



**T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

***Escherichia coli*'deki Porin Proteinlerinin
Metal Direncindeki Rollerinin Belirlenmesi**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: DOÇ. DR. Cihan DARCAN

ARAŞTIRMACILAR:

Doktora Öğrencisi : Gülçin ÇETİN

Yükseklisans Öğrencisi : Özge KAYGUSUZ

BAŞLAMA TARİHİ : 01/08/2015

BİTİŞ TARİHİ : 01/08/2016

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

BİLECİK, 2016

ÖZET

Porin proteinleri, membran permeabilitesinde rolü olan, ortalarında bulunan deliklerden 600 kDa'dan küçük hidrofilik bileşiklerin alınımını sağlayan ve çapları 0,6-2,3 nm arasında değişen spesifik yada spesifik olmayan geçirgenlik özelliği gösteren su dolu kanallardır. Porin proteinleri altta bulunan peptidoglikan tabakaya kovalent olmayan bağlarla bağlanmışlardır.

Bugüne kadar *E. coli*'de toplamda 30'un üzerinde porin proteini tanımlanmıştır. Bu çalışmada *E. coli*'de bulunan bu porinlerden OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, OmpN, LamB ve PhoE porin proteinlerinin kadmiyum, bakır, mangan ve kobalt metallerine karşı korumada rolleri araştırılmıştır. Çalışmada yurt dışından alınan *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *ompN*, *lamB*, ve *phoE* mutantları P1 transdüksiyon yöntemi ile *E. coli* W3110 bakterisine aktarıldı. Elde edilen mutantların üzerine etki eden metallerin MİK değerleri belirlendi. Belirlenen yabancı tip *E. coli* W3110 MİK değerine göre metallerin varlığında büyüme grafikleri çizildi. Yabancı tipin MİK değeri dikkate alınarak 3 farklı konsantrasyon belirlendi ve bu miktarlarda metal içeren petrilere petride dilüsyon yöntemi ile ekim yapıldı. Son olarak, metal direncinde rolü olduğu belirlenen mutantlar üzerine tamamlama testi yapılarak doğrulaması yapıldı.

Sonuç olarak, sekiz farklı porinin dört farklı metal stresine karşı korunmada rolünün olup olmadığı belirlenecektir. Bu bilgiler ışığında, metallere direnç mekanizmasına yönelik çalışmalara altyapı sağlanacaktır. Ayrıca, halk sağlığını tehdit eden ağır metallerin giderilmesi konusunda yeni fikirlerin ortaya çıkmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler:

E. coli, porin proteinleri, metal direnci

ABSTRACT

Porin proteins, which play a role in membrane permeability, allowing the uptake of hydrophilic compounds from one hole in the middle 600 kDa and a diameter water-filled channels are showing a specific or nonspecific permeability ranging from 0.6 to 2.3 nm. Pori proteins are non-covalently bound to the peptidoglycan layer connected with the underlying bonds.

Up to now, Porin protein was identified over 30 in *E. coli*. In this study, OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, OmpN, LamB, and PhoE porin proteins were been investigated roles of cadmium, copper, manganese and cobalt metal resistance. *E. coli* W3110 *ompA::Km*, *ompC::Km*, *ompF::Km*, *ompG::Km*, *ompT::Km*, *ompN::Km*, *lamB::Km* and *phoE::Km* mutants were been transferred by P1 transduction from *E. coli ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *ompN*, *lamB* and *phoE* mutant, received from Japan and these mutants were been used in this study. The lowest amount of metals affected on the mutant (MIK volue) were been determined. According to MIK value of wild-type, growth chart were been drawn. By the wild-type value, the amount of metal were been determined at three different concentrations. And, Cultivation was been the petri dishes containing metal by dilution method in petri. Finally, completion test was been performed on the mutants identified has a role in metal resistance.

Consequently, it was determined whether the role is of eight different porin on four different metal. In light of this information, it was provided a foundation for studies on metal resistance mechanisms. It was also help the emergence of new ideas in the elimination of heavy metals that public health threat.

Keywords:

E. coli, porin proteins, metal resistance

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
1. GİRİŞ	1
1.1 Porin Proteinlerinin Genel Özellikleri	1
1.2 Porin Proteinlerinin Anatomik Yapısı.....	2
1.3 Porin Proteinlerinin Çevresel Şartlardaki Değişimlere Karşı Bakterilerin Korunması. 3	
2. MATERYAL METOD	6
2.1 Çalışmada kullanılacak Besiyerler ve Solüsyonlar	6
2.1.1 Nutrient agar besiyeri.....	6
2.1.2 Nutrient broth besiyeri	6
2.1.3 LB agar besiyeri.....	6
2.1.4 LB broth besiyeri	6
2.1.5 Soft agar	6
2.1.6 DM agar	6
2.1.7 SOB medium.....	7
2.1.8 SOC medium.....	7
2.1.9 TBE hazırlama	7
2.1.10 TE hazırlama	7
2.1.11 Tris-HCl hazırlama	7
2.1.12 X-gal hazırlama (5-brom-4klor-3indol-beta-D-galaktopironosid).....	7
2.1.13 IPTG hazırlama (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid)	7
2.1.14 IPTG ve X-GAL'li besiyeri hazırlama	7
2.1.15 Ringer solüsyonu.....	8
2.1.16 Kullanılan metallerin hazırlanması	8
2.2 Mutantların Elde Edilmesi	8

2.2.1	P1kc Fajı İle Transdüksiyon	8
2.3	Komplement Eldesi.....	11
2.3.1	Primer Eldesi.....	11
2.3.2	Gen bölgelerini içeren plazmitlerin eldesi	11
2.3.3	Ligasyon.....	11
2.3.4	Transformasyon	11
2.4	Koloni PZR	12
2.5	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi	14
2.6	Mutantların Metaller Üzerine Etkisinin Büyüme Grafiği ve Petride Dilüsyon Yöntemi İle Belirlenmesi	14
3.	BULGULAR.....	16
3.1	Mutantların Elde Edilmesi	16
3.2	Metallerin MİK Değerleri	19
3.3	Mutantların Metaller Üzerine Etkisinin Büyüme Grafiği ve Petride Dilüsyonu.....	20
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	26
5.	KAYNAKLAR	28

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	16
Şekil 2 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompC</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	16
Şekil 3 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompF</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	17
Şekