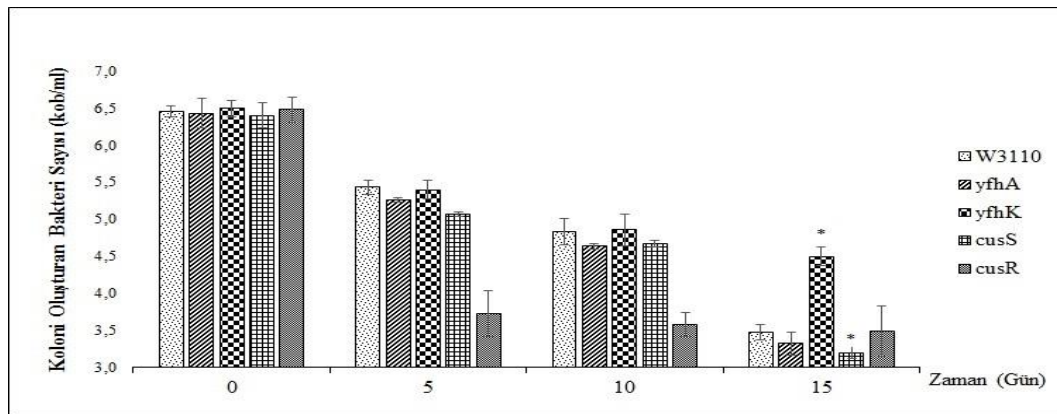
İstatiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0,05$).



Şekil 4.19. Çinko metalinin yabancı tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabancı tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p<0.05$).

Çizelge 4.7. pH 7 fosfat tamponda çinko sülfat varlığında yabancı tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
MİK/2 ZnSO ₄	t_{99} (gün)	MİK/2 ZnSO ₄	t_{99} (gün)
W3110	43,3	W3110	41,8
<i>yfhA</i>	18	<i>yfhA</i>	41,1
<i>yfhK</i>	17,3	<i>yfhK</i>	40,6
<i>cusS</i>	22,7	<i>cusS</i>	41,7
<i>cusR</i>	34,3	<i>cusR</i>	42,5



Şekil 4.20. Kobalt metalinin yabancı tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabancı tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p<0.05$).

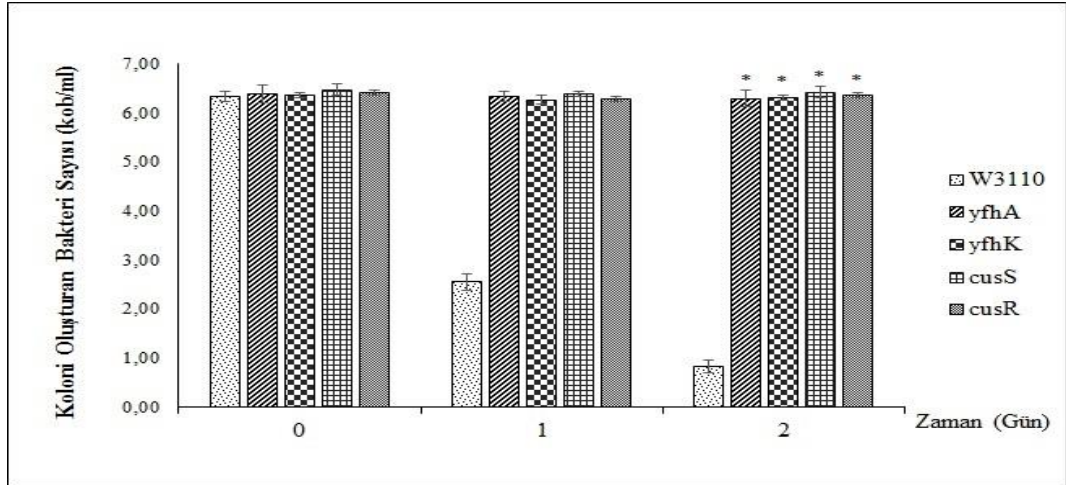
Çizelge 4.8. pH 7 fosfat tamponunda kobalt klorür varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
MİK/2 CoCl ₂	t_{99} (gün)	MİK/2 CoCl ₂	t_{99} (gün)
W3110	10,08	W3110	10,9
<i>yfhA</i>	10,02	<i>yfhA</i>	#
<i>yfhK</i>	15,1	<i>yfhK</i>	10,7
<i>cusS</i>	9,4	<i>cusS</i>	11,1
<i>cusR</i>	9,9	<i>cusR</i>	#

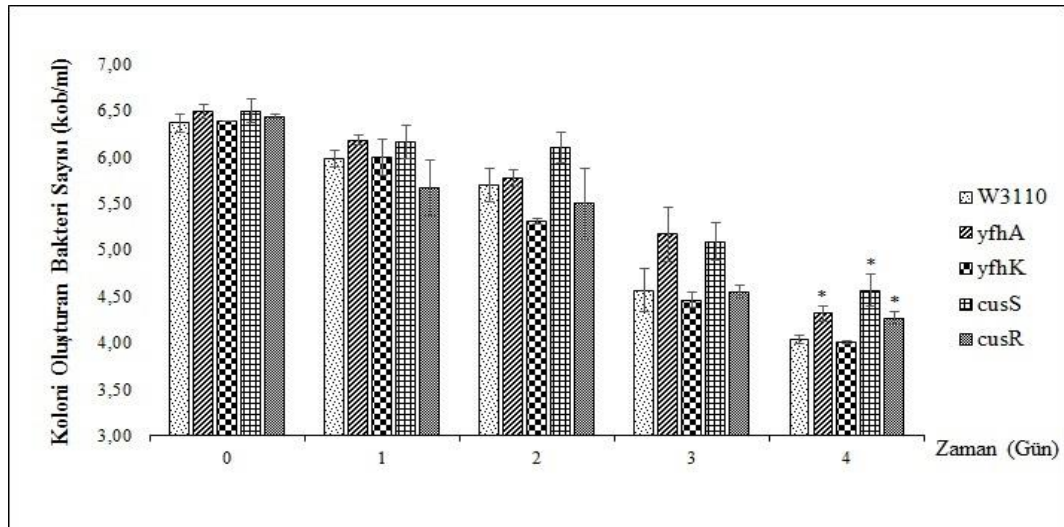
İstatiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0.05$).

4.4.4 Antibiyotik stresinde iki bileşikli fosforlama sistemlerinin rollerinin araştırılması

Kanamisin antibiyotiği varlığında yabani tip *E.coli* W3110 0,73 saatte 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanlığı 49,4 saatte, *yfhK* mutanlığı 90,9 saatte, *cusS* mutanlığı 96,4 saatte ve *cusR* mutanlığı 106,9 saatte 2 logaritmik azalma göstermektedir (Şekil 4.21). Streptomisin antibiyotiği varlığında yabani tip *E.coli* W3110 t_{99} değerine göre 3,4 günde 2 logaritmik azalma gösterirken *yfhA* mutanlığı 3,6 günde, *yfhK* mutanlığı 3,4 günde, *cusS* mutanlığı 4,2 günde ve *cusR* mutanlığı 3,7 günde 2 logaritmik azalmayı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.22; Çizelge 4.9). Tetrasiklin antibiyotiği varlığında ise yabani tip *E. coli* W3110 t_{99} değerine göre 46,1 günde, *yfhA* mutanlığı 56,6 günde, *yfhK* mutanlığı 38,03 günde, *cusS* mutanlığı 48,3 günde ve *cusR* mutanlığı 50,7 günde 2 logaritmik azalmaya ulaştığı saptanmıştır (Şekil 4.23; Çizelge 4.10).



Şekil 4. 21. Kanamisin antibiyotiğinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

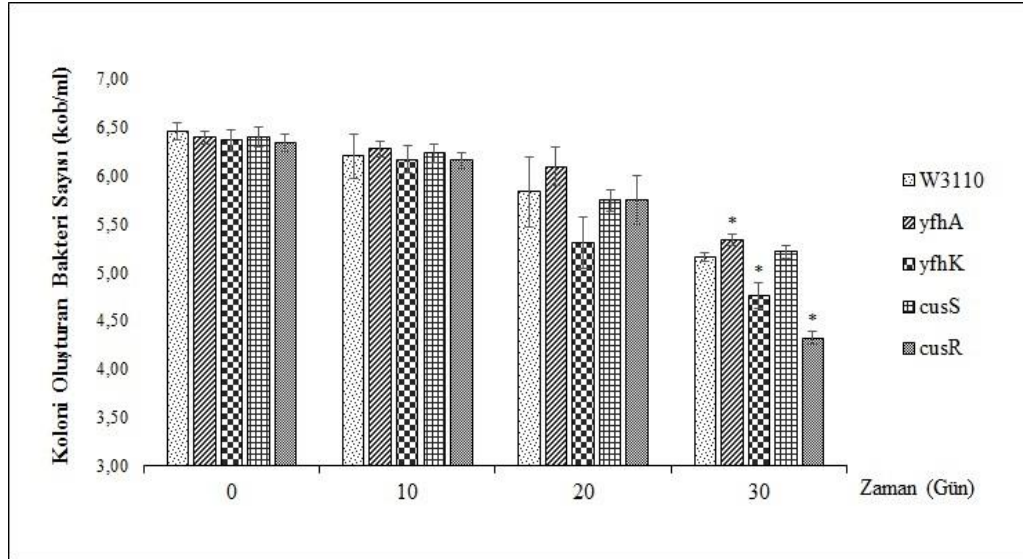


Şekil 4. 22. Streptomisin antibiyotiğinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.9. pH 7 fosfat tamponda streptomisin antibiyotiği varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
MİK/2 Str	t_{99} (gün)	MİK/2 Str	t_{99} (gün)
W3110	3,4	W3110	3,5
<i>yfhA</i>	3,6	<i>yfhA</i>	3,6
<i>yfhK</i>	3,4	<i>yfhK</i>	#
<i>cusS</i>	4,2	<i>cusS</i>	3,5
<i>cusR</i>	3,7	<i>cusR</i>	3,5

İstatiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0.05$).



Şekil 4. 23. Tetrasiklin antibiyotikinin yabani tip ve mutantların yaşamına etkisi. (*) işaretli olan barlarda değişim yabani tip W3110 *E. coli*'ye göre önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.10. pH 7 fosfat tamponunda tetrasiklin antibiyotik varlığında yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri.

Genlerin yokluğunun etkisi		Tamamlama testi (IPTG ilaveli)	
MİK/2 Te	t_{99} (gün)	MİK/2 Te	t_{99} (gün)
W3110	46,1	W3110	47,6
<i>yfhA</i>	56,6	<i>yfhA</i>	48,3
<i>yfhK</i>	38,03	<i>yfhK</i>	45,1
<i>cusS</i>	48,3	<i>cusS</i>	#
<i>cusR</i>	50,7	<i>cusR</i>	46,5

İstatiksel olarak önemli olmadığı için test edilmedi ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakterilerin doğal ortamlarda bir çok stres faktörü ile aynı anda başa çıkmak zorunda olduğu düşünüldüğünde, yaşam için oldukça kompleks regülatör ağlar oluşması ve bir çok mekanizmanın bir denge içinde çalışması gerekliliği oldukça olağandır. Moleküler çalışmalarda gen fonksiyonlarının belirlenmesi genellikle zengin ve içeriği bilinen besi ortamlarında yapılmaktadır. Ancak bu ortamlar ile doğadaki yaşam aynı doğrultuda değildir. Doğada birçok stres ile aynı anda mücadele etmek zorunda olan bakteriler, ayrıca sürekli bir kronik açlık durumundadır. Bu nedenle çalışmalarımız fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.

E. coli W3110 suşunun sahip olduğu 4438 genin yaklaşık olarak 2700 tanesinin doğrudan fonksiyonları belirlenmiştir (Madigan, 2010). Ayrıca bu genlerin global ağ içerisindeki rolleri yani ikincil, üçüncül görevleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Örneğin yfhK-A iki bileşikli fosforlama sisteminin hangi stres faktörü tarafından indüklendiği ve bu sistemin hangi genleri kontrol ettiği hakkında henüz yeterli verilere rastlanmamıştır. Bu genlerle son yıllarda yapılan bir kaç çalışmada yfhK-A iki bileşikli sisteminin şeker metabolizmasında, oksidatif streste ve Fe⁺³'ün hücreye alımında bir rolünün olabileceği belirlenmiştir (Yu ve Ye, 2016; Göpel, vd., 2014; Flamez, vd., 2007).

pH Stresi: Bakterilerin insan vücudu veya dış ortamlarda büyümeleri için, dış pH'daki ekstrem değişikliklere karşı korunmaları gerekmektedir (Stancik, vd., 2002). Dünya yüzeyi üzerinde oldukça farklı pH değerlerine sahip birçok alan vardır ve bakteriler bu zor şartlardaki alanlarda yaşarlar (Saito ve Kobayashi, 2003). Bakterilerin bu zor şartlarda nasıl hayatta kaldığına dair mekanizmaların çözülmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda asidik koşullar altında büyüme ve hayatta kalma konusunda birçok sonuç olmasına rağmen alkaline ortamlara adaptasyon mekanizmaları ile ilgili henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır (Saito ve Kobayashi, 2003).

Alkali koşullar altında yüksek pH da hücreleri aşırı sodyumdan korumada ve iç pH'nın muhafaza edilmesinde Na⁺ / H⁺ antiporterlarının görev aldığı belirlenmiştir (Stancik, vd., 2002). Sodyum proton antiporter'ları bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlılarda, hücrelerin sitoplazma ve organel zarlarında bulunan membran proteinleridir. Bu antiporterlar hücre enerji endüstrisinde ve hücre içi pH

homeostazında öncelikli rol oynarlar (Padan, vd., 2004). Sodyum proton antiporterlarının hem alkalifilik hem de nötrofilik bakterilerin büyümelerinde önemli olduğu düşünülmektedir. *E. coli*'de sodyum iyonlarının çıkışı için üç sistem vardır ve bu sistemlerin yokluğunda sodyum iyonlarının dışarı atılmasının yetersiz olduğu gözlenmiştir. *E. coli*'de sodyum iyon çıkışında görevli bu üç sistemin farklı çevresel koşullar altında çalıştığı belirlenmiştir. Sistemlerden biri ChaA, alkalik pH da görev alır ve genin ekspresyonu alkalik pH da yüksek osmotik stres altında indüklenir (Shijuku, vd., 2002; Sakuma, vd., 1998).

E. coli de Na^+ , H^+ veya Li^+ iyon değişiminde NhaA ve NhaB olmak üzere iki antiporter görevlidir. NhaA alkalik pH'da büyümede, Li^+ toksisitesinde ve yüksek tuzluluk adaptasyonundan sorumludur (Padan, vd., 2004).

E. coli ve *V. cholerae* benzeri birçok enterobakter akuatik tuzlu ekolojik nişi paylaşırlar ve bu çevrelerde organizmalar büyümeğe ziyade hayatta kalmaya çalışırlar. Padan vd. (2004), 'nin *E. coli* yabancıl tip ve mutantlarla yaptığı çalışmada, alkalik pH'da ve tuzlu ortamda *E. coli*'nin hayatta kalması için *nhaA* ekspresyonunun gerekli olduğunu göstermişlerdir (Padan, vd., 2004).

Alkalofilik *Bacillus* 'tan türetilen sodyum / proton antiporterı eksik bir mutantının yüksek pH duyarlı olduğu belirlenmiştir. Mutantlarda ana suşlardan farklı olarak sayısız proteinin farklılık gösterdiği belirlenmiş ve sodyum / proton antiporterlarının alkalifilik bakterilerin büyümesi için önemli oldukları saptanmıştır (Lewis, vd., 1980).

İki bileşik sistemlerden, TorS/TorR fosforilaz sisteminde genom boyunca transkripsiyonel analizler yapılmış ve *tnaLAB* operonunun bu sistem tarafından düzenlendiği bulunmuştur. TorS/TorR fosforilaz sisteminin trimetilamin N-oksit ve anaerobik koşullar altında birçok geni indüklediği tespit edilmiştir. Yüksek pH stresi altında yabancıl tip *E. coli*'nin hayatta kalması trimetilamin N-oksit varlığında artarken, *tnaA* mutantlarda trimetilamin N-oksit olsa bile hayatta kalmada bir azalma olmuştur. Bu sonuçlara bakılınca TorS/TorR fosforilaz, alkalizasyonu sınırlamak için alkali strese savunmayı tetiklemektedir. Ancak alkalik pH indüklenmesinde TorS/TorR sistemi tarafından kontrol edilen diğer genler bildirilmemiştir. Bu durumda TorS/TorR fosforilaz sisteminin *tnaA* yoluyla alkalik stres altında hayatta kalmak için görevli olduğu saptanmıştır (Blankenhorn, vd., 1999; Bordi, vd., 2003; Simon, vd., 1994; Jourlin, vd., 1996).

Alkalin pH çalışmalarının yanısıra mikroorganizmaların yaşamını etkileyen bir diğer stres faktöründe asidik pH'dır. Bu stres faktörü ile birçok çalışma yapılmıştır. Hickey ve Hirshfield (1990), *E. coli* ve *S. typhimurium* ile SMM (katkılı minimal ortam) besi ortamında yaptıkları çalışmada pH 7'den pH 5 e geçişte protein oranının arttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada pH'ın aside kayması sonucunda *E. coli* de 13 proteinin ve *S. typhimurium* da 19 proteinin 14 kat arttığını gözlemlemişlerdir (Hickey ve Hirshfield, 1990). Hyde ve Portalier (1990), pH 6.9 dan pH 4.3 e geçişte 16 protein tanımlamışlardır. Bu proteinler asit şok proteinleri olarak bilinir. Foster (1991), yapmış olduğu çalışmada asidik ortamda 52 proteinin ekspresyonunda değişiklik saptamıştır. Ancak bu değişimin olması için organizmanın belirli pH etkisine maruz bırakılması gerektiğini belirtmiştir. Çalışmada, pH 5.5-6 ile uyarılmış olan bir organizmanın pH 3-4 de yaşayabileceğini saptamış ve bu toleransın sebebi organizmanın preşok protein sentezi yapmasından ileri geldiğini belirlemiştir. Çünkü preşok proteinleri sentezlenmeden asit şok proteinleri sentezlenmemektedir. Dolayısı ile kademeli bir artış ile ani artışa karşı tepkide farklılık olduğu görülmektedir (Foster, 1991).

Asidik pH da doğrudan görev alan 5 tane asit direnç sistemi bulunmaktadır. Bunlar AR1, AR2, AR3, AR4 ve AR5'dir. AR1 mekanizması en az bilinen direnç sistemidir. AR2, glutamat dekarboksilaz sistemidir ve GadA, GadB, GadC, GadE proteinlerini içerir. AR3, arjinin dekarboksilaz sistemidir ve AdiA, AdiC proteinlerini içerir. AR4, lizin dekarboksilaz sistemidir ve CadA, CadB, CadC, LysP proteinlerine sahiptir ve AR5, ornitin dekarboksilaz sistemidir ve SpeF, PotE proteinlerini içerir (Peng, vd., 2011). Bu 5 mekanizma direkt olarak pH stresine karşı hücrenin korunmasında rol oynamaktadır. İndirekt olarak pH stresine karşı hücrenin korunmasında, pH'ya göre metabolizmanın ayarlanmasında ve hareketin düzenlenmesinde görev alan mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizma dış membranda bulunan OmpC ve OmpF porin protein ekspresyon seviyelerinin değiştirilmesidir (Darcan, vd., 2009). Asidik pH da *ompC* sentezi artar, *ompF* sentezi azaltılırken, alkalin pH da *ompC* sentezini azaltılıp, *ompF* sentezini arttırmaktadır. Dolayısı ile dış membran porin proteinlerinin sentezindeki bu değişim hem asidik hemde alkalin stres altında büyüme için gereklidir. Sonuç olarak osmotik strese bağlı EnvZ-OmpR iki bileşikli fosforlama sistemi tarafından kontrol edilen 2 porinin pH bağımlı olarak da düzenlendiği görülmüştür. Ancak pH bağımlı düzenleyici faktörün ne olduğu henüz belirlenememiştir (Saito ve Kobayashi, 2003).

Hagiwara vd. (2004) tarafından yapılan mikroarray analizleri sonucunda, *E. coli* 'de bulunan iki bileşikli sistem olan BasS/BasR'nin doğrudan ya da dolaylı olarak demir ve çinko metal yanıtında membran bütünlüğü ve membran fonksiyonu ile ilişkili olduğu, asidik ya da anaerobik koşullar altında büyüme ve gelişmeden sorumlu bir sistem olduğunu vurgulanmıştır (Hagiwara, vd., 2004; Lee, vd., 2005).

Ayrıca bakterilerde osmotik stres, açlık stresi ve durağan faza geçiş gibi birçok farklı streste bir grup genin ekspresyonundan sorumlu olan *rpoS* de asit stresinde görev almaktadır. RpoS global stres faktörü olarak adlandırılan bir sigma faktörüdür (Repoila, vd., 2003). *rpoS* geninin transkripsiyonel düzenlenmesi oldukça kompleks olup, RpoS regülonu, genel stres direnci, (UV ışınlar, hiperosmolarite, asit şoku, oksidatif ve sıcaklık stresi), karbon metabolizması, hücre zarf ve morfolojisi gibi çok farklı fonksiyonlarda görev alan genleri içermektedir (Notley, vd., 1996; Repoila, vd., 2003).

Bu çalışmada iki bileşikli fosforlama sistemi olan YfhA/YfhK ve CusS/CusR'nin alkalın, asidik ve nötral pH şartlarında rolleri araştırılmıştır.

Alkali pH stresinde yabani tip ile 4 mutant organizmanın sonuçları karşılaştırıldığında t_{99} değerlerine göre *yfhA*, *cusS* ve *cusR* mutantlarının önemli bir role sahip oldukları belirlenmiştir. Asidik pH stresinde ise *yfhK*, *cusS* ve *cusR* mutantlarının dikkate değer bir rollerinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca nötral pH olan pH 7.0 de yabani tip ile mutant suşlar arasında hiçbir fark gözlenmemiştir.

Hem alkali pH yaşamından hemde asidik pH yaşamından korunma için moleküler mekanizmalar hakkında bilgiler oldukça zayıf olduğu düşünüldüğünde bu genlerin detaylı analizleri ile asidik ve alkali pH ortamında yaşam için yeni genler ve mekanizmaların tespit edildiği düşünülmektedir.

İki bileşikli sistemlerden TorSR, BasSR ve CpxAR sistemlerinin yanısıra iki bileşikli fosforlama sistemlerinden YfhAK - CusSR sisteminin de pH ile ilgili görevlerinin olduğuna dair ilk veriler bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Bundan sonraki çalışmalarda bu genlerin direkt olarak asidik ve alkalın pH yaşamında görev alan proteinlerin sentezinde rollerinin olup olmadığı bir araştırma konusudur. Bu sebeple alkalın pH'dan sorumlu olan sodyum proton antiporterları ve TorSR iki bileşikli sistemi tarafından kontrol edilen *tnaA* ile bir ilişkisinin olup olmadığı, asit toleransından sorumlu genlerden özellikle de asit tolerans genleri olan *gad* sistemi, *cad* sistemi ve *adi* sistemi ile ilişkileri sonraki çalışma ve projelerin konusu olabilir. Ayrıca açlık, soğuk stresi, ozmotik

stres, ısı şoku, asit şoku ve durağan faza geçiş dâhil olmak üzere birçok strese, hücre sel cevapta görevli olan alternatif sigma faktörü *rpoS* ile YfhAK - CusSR sistemlerinin ilişkisinin olup olmadığı da araştırılmalıdır.

Ozmotik Stres: Bakterilerin yaşamını sınırlayan bir diğer stres faktörü de ozmotik strestir. Sitoplazmik membranda ozmotik stresi algılayan ozmosensörler bulunmaktadır. *E.coli*'de bu işlem EnvZ/OmpR iki bileşikli sistemi ile gerçekleştirilmektedir. EnvZ ozmosensör proteini ozmotik şoku hisseder ve OmpR'yi fosforlar. Fosforlanan *ompR* de osmotik streste görevli olan dış zar proteinleri OmpC ve OmpF yi uyarır. Ortam osmolaritesi yüksek ise por çapı küçük olan OmpC'nin, EnvZ/OmpR aktivitesi ile uyarılarak miktarı artırılır ve hücrenin dış ortama su vermesi engellenir bu sayede de osmotik stresten korunmuş olur (Kennedy, 1982).

Hücrede osmotik stresin etkilerini azaltmada görevli birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan biri mekano hassas kanallardır. Bu kanallarda MscL ve MscS proteinleri görevlidir. Bu proteinler osmolaritenin artması esnasında bu etkiyi tolere edebilmek için ozmolit maddelerin taşınmasını sağlar ve hücrenin kırılmasını engeller. Diğer bir mekanizma ise potasyum alımı ile alikalıdır. Burada asidik pH da H iyonu taşınmasında görevli olan *trk* geni görev almaktadır. K^+/H transferini gerçekleştirerek osmotik stresi dengeler. Bunun yanında potasyum transferinde KdpD/E iki bileşenli sisteminin kontrol ettiği KdpFABC proteinleri de görev almaktadır. Kdp, potasyuma karşı yüksek affiniteye sahiptir. Kdp'nin K^+ miktarını hissettiği ve ozmosensör olarak görev aldığı bilinmektedir. Bakteriler osmolariteden korunmak için ozmolit alım ve sentez mekanizması geliştirmişlerdir. Ozmolit alımında Pro (Pro P, ProQ, ProX, ProV) proteinleri görev almaktadır. Ozmolitlerin sentezinde ise trehaloz 6 fosfat sentaz (OtsA) ve trehaloz 6 fosfat fosfotaz (OtsB) enzimleri görev almaktadır. Ozmolitlerden kolin ve glisin betain sentezinden BetA, BetB, BetI, BetT ve ArcA enzimleri sorumludur. Ozmotik strese başka bir cevap da hücre duvarının uyarılmasıdır. Düşük osmolariteli ortam içerisinde, osmotik olarak düzenlenmiş periplazmik gluklan sentezi, OpgG ve OpgH proteinleri varlığında artar (Peng vd., 2011). Aynı zamanda alternatif sigma faktörü RpoS ozmoregülatör genlerin transkripsiyonuna aracılık eder. RpoS *E. coli* K-12 suşunda osmotik ve diğer stres şartları altında durgun fazda 50-100 genin transkripsiyonunu aktive eder (Culham vd., 2001).

0.2M NaCl'ün bulunduğu ortamda yapılan çalışmalarda t_{99} değerlerine göre yabancı tip *E.coli* W3110'un 150 günde, *yfhA* mutantının 60 günde, *yfhK* mutantının 67 günde, *cusS* mutantının 80 günde ve *cusR* mutantının ise 48 günde 2 logaritmik azaldığı belirlenmiştir. Aynı şekilde 0.1M NaCl'lü ortamda *E.coli* W3110'un 186 günde, *yfhA* mutantının 62 günde, *yfhK* mutantının 186 günde, *cusS* mutantının 61 günde ve *cusR* mutantı 75 günde 2 logaritmik azaldığı gözlenmiştir. Çalışılan her iki osmotik strese de *yfhA* geni stresten aynı derecede etkilenirken, *yfhK* geninin 0.2M osmotik şokta görev aldığı fakat 0.1M osmotik şokta yabancı tipten farklı bir sonuç vermediği belirlenmiştir. Bu da stres faktörlerinin şiddetine bağlı olarak farklı mekanizmaların devreye girdiğinin bir göstergesidir. *cusS* ve *cusR* genleri içinde farklı konsantrasyonlardaki osmotik strese bu genlerinin mekanizmalarının farklı etkilendiğini söyleyebiliriz. Sonuçlar değerlendirildiğinde *yfhA*, *cusS* ve *cusR* nin her iki osmotik değerinde de önemli görevleri olduğu görülmüştür. Çalışılan bir diğer konsantrasyon olan 0.01M NaCl lü ortamda ise yabancı suş ile mutant suşlar arasında fark gözlenmemiştir.

Yapılan bu çalışmada osmotik stresde aynı pH stresi gibi bu genlerle hiç çalışılmamış ve yapılan çalışmalar literatüre ışık tutmaktadır. Çalışılan genlerin bu kompleks ağdaki rollerinin aydınlatılabilmesi için osmotik stresle direkt ilişkili genleri regüle edip etmediği ileriki çalışmalarda kontrol edilmelidir.

Metal Stresi: Gelişen endüstriyel toplumla birlikte havaya toprağa ve sulara karışan metal kirliliği bitki, hayvan ve mikroorganizmaların yaşamında etkili olan stres faktörlerinden bir tanesidir. Her ne kadar bazı esansiyel metaller hücreler için gerekli olsada fazlası hücreye zarar veren toksik dozlardadır. Bu çalışma kapsamında gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* ve mutantları üzerine bakır, kobalt ve çinko metalinin etkileri araştırılmıştır.

Cu stresi: *Escherichia coli*, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır toksisitesinden korunmak için çoklu koruyucu sisteme sahiptir. Dış membran boyunca metallerin taşınımı demir-siderefor kompleksleri ya da porin proteinleri arasında kolaylaştırılmış difüzyonla olabileceği düşünülmektedir (Stenberg, vd., 2005; Rademacher ve Masepohl, 2012). Gram negatif bakterilerde OmpF, OmpC porinleri ve bunlara benzer yapılar periplazmaya metal katyonların taşınmasından sorumlu olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada *E. coli* mutant suşunda *ompC*

ekspresyonunun azalması ile bakıra karşı duyarlılığın arttığı belirlenmiştir (Egler, vd., 2005).

E.coli'nin bazı suşları kromozomal olarak kodlanmış bakır homeostatik sistemleri ile bakırca zengin ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bu tür suşlar, bakıra direnç kazandıran plazmid ile kodlanmış genlere sahiptirler. *E.coli*'de *pcoA* ve *pcoB* plazmid üzerinde taşınan bakır genleridir. Bakır duyarlı *pcoA* ve *pcoB*'nin birbiri ile etkileşim halinde olabildiği ancak sadece *pcoA* genine sahip olması durumunda ise çok daha düşük bir gen ekspresyonu ile bakıra direnç kazandırdığı öngörülmektedir (Rensing ve Grass, 2003).

Hücrede bakır homeostazında görevli çok sayıda regülatör sistem bulunmaktadır. Sitoplazmadaki bakırın varlığını algılamayla yükümlü olan ve çoklu bakır oksidaz olarak bilinen CueR, CopA ve CueO'dan oluşan homeostatik mekanizmayı devreye sokup sitoplazmadan bakırın uzaklaştırılmasını sağlar. Ayrıca hücre zarf stresi algılamada görevli CpxA/CpxR iki bileşik fosforlama sisteminin regülatörü olan CpxR de sitoplazmadan bakırın uzaklaştırılmasında CopA'yı etkileyen bir diğer faktördür. CusS/CusR iki bileşenli sistemi periplazmada bakır varlığını algılayan bir diğer sistemdir. Bu sistem periplazmadaki bakırı algılar ve sitoplazmadan bakırın detoksifikasyonunu CusCFBA efflux pompasını devreye sokarak periplazmadan bakırı uzaklaştırır (Franke, vd., 2003).

Larsen (2011)'in yapmış olduğu çalışmada aerobik şartlar altında *cusS* mutantının ve yabancı tipin 3mM Cu konsantrasyonunu tolere edebilirken, 5mM Cu konsantrasyonunu ise hem yabancı tipin hemde *cusS* mutantının tolere edemediğini tespit etmiştir. Aynı çalışmada anaerobik ortamda 1mM Cu konsantrasyonunu yabancı tip tolere ederken *cusS* mutantının hayatta kalma şansının olmadığı belirlenmiştir. Bu verilere bakılarak aslında CusS proteininin anaerobik koşullar altında hücrede bakır homeostazında görevli olabileceği düşünülmektedir. Daha önceki çalışmalarda da anaerobik stres altında *cusR* nin *cusCFBA* genlerinin regülasyonun da ciddi bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Larsen, 2011; Yamamoto ve Ishihama, 2005).

Bu çalışmada *yfhA*, *yfhK*, *cusS* ve *cusR* genlerinin mutant hale getirilmesi sonucunda *E. coli*'nin Cu varlığında fosfat tamponunda yaşam deneyleri yapılmış ve t₉₉ sürelerine göre *yfhA* nin bakır metali varlığında dirençli, *yfhK* ve *cusR* geninin ise duyarlı oldukları *cusS*'nin ise etkisiz olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar *yfhA* ve *yfhK*

genleri için literatüre kazandırılan ilk verilerdir. *cusS* ve *cusR* genlerinin sonuçları ise literatürdeki bilgiyi desteklemektedir (Larsen, 2011; Yamamoto ve Ishihama, 2005). Duyarlı olan genlerde kullanılan bakır konsantrasyonunun fosfat tamponundaki yaşamda negatif bir etkisi olduğu belirlenmiştir. *yfhK* ve *cusR* genlerinin varlığı Cu toksisitesinde duyarlılık, *yfhA* geninin mutant oluşu ise direnç sağlamaktadır. CusSR iki bileşikli fosforlama sistemi Cu toksisitesinde görev alan genler olduğu için bu çalışma kontrol çalışmalarından birisini oluşturmaktadır. Cu stresine karşı korunmada özellikle *yfhA-K* genlerinin etkisinin moleküler temeli daha sonraki çalışmalarda araştırılacak olup dış membran porin proteinleri, plasmid tabanlı *pco* sistemi ve diğer multi bakır oksidazlar ile bir ilişkilerinin olup olmadığı belirlenecektir.

Zn stresi: Çinko metali canlılar için son derece önemli olan esansiyel metallere bir tanesidir. Proteinlerin ve enzimlerin yapısına katılarak hücrede aktif bir şekilde rol oynar. Her ne kadar hücrenin yapısına katılsada diğer metallere olduğu gibi fazla çinko toksik etki yaratmaktadır. Bu sebeple organizmalar çinko toksisitesini tolere edebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir.

E. coli'de çinko transportunda görevli en az 4 çinko transport pompası bulunmaktadır. Bunlardan 2 tanesi *ZnuABC* ve *zupT* diğer ikisi ise *ZntA* ve *ZitB*'dir. Bu çinko transport sistemlerinin protein seviyelerinin düzenlenmesinde çinko bağımlı olduğu düşünülmektedir (Hausinger ve Zamble, 2007).

Sitozolik transkripsiyon faktörü olan *zntR* ve *zur* genlerinin çinkoya cevabı transkripsiyonun regüle edilmesi ile ilişkilidir. Hücre dışında çinko iyonları yüksek olduğunda *znuA* ve *znuBC* genlerinin transkripsiyonu çinko alımını kapatmak için *Zur* tarafından bastırılır. Öte yandan *ZntR*, fazla çinkonun dışarı atılması için *ZntA* transkripsiyonunun bir aktivatörüdür (Yamamoto ve Ishihama, 2005b).

Yamamoto ve Ishihama (2005), çalışmalarında 0.5mM $ZnCl_2$ varlığında total RNA ölçümleri yapmışlar ve eksponansiyel fazda metal yokluğunda *ZntA* ve *ZnuC* proteinleri üretilirken, metal eklendikten sonra 5. ve 10. dakikada *ZntA* seviyesinin maksimum düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. 30. dakikada ise *ZntA* seviyesinin neredeyse metalsiz eksponansiyel fazla aynı olduğunu bulmuşlardır. *ZnuC* seviyesi ise eksponansiyel fazda üretilirken metal ilavesinden sonra sentezlenmemektedir. Ancak metal eksponansiyel fazdan sonra değilde başlangıç kültürüne eklendiğinde *ZntA* seviyesinin giderek arttığı *ZnuA* seviyesinin ise aniden sifıra düştüğünü belirlemişlerdir.

Bunların yanı sıra *E.coli* W3110'da çinko cevabında *cysA*, *cysD*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysK*, *cysN*, *cysP*, *cysU*, *htrA/degP*, *hyfG*, *nhaR*, *rplV*, *rpsS*, *zntA*, *zipA*, *yabP*, *yacH*, *ybaK*, *ybbA*, *ybiK*, *yedV*, *yeeE*, *yfgD*, *yhhP/sirA* ve *yhjJ* genlerinin artan regülasyonda, *moaC/paaZ*, *nmpC* ve *znuC* genlerinin ise azalan regülasyonunda bir rolünün olduğunu belirlemişlerdir (Yamamoto ve Ishihama, 2005).

Hücre içerisinde çinko konsantrasyonu yüksek olduğu zaman organizmanın kendini koruması için dışa atım sistemi olan ZntA anahtarı açılır ve artan ZntA ekspresyonu hücrede çinko konsantrasyonunu düşürmeye çalışır (Binet ve Poole, 2000). ZntA, ATPaz aktivitesiyle uyarılan çinkoyla ilişkili proteindir. Yapılan çalışmalarda ZntA'nın homologu olan CadA kullanılmış ve CadA'nın zar veziküllerinde ATP bağımlı çinko ve kadminyumun hücre içine alımı gösterilmiştir (Rensing ve Bharati, 2007).

Gras vd. (2002)'nin *zupT* ile yapmış oldukları çalışmada *zupT*'nin Cd ve Zn ile antagonistik bir etkiye sahip olduğunu ve ayrıca Cu(II) hassasiyetinin az bir artışında hücrede ZupT ekspresyonunun olduğunu da belirlemişlerdir (Gras, vd., 2002).

Ayrıca Zur ve Fur proteinleride önemli iki farklı metal bağlanma bölgesi içerirler. Çinko bu proteinlere bağlanabilir ve böylelikle hücre içerisinde muhafaza edilebilir (Rensing ve Bharati, 2007).

Bu çalışmada yabani tip *E.coli* W3110'da çalışılan genlerin hepsinin önemli derecede duyarlı oldukları belirlenmiştir. Tamamlama testleride bunu doğrulamıştır. Bu mutantların çinko toksisitesine karşı korunmada görevli *znuABC*, *zupT*, *zitB* ve *fur* genleri ile direkt ilişkili olabileceği ve çinkonun dışa atımını sağlayan ZntA pompası kontrolünde çalıştığı düşünülmektedir. Bu tahminin test edilmesi ileriki çalışmalar için bir referans olabilir.

Co stresi: Kobalta spesifik taşıyıcılar çeşitli prokaryotlarda tespit edilmiştir. Fakat bunların hücre içerisine nasıl getirildiği hala belirsizdir. Kobaltın taşınmasında birçok iyon taşıyıcı görev almaktadır. Çinko transportu ZupT, magnezyum transportu CorA, mangan transportu MntH ve nikel transportları görev almaktadır. ZupT hariç kobaltın affinitesi mikromolar düzeyde doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmiştir. ZupT de ise kobaltın affinitesi bilinmemektedir ve diğer metallerle rekabet ettiği düşünülmektedir (Hausinger ve Zamble, 2007).

Colaço vd. (2016)'nin kobalt stresi varlığında *zinT* ve *galT* genleri ile yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda kobalt ilavesi edilerek aerobik ortamda hücreler

büyümeye bırakılmıştır. 0, 100, 250 ve 500 μM kobalt konsantrasyonlarından 500 μM konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonlarda büyüme gözlenmiştir ve *galT* ise hiçbir kobalt konsantrasyonundan etkilenmemiştir. Çalışmayı hücreleri OD₆₀₀ de yaklaşık 1.0 absorbansa getirip eksponansiyel fazda kobalt metali ekleyerek tekrarladıklarında 250 μM kobalta karşı absorbansda gerileme ve sonrasında hücrelerin adaptasyon sağlayarak tekrar ürediklerini belirlemiştir. Ancak metal konsantrasyonu 500 μM olduğunda *galT* gerileyip tekrar adapte olmuş *zinT* de ise çok ciddi bir gerileme gözlemlemiştir. Bu sonuçlara bakılarak *zinT* nin önemli bir rolünün olduğunu bulmuşlardır (Colaço, vd., 2016).

Kobaltın yüksek konsantrasyonları ile başa çıkmada nikel taşınmasında görevli olan RncA ve RncB proteinleride görevlidir. Rodrigue vd. (2005) *rcnA* (*yohM*) ile yapmış oldukları antimikrobiyal testde yabancı tip MC4100 17mm zone çapı verirken *rcnA* (*yohM*) nin 22mm zon çapı ve *rcnA* (*yohM*) geni tamamlanmış hücrenin ise 5 mm zon çapı verdiğini bulmuş ve bunu büyüme grafikleri ile de doğrulamışlardır. Aynı çalışmada deneyin aynısını kadmiyum, mangan, nikel, bakır ve çinko metali ile de tekrarlamışlar ve *rcnA* (*yohM*)'nin görevli olduğu nikel metalinde de benzer sonuçlar diğer metallerde ise yabancı tipten farklı sonuçlar bulmamışlardır. Bu sonuçlara baktığımızda *rcnA* (*yohM*) geninin mutant hale getirilmiş olması kobalta karşı bakteriye hassasiyet kazandırmıştır (Rodrigue, vd., 2005).

Demir bağlanma bölgelerine karşı kobalt ve demir metali arasında güçlü bir rekabet vardır. Önemli bir demir bağlanma proteini olan demir sülfat (Fe-S) enzimi e⁻ taşınması, substrat bağlanma aktivitesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, redox ve redox olmayan aktiviteler gibi çok çeşitli biyolojik olaylarda görevlidir. Bu aktiviteler demir ve sülfat atomu kompleksi ile olur. *E.coli* de üç farklı Fe-S kümesi tanımlanmıştır. Bunlar normal büyümede görevli ISC, oksidatif stres, demir eksikliği gibi stres koşulları altında gelişen SUF ve henüz bilinmeyen CSD sistemleridir. *E.coli* hücrelerinin hücre içi kobalta maruz kalması Fe-S enzimlerinin inaktivasyonu ile sonuçlanır. (Colaço, vd., 2016; Ranquet, vd., 2007).

Ranquet vd. (2007), kobalt ve demir arasında yarışmalı bir rekabet olduğunu çalışmalarında göstermişlerdir. *corA* geni eksik mutantlarda yabancı tipe oranla hücre içi kobalt içeriğinin çok az olduğunu belirlemiştir. Bunun yanında çalışmalarında *suf* geni eksik mutant suşlarda kobalta karşı hassasiyet belirlemiştir (Ranquet, vd., 2007).

Bu çalışmada *yfhA/K* iki bileşikli fosforlama sisteminde sensör olan *yfhK* mutantının kobalt metaline önemli bir direnç geliştirdiği regülatör olan *yfhA* geninin ise W3110'dan hiçbir farkının olmadığı, *cusS/R* sisteminde ise sensör olan *cusS* geninin duyarlı regülatör olan *cusR* geninin ise yabancı tipten farklı olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlarda dikkat çeken olay regülatör genlerin yabancı tipten farklı sonuçlar vermemesidir. Çalışılan bu genlerin kobalt metali varlığında görevli genlerle nasıl etkileşimde olduğu ileriki çalışmalara bir referans olabileceği düşünülmektedir.

Antibiyotik etkisi: Uygunsuz ve gelişigüzel antibiyotik kullanımı gerek toplum kökenli gerekse hastane kökenli dirençli mikroorganizmalar oluşmasına neden olmaktadır. Bir antibiyotiğe karşı direnç geliştiren mikroorganizma çok geçmeden birden fazla antibiyotiğe dirençli hala gelmektedir. Bu çoğul dirence sahip *M. tuberculosis*, *Salmonella* ve diğer mikroorganizmalarla tüm dünya başa çıkmaya çalışmaktadır.

Antibiyotik direncinin büyük bir sorun olduğu şu dönemde antibiyotiklere karşı direnç mekanizmalarının çözülmesi çok önemli bir gelişme olacaktır. Bu çalışma antibiyotiklere direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik *E.coli* ve mutant suşlarında gerçekleştirilmiştir. *Escherichia coli* kromozomu antibiyotiklere yanıtta birkaç tane çoklu ilaç taşıyıcısı kodlar. Antibakteriyel ajanlara karşı bu taşıyıcıların koruyucu fonksiyonları olmasına rağmen, spesifik fizyolojik eylemleri tam olarak anlaşılmış değildir. Doğal çevredeki ağır metaller, hidrofobik organik bileşikler, deterjanlar ve diğer organizmalar tarafından üretilen antibiyotikler gibi çeşitli zararlı maddelerden bakterileri korunmada efflux protein sistemleri sorumludur (Sato, vd., 1999).

Thanassi vd. (1997), *E.coli*'nin memeli bir canlının gastroentestinal sistemindeki safra asitlerince zengin ortamda hayatta kalabilmesinin *acrAB* efflux pompası sayesinde olduğunu belirlemişlerdir (Thanassi, vd., 1997). Kromozomal olarak kodlanmış bu efflux pompaları bakteri hücresi tarafından üretilen potansiyel zararlı metabolik maddelerin atılmasında da görevlidir (Sato, vd., 1999).

Okusu vd. (1996), *E.coli*'de 6 farklı antibiyotikle çoklu antibiyotik direnç (*MAR*) genleri ve *acrAB* agriflavin direnç genleri ile yapmış oldukları MİK deneylerinde yabancı tipe oranla *marR* mutant olan suшта tetrasiklin, nalidiksik asit ve kloramfenikole karşı direnç, *acrA/B* ikili mutantında ise hassasiyet belirlemişlerdir. Ayrıca hem *marR* hemde

acrA/B [marR(ΔacrA/B)] çoklu mutasyonunda da bu antibiyotiklere karşı hassasiyet gözlenmiştir (Okusu, vd., 1996).

Sato vd. (1999), *E.coli* agrifilavin direnç proteinleri olan AcrA, AcrB, AcrE ve AcrF ile çalışmışlardır. AcrA/B ve AcrE/F ikili mutantları ile bazı antibiyotik ve deterjanların minimum inhibisyon konsantrasyonunu araştırmışlar. Yabani tip olarak kullandıkları C600 (*thi*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*) mutantına oranla *AcrA/B* ikili mutantı agrifilavin, eritromisin, tetrasiklin ve novabiosine duyarlı iken *AcrE/F* ikili mutantında bir farklılık olmadığını bulmuşlardır. Bu ikili mutantlara pWEF329 ve pWAB329 plasmidi ekledikten sonra tekrar mik hesaplamışlar ve duyarlı olan genlerin C600 den *AcrA/B* ikili mutantı 4 kat *AcrE/F* ikili mutantın ise 2 kat dirençli olduğu belirlemiştir (Sato, vd., 1999).

Basillus subtilis'un çoklu ilaç taşıyıcısı Blt nin doğal fonksiyonu spermidin ve poliamin akışı olmasına rağmen Woolridge vd. (1997), birçok ilacın tesadüfen ya da fırsatçı bir şekilde Blt tarafından atıldığını ileri sürmüşlerdir (Woolridge, vd., 1997).

Aminoglikozidlere karşı aerob organizmaların direnç geliştirmesinde en önemli mekanizma enzimatik inaktivasyondur. Bu enzimler N-asetilasyon, O- nükleotidilasyon ve O-fosforilasyon olmak üzere 3 önemli reaksiyondan sorumludur. Bu reaksiyonların her biri için asetiltransferazlar, adeniltransferazlar gibi çeşitli enzim grupları da bulunmaktadır. Antibiyotiklere bu grupların eklenmesi ile antibiyotiğin yapısının değişmesi, hücre içerisine alınması ve protein sentezinin önlemesini bozarak antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş olur (Yüce, 2001).

Yabani tip ve mutantlar arasında kanamisin antibiyotiği açısından ciddi bir fark görülmektedir. Mutantlar daha dirençlidir. Kanamisin antibiyotiğine direnç zaten beklenen bir sonuçtur. Çünkü mutant yapılan genler kanamisin direnç kaseti ile mutant hale getirilmiştir. Kanamisine karşı direnç geni taşımaktadırlar. Genlerin gerçekten kanamisin antibiyotiğine karşı bir rolünün olduğunu belirleyebilmek için kanamisinle ilişkili direnç geninin silinmesi gerekmektedir. Kanamisin antibiyotiği ile elde edilen bu sonuçlar çalışmalarımızın doğruluğunu test etmek amacı ile kullanılmıştır.

Antibiyotikler arasında çalışılan genler açısından tetrasiklin direncinin ortaya çıkması oldukça önemlidir. Çünkü bu antibiyotik oldukça sık kullanılmaktadır ve direnç sorununun çözülmesi gerekmektedir. Tetrasiklin direncinde tetrasiklin transport proteinlerini kodlayan *tetA-G* ve *tetK-L* genleri gram pozitif ve gram negatif

organizmalarda ön plana çıkmaktadır. *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS* genlerince sentezlenen bir sitoplazmik proteinin aktivitesi sonucu ilacın ribozoma bağlanamaması söz konusudur. Bu genler *Campylobacter*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Bacteroides* ve *Neisseria* gibi birçok bakteride bulunur (Yüce, 2001).

Tetrasiklin antibiyotiğinin etkisinde *yfhA* dirençli *yfhK* ve *cusR* mutantları ise duyarlıdır. Bu genlerin yokluğu antibiyotiğe karşı hassasiyet sağlamaktadır. Çalışılan genlerin tetrasikline yanıtta görev alan *tetA-G* ve *tetK-L* genleri ile etkileşimde olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda membran permeabilitesi değişikliğine bağlı olarak antibiyotiğin hücre içerisine alımında ve hücreden dışarı atılmasında görevli aktif pompa sistemlerinin de kontrolünde olabileceği tahmin edilmektedir.

Streptomisin antibiyotiğine karşı çalışılan genler arasında *yfhA*, *cusS* ve *cusR* mutasyonlarının yabancı tipe göre dirençli olup yaşam sürelerinin uzadığı görülmektedir. Aminoglikozidik bir antibiyotik olan streptomisine karşı bakterilerin enzim inaktivasyonu ile direnç geliştirildiği düşünüldüğünde çalışılan genlerin bu enzimler ile bir ilgisinin olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *E.coli* de gerçekleştirilen bu mutasyonların protein sentezi üzerine bir etkisinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

Antibiyotik direncinin büyük sorun olduğu bilinmektedir. Bu nedenle antibiyotik direnç mekanizmalarının aydınlatılması için birçok çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu çalışma hedef genler açısından antibiyotik direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında yapılacak ileriki çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akalın, H. E., “Aminoglycoside Grubu Antibiyotiklerin Klinik Kullanımı”, *Ankem Derg.*, 2: 312-316 (1992).
- Arda, M., “Bakterilerde Varyasyonlar”, Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda., *Medisan Yayın Serisi*, Ankara, 1-15 (2000).
- Arda, M., “Bakterilerin Üremelerine Etkili Faktörler”, Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda., *Medisan Yayın Serisi*, Ankara, 1-17 (2000).
- Baek, J.H. and Lee, S.Y., “Transcriptome analysis of phosphate starvation response in *Escherichia coli*”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(2): 244-252 (2007).
- Baranova, N. and Nikaido, H., “The *baeSR* two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate”, *J. Bacteriol.*, 184: 4168–4176 (2002).
- Bearson, S. M., Albrecht, J. A. and Gunsalus, R. P., “Oxygen and nitrate-dependent regulation of *dmsABC* operon expression in *Escherichia coli*: sites for Fnr and NarL protein interactions”, *BMC Microbiol.*, 2: 13 (2002).
- Binet R.B.M., Poole K. R., "Cd(II), Pb(II) and Zn(II) İons Regulate Expression of the Metal-Transporting P-type ATPase *ZntA* in *Escherichia coli*", *FEBS Letters*, 473: 67-70 (2000).
- Blankenhorn, D., Phillips, J., and Slonczewski. L. J., "Acid- and Base-Induced Proteins during Aerobic and Anaerobic Growth of *Escherichia coli* Revealed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis", *American Society for Microbiology*, 181 (7): 2209-2216 (1999).
- Bordi, C., Théraulaz. L., Méjean. V., and Jourlin-Castelli. C., "Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, 48 (1): 211–223 (2003).
- Bruins, R. M., Kapil, S. and Oehme W. F., “Microbial Resistance to Metals in the Environment”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 198-207 (2000).
- Cariss, S.J., Tayler, A.E. and Avison, M.B., “Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, 190(11): 3930-3939 (2008).
- Chopra I., Roberts M., "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 (2): 232–260 (2001).
- Culham E. D., Lu A., Jishage M., Krogfelt A. K., Ishihama A., Wood M. J., "The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems", *Microbiology*, 147: 1657–1670 (2001).
- Danese, P. N. and Silhavy, T. J., “CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon”, *J. Bacteriol.*, 180: 831–839 (1998).
- Danese, P. N., Snyder, W. B. Cosma, C. L. Davis, L. J. and Silhavy, T. J., “The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP”, *Genes Dev.*, 9(4): 387-98 (1995).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Darcan, C. Özkanca R. and İdil Ö., “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): 1845-1854 (2009).
- Dikici, A. "Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4: 59-68 (2009).
- Egger, L. A., Park, H. and Inouye, M., "Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay", *Genes Cells*, 2: 167–184 (1997).
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G., and Nies, H. D., “Role of the Extracytoplasmic Function Protein Family Sigma Factor RpoE in Metal Resistance of *Escherichia coli*”, *Journal of Bacteriology*, 7: 2297–2307 (2005).
- Flamez, C., Ricard, I., Arafah, S., Simonet, M., Marceau M., Phenotypic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* 32777 response regulator mutants: New insights into two- component system regulon plasticity in bacteria, *International Journal of Medical Microbiology*, 298; 193-207 (2008).
- Foster W. J., "Salmonella Acid Shock Proteins Are Required for the Adaptive Acid Tolerance Response", *Journal of Bacteriology*, 173 (21): 6896-6902 (1991).
- Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D. H., "Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli*" *Journal of Bacteriology*, 3804–3812 (2003).
- Fried, L., Behr, S. and Jung, K., "Identification of a Target Gene and Activating Stimulus for the YpdA/YpdB Histidine Kinase/Response Regulator System in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, 195 (4): 807-815 (2013).
- Gassel, M., Mollenkamp, T. Puppe, W. and Altendorf, K., “The KdpF subunit is part of the K(+)-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex in vitro”, *J. Biol. Chem.*, 274: 37901–37907 (1999).
- Golby, P., Davies, S. Kelly, D. J. Guest, J. R. and Andrews, S. C., “Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C4-dicarboxylates in *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.*, 181: 1238–1248 (1999).
- Göpel Y., Khan M. A., Görke B., "Post-transcriptional control of the key enzyme for cell envelope synthesis by a base-pairing small RNA, an RNase adaptor protein, and a small RNA mimic", *RNA Biology 11:5, Landes Bioscience*, 433-442 (2014).
- Göpel Y., Lüttmann D., Heroven A. K., Reichenbach B., Dersch P., Görke B., "Common and Divergent Features in Transcriptional Control of The Homologous Small RNAs GlmY and GlmZ in Enterobacteriaceae", *Nucleic Acids Research*, 39 (4): 1294–1309 (2011).
- Grant, W. D., Long, P. E., “Environmental Microbiology” *Thomson Litho Ltd., Glasgow/Scotland*, 215 (1981).
- Grass G., Rensing C., "CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286: 902–908 (2001).
- Groisman, E. A., “The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ”, *J. Bacteriol.*, 183: 1835–1842 (2001).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Gudipaty A. S., Larsen A., S., Rensing C., McEvoy M.M., "Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS", **Published in final edited form as: FEMS Microbiol Lett.**, 330 (1): 30–37 (2012).
- Güven, D., "Salmonella'da Strese Yanıt Gen İfadelerinin Elektroforetik Tiplendirilmesi" Uzmanlık Tezi, **Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**, Edirne, (2012).
- Hagiwara D., Yamashino T., and Mizuno T., "A Genome Wide View of The *E.coli* BasS BasR two Component System Implicated in Iron- responses" **Biosci Biotechnol. Biochem.**, 1758-1767 (2004).
- Hausinger P. R., Zamble B. D., "Microbial Physiology of Nickel and Cobalt", Molecular Microbiology of Heavy Metals. Nies, S. **Published Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg. (2007).
- Heyde M., Portalier R., "Acid shock proteins of *Escherichia coli*", **FEMS Microbiol Lett.**, 57 (1-2): 19-26 (1990).
- Heyde, M. and Portalier, R., "Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12 by pH", **Mol. Gen. Genet.**, 208: 511-517 (1987).
- Heyde, M., Lazzaroni, J. C., Magnouloux, B. B. and Portalier, R., "Regulation of porin gene expression over a wide range of extracellular pH in *Escherichia coli* K-12: influence of a *tolA* mutation", **FEMS Microbiol. Lett.**, 52: 59-66 (1988).
- Hickey W. E. and Hirshfield N. I., "Low-pH-Induced Effects on Patterns of Protein Synthesis and on Internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*", **Applied And Environmental Microbiology**, 56: 1038-1045 (1990).
- Hill, C., O'Driscoll, B. and Booth, I., "Acid adaptation and food poisoning microorganisms" **International Journal of Food Microbiology**, 28; 245-254 (1995).
- Hoch, J.A., "Two component and phosphorelay signal transduction", **Current Opinion in Microbiol.** 3: 165-170 (2000).
- Itou, J., Eguchi, Y. and Utsumi, R., "Molecular mechanism of transcriptional cascade initiated by the EvgS/EvgA system in *Escherichia coli* K-12", **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 73: 870–878 (2009).
- Janausch, I.G., Garcia-Moreno, I. and Unden, G., "Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro", **J. Biol. Chem.**, 277: 39809 –39814 (2002).
- Jenkins, L. S. and Nunn, W. D., "Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the *ato* system", **J. Bacteriol.**, 169: 42–52 (1987).
- Jourlin, C., Bengrine. A., Chippaux. M., and Méjean.,V., "An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the *tor* structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*", **Molecular Microbiology**, 20 (6): 1297-1306 (1996).
- Joyce R. A., Reed L. J., White A., Edwards R., Osterman A., Baba T., Mori H., Lesely A.S., Palsson Q. B., Agarwalla S., "Experimental and Computational Assessment of Conditionally Essential Genes in *Escherichia coli*" **Journal of Bacteriology**, 188, (23): 8259–8271 (2006).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Kanat, N. ve Akdemir, C. S., “Bakterilerde glutatyon ve önemi”, *SAÜ. Fen Bil. Der.*, 18: 112-115 (2014).
- Kaspar, S. and Bott, M., “The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor”, *Arch. Microbiol.*, 177: 313–321 (2002).
- Kato, A., Tanabe, H. and Utsumi, R., “Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg⁺²-responsive promoters”, *J. Bacteriol.*, 181: 5516–5520 (1999).
- Kayaalp, S. O., Antibiyotikler ve Diğer Kemoterapötikler, Tıbbi Farmakoloji, *Hacettepe Taş*, Kayaalp, S. O, Ankara, 185-1037 (2002).
- Kennedy, P. E., “Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*”, *Biochemistry Proc. NatL Acad. Sci.*, 79: 1092-1095 (1982).
- Kenneth T., “Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease”, *Online Textbook of Bacteriology*, (2012).
- Kılıç, K. N. and Dönmez, G., “Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması” *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 06: 27-33 (2008).
- Kraxenberger, T., Fried, L., Behr, S. and Jung, K., "First Insights into the Unexplored Two-Component System YehU/YehT in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, 194(16): 4272-4284 (2012).
- Langen, G. R., Harper, J. R. Silhavy, T. J. and Howard, S. P., “Absence of the outer membrane phospholipase A suppresses the temperature-sensitive phenotype of *Escherichia coli degP* mutants and induces the Cpx and ζ^E extracytoplasmic stress responses”, *J. Bacteriol.*, 183: 5230–5238 (2001).
- Laubacher, M. E and Ades, S. E., “The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance”, *J. Bacteriol.*, 190(6): 2065-74 (2008).
- Lee J., Barrett J. A., Poole K. R., "Genome-Wide Transcriptional Response of Chemostat Cultured *Escherichia coli* to Zinc”, *Journal of Bacteriology*, 187 (3): 1124–1134 (2005).
- Lee, A. I., Delgado, A. and Gunsalus, R. P., “Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite”, *J. Bacteriol.*, 181: 5309–5316 (1999).
- Lewis, J. R., Belkina. S., and Krulwich. A. T., "Alkalophiles have much higher cytochrome contents than conventional bacteria and than their own non-alkalophilic mutant derivatives", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95 (2): 857-896 (1980).
- Luchi, S. and Lin, E. C. C., “Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression”, *Cell*, 66: 5–7 (1991).
- Luchi, S. and Lin, E. C. C., “*arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways”, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 85: 1888–1892 (1988).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Ma, Z., Masuda, N. and Foster, J. W., "Characterization of EvgAS, YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*", **J. Bacteriol.**, 186: 7378–7389 (2004).
- Madigan, T. M., "Mikrobiyal Üreme" Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi ed., Çökmüş C., **Palme Yayıncılık**, Ankara, 157-158 (2010).
- Masuda, N. and Church, G. M., "*Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA", **J. Bacteriol.**, 184: 6225–6234 (2002).
- Masuda, N. and Church, G. M., "Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*", **Mol. Microbiol.**, 48: 699–712 (2003).
- Mehta, A., "Mechanism of Action of Tetracyclines". **Pharmaxchange.info. Retrieved**, (2012).
- Méjean, V., Iobbi-Nivol, C., Lepelletier, M., Giordano, G., Chippaux, M. and Pascal, M.C., "TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon", **Mol. Microbiol.**, 11: 1169–1179 (1994).
- Miller, H. J., "A Short Course in Bacterial Genetics" **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA, 456 (1992).
- Mizuno T., "Compilation of All Genes Encoding Two-component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of *Escherichia coli*" **DNA Res.**, 4: 161–168 (1997).
- Moat, G. A., Foster, W. J. and Spector P. M., "Microbial Stress Responses" Microbial Physiology, **Wiley-Liss, Inc.**, New York, 582-585 (2002).
- Munson G., Lam D., Outten F. W., O'halloran T. V., "Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12", **Journal of Bacteriology**, 182 (20): 5864–5871 (2000).
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. and Yamaguchi, A., "The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC", **J. Bacteriol.**, 184: 4161–4167 (2002).
- Noll, M., Petrukhin, K. and Lutsenko, S., "Identification of a novel transcription regulator from *Proteus mirabilis*, PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*", **J. Biol. Chem.**, 273: 21393-21401 (1998).
- Notley, M. L. and Ferenci, T., "Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: What level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*?", **J. Bacteriol.** 178 (5), 1465-1468 (1996).
- Okusu, H., Ma, D., and Nikaido, H., "AcrAB Efflux Pump Plays a Major Role in the Antibiotic Resistance Phenotype of *Escherichia coli* Multiple-Antibiotic-Resistance (Mar) Mutants", **Journal of Bacteriology**, (1): 306-308 (1996).
- Otto, K. and Silhavy, T.J., "Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway", **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA. 99: 2287–2292 (2002).
- Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V., "The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*", **The Journal of Biological Chemistry**, 276 (33): 30670–30677 (2001).
- Overbeeke, N., Lugtenberg, B., "Expression of outer membrane protein e of *Escherichia coli* K12 by phosphate limitation", **FEBS Letters**, 112; 229-232 (1980).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Öztürk, Y. F., “Asit ve Tuza Adapte Edilmiş *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes*’in Türk Sucuklarında Yaşama Düzeylerinin Belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, (2010).
- Padan, E., Tzuberly, T., Herz, K., Kozachkov, L., Rimon, A., Galili, L., “NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na⁺/H⁺ antiporter”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658: 2–13 (2004).
- Palonen, E., Sequence Variability Of Virulence Genes and Stress Responses in *Yersinia pseudotuberculosis*, Academic Dissertation, *Department of Food Hygiene and Environmental Health Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki*, Helsinki, (2015).
- Peng S., Tasara T., Hummerjohann J., Stephan O., "An Overview of Molecular Stress Response Mechanisms in *Escherichia coli* Contributing to Survival of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* during Raw Milk Cheese Production", *Journal of Food Protection*, 74 (5): 849–864 (2011).
- Pernestig, A. K., Georgellis, D. Romeo, T. Suzuki, K. Tomenius, H. Normark, S. and Melefors, O., “The *Escherichia coli* BarA-UvrY two component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources”, *J. Bacteriol.*, 185: 843–853 (2003).
- Petersen, C., Moller, L. B., "Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator CopR”, *Gene*, 261: 289–298 (2000).
- Ranquet, C., Sandrine Ollagnier-de-Choudens, S. O., Loiseau, L., Barras, F., and Fontecave, M., “Cobalt Stress in *Escherichia coli* The Effect on The Iron-Sulfur Proteins”, *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (42), 30442–30451 (2007).
- Reichenbach B., Göpel Y., Görke B., "Dual Control by The Perfectly Overlapping σ^{54} - and σ^{70} Promoters Adjust Small RNA GlmY Expression to Different Environmental Signals", *Molecular Microbiology*, 74 (5): 1054-1070 (2009).
- Rensing C. and Bharati M., "Zinc, Cadmium, and Lead Resistance and Homeostasis". *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Nies, S. **Published Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, (2007).
- Rensing C. and Grass G., “*Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment" *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 197-213 (2003).
- Repoila, F., Majdalani, N. and Gottesman, S., “Small non coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm”, *Mol. Microbiol.* 48 (4), 855- 861 (2003).
- Rodrigue, A., Effantin, G. and Mandrand-Berthel, M. A., “Identification of rcnA (yohM), a Nickel and Cobalt Resistance Gene in *Escherichia coli*”, *Journal Of Bacteriology*, 187 (8): 2912–2916 (2005).
- Saito, H., and Kobayashi, H., “Bacterial responses to alkaline stress”, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, *Chiba University*, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675 (2003).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Sakuma, T., Yamada. N., Saito. H., Kakegawa. T., Kobayashi. H., "pH dependence of the function of sodium ion extrusion systems in *Escherichia coli* ", ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1363: 231–237 (1998).
- Saran, B. ve Karahan, C. Z., “Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış”, ***Türk üroloji Seminerleri***, (1): 216-20 (2010).
- Sato, M., Machida, K., Arıkado, E., Saito, H., Kakegawa T., et al.,”Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH”, ***Appl. Environ. Microbiol.***, 66 (3): 943-947 (2000).
- Sharma D., Cukras A. R., Rogers E. J., Southworth DR, Green R., "Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome". ***Journal of Molecular Biology***, 374 (4): 1065–1076 (2007).
- Shijukua, T., Yamashinob. T., Ohashia. H., Saitoa. H., Kakegawaa. T., Ohtab. M., and Kobayashia. H., "Expression of chaA, a sodium ion extrusion system of *Escherichia coli*, is regulated by osmolarity and pH", ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1556: 142-148 (2002).
- Shrivastava, A., Singh. V., Jadon, S., Bhadauria. S., “Heavy metal tolerance of three different bacteria isolated from industrial effluent” ***Ankita Shrivastava, IJPRBS***, 2(2): 137-147 (2013).
- Sigman, D. S., Kuwabara, M. D. Chen, C. H., and Bruce, T. W., “Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper in study of protein-DNA interactions”, ***Methods Enzymol.***, 208: 414–433 (1991).
- Simon, G., Mejean. V., Jourlin. C., Chippaux. M., and Pascal. C. M., "The torR Gene of *Escherichia coli* Encodes a Response Regulator Protein Involved in the Expression of the Trimethylamine N-Oxide Reductase Genes", ***American Society for Microbiology***, 176 (18): 5601-5606 (1994).
- Singh B, Mitchison D. A., "Bactericidal Activity of Streptomycin and Isoniazid Against Tubercle Bacilli". ***British Medical Journal***, (4854): 130–132 (1954).
- Snyder, W. B., Davis, L. J. Danese, P. N. Cosma, C. L., Silhavy, T. J., “Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway”, ***J. Bacteriol.***, 177: 4216–4223 (1995).
- Sperandio, V., Torres, A. G., Kaper, J. B., “Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*”, ***Mol. Microbiol.***, 43: 809–821 (2002).
- Stancik, M. L., Stancik, M. D., Schmidt, B., Barnhart, M. D., Yoncheva, N. Y., and Joan L. Slonczewski, L. J., “pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*” , ***Journal Of Bacteriology***, 184 (15): 4246-4258 (2002).
- Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, L. S., Robinson, V. C., Ilag, L. L., Heijne, G., and Daley, O. D., Protein Complexes of the *Escherichia coli* Cell Envelope, ***The Journal of Biological Chemistry***, 280 (41): 34409–34419 (2005).
- Stewart, V., Lu, Y., and Darwin, A. J., “Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12”, ***J. Bacteriol.***, 184: 1314–1323 (2002).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Stock, J. B., Ninfa, A. D., Stock, A. M., "Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria", *Microbiol. Rev.*, 53: 450-490 (1989).
- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., Brown, N.L., "CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA", *Mol Microbiol.*, 39: 502–511 (2001).
- Sussman, M., "*Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence", *Cambridge University Press*, Avusturya, 3-4 (1997).
- Thanassi, D. G., Cheng, W. L., and Nikaido, H., "Active Efflux of Bile Salts by *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 179 (8): 2512-2518 (1997).
- Thomas A. D. and Booth I. R., "The regulation of the porin gene *ompC* by acid pH", *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1829-1835 (1992).
- Torres, G. A., "Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America" *University of Teksas, Amerika*, 1-2 (2010).
- Tosun, H., "Bazı Patojen Bakterilerin Aside Tolerans Kazanmasının Tanımlanması ve Gıda Sanayindeki Önemi", Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bornova-İzmir, (2003).
- Verhamme, D.T., Arents, J.C., Postma, P.W., Crielaard, W., Hellingwerf, K. J., "Investigation of in vivo cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*", *Microbiology*, 148(Pt 1): 69-78 (2002).
- Viveiros, M., Jesus, A., Brito, M., Leandro, C., Martins, M., Ordway, D., Molnar, M. A., Molnar, J., and Amaral L., "Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes", *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 49 (8): 3578-3582 (2005).
- Walderhaug, M. O., Polarek, J. W. Voelkner, P. Daniel, J. M. Hesse, J. E. Altendorf, K., Epstein, W., "KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators", *J. Bacteriol.*, 174: 2152–2159 (1992).
- Wanner, B. L., "Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacterial", *J. Bacteriol.*, 174: 2053–2058 (1992).
- Wanner, B.L., "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria", *J. Cell Biochem.*, 51 (1): 47-54 (1993).
- Wanner, B.L., "Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*", *Kidney Int.*, 49 (4): 964-7 (1996).
- Webber, C. A. and Kadner, R. J., "Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of *uhpT* transcription in *Escherichia coli*", *Mol. Microbiol.*, 24: 1039–1048 (1997).
- Woolridge, P. D., Vazquez-Laslop, N., Markham, N. P., Chevalier, S. M., Gerner, W. E., and Neyfakh, A. A., Efflux of the Natural Polyamine Spermidine Facilitated by the *Bacillus subtilis* Multidrug Transporter Blt , *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (14): 8864–8866 (1997).
- Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R, Ishihama A., "Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*", *J Biol Chem*, 280 (2): 1448-1456 (2005).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Yamamoto K. and Ishihama Akira, "Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper" ***Molecular Microbiology***, 56 (1): 215–227 (2005).
- Yamamoto K., Ishihama A., "Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*", ***Bioscience Biotechnology and Biochemistry***, 70 (7): 1688-1695 (2006).
- Yamamoto, K., Matsumoto, F., Oshima, T., Fujita, N., Ogasawara, N., Ishihama, A., "Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in *Escherichia coli*", ***Biosci. Biotechnol. Biochem.***, 72 (11): 3011-4 (2008).
- Yousef, E. A. and Courtney, D. P., "Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods" Microbial Stress Adaptation and Food Safety, ***CRC Press***, Boca Raton, 19-20 (2002).
- Yu, W-B., and Ye, B-C., "Transcriptional Profiling Analysis of *Bacillus subtilis* in Response to High Levels of Fe³⁺", ***Curr Microbiol.***, (72): 653–662 (2016).
- Yüce, A., Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, ***Klinik Dergisi***, 14 (2): 41-46 (2001).
- Zientz, E., Bongaerts. J., Unden. G., "Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system", ***J. Bacteriol.***, 180: 5421–5425 (1998).
- Zimmer, D.P., Soupene, E. Lee, H. L. Wendisch, V. F. Khodursky, A. B. Peter, B. J. Bender, R. A., Kustu, S., "Nitrogen regulatory protein C controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation", ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, USA 97: 14674–14679 (2000).

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Özge KAYGUSUZ

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir / 21.02.1989

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi: 2008 - 2012 Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Bilimsel Faaliyetleri:

1. 29.09.2014-03.10.2014 TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü "Moleküler Biyoloji Yöntemleri" Eğitim Sertifikası- Kocaeli/Gebze
2. 2010-2012 Dumlupınar Üniversitesi Rektörlüğü Pedagojik Formasyon Sertifikası
3. 15.03.2009 Eğitim Sertifikası (ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi) - Genç Danışmanlık Merkezi – Kütahya
4. 08.03.2009 Eğitim Sertifikası (ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi) - Genç Danışmanlık Merkezi – Kütahya

İş Deneyimi

Stajlar :

1. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarları, Doç. Dr. Nisel YILMAZ, 2009 30 iş günü
2. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarları, KL Biyokimya Uzmanı Işıl ÇOKER, 2009 30 iş günü

Projeler :

1. Bilecik ŞEÜ. BAP *Escherichia coli*'deki Porin Proteinlerinin Metal Direncindeki Rollerinin Belirlenmesi, Araştırmacı, 2015- devam ediyor.
2. Bilecik ŞEÜ. BAP *Escherichia coli*'de EnvZ OmpR, CpxA-CpxR ve ArcA-ArcB iki bileşikli fosforlama sistemlerinin sensör ve regülatör proteinlerinin farklı stres şartlarında bakteri yaşamındaki rollerinin araştırılması, Araştırmacı, 2013-2015
3. TÜBİTAK 113T003 nolu "CusS-CusR, BasS-BasR ve YfhK-YfhA İki Bileşikli Fosforlama Sistemlerinin Farklı Stres Şartlarında (pH, Osmolarite, Bazı Antibiyotikler ve Metaller) -Araştırmacı-Bursiyer, 2013-2014

Çalıştığı Kurumlar : -

İletişim

Adres : Asmalı Sk. No:14 Bilecik\ Merkez

Tel : 0507 141 83 93

E-Posta Adresi : ozgekaygusuz@gmail.com, ozgekaygusuz@hotmail.com

Akademik Çalışmaları

1. Önder İdil, İkbal Macit, **Özge Kaygusuz**, Cihan Darcan “The role of oxidative stress genes and effect of pH on methylene blue sensitized photooxidation of *Escherichia coli*” Acta Biologica Hungarica Mar 2016, Vol. 67, Issue 1, pp. 85-98.
2. **Özge Kaygusuz**, Ezgi Aydın, Gülçin Çetin, Cihan Darcan “*Escherichia coli*’de *rpoS* Geninin Farklı Metal ve pH Stresinde Rolünün Araştırılması” XII. Ulusal Çevre ve Ekoloji Kongresi’2015.
3. **Özge Kaygusuz**, Gülçin Çetin, Cihan Darcan “*Escherichia coli*’de *envZ* ve *ompR* Genlerinin Farklı Metal Stresinde Rollerinin Araştırılması” IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi’ 2015.
4. Cihan Darcan, Gülçin Çetin, **Özge Kaygusuz** “*Escherichia coli*’de OmpC ve OmpF Dış Membran Porin Proteinlerinin Farklı Metal Stresindeki Rollerinin Belirlenmesi” IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi’ 2015.
5. Gülçin Çetin, Cihan Darcan, **Özge Kaygusuz** “Farklı Metal Stresi Altında *Escherichia coli*’de *cpxA* ve *cpxR* Genlerinin Rollerinin Belirlenmesi” IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi’ 2015.
6. Cihan Darcan, Gülçin Çetin, **Özge Kaygusuz** “Beslenmede Mikroorganizmalar” Türkiye Doğal Beslenme ve Yaşam Boyu Sağlık Zirvesi’2015.
7. Fadime Özdemir Koçak, **Özge Kaygusuz**, Uğur Çigdem, Cihan Darcan, “*Humulus lupulus* (Şerbetçi otu) Rizosfer Toprağından İzole Edilen Farklı Aktinomisetlerin Moleküler Tiplendirilmeleri” 22.Ulusal Biyoloji Kongresi’ 2014.
8. Sema Leblebici, **Özge Kaygusuz**, Tülin Korkmaz, Cihan Darcan, “Bazı Endemik *Stachys* Türlerine Ait Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi” XXII. Ulusal Biyoloji Kongresi’ 2014.
9. İkbal Macit, Önder İdil, **Özge Kaygusuz**, Cihan Darcan, Feraye İdil, “*E. coli*’nin

Fotooksidatif Stres Altındaki Yaşamına pH'ın Etkisi, Bazı Oksidatif Stres Genlerinin Rolünün Belirlenmesi" XXII .Ulusal Biyoloji Kongresi' 2014.

10. Cihan Darcan, **Özge Kaygusuz** ve Tülin Korkmaz 2013. "Antimicrobial effectiveness of [Cu(pzdc) (phen)₂].5.5H₂O complex on some microorganisms." JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, December 2013. Vol. 7(4), p. 2747-2756
11. Zerrin Pat, Onur Eroğlu, **Özge Kaygusuz** "Antibacterial Properties of the Thin Metal Films Deposited on Flexible Organic Substrates" IX. Nanoscience and Nanotechnology Conference' 2013.

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce

Tarih: 15/05/2016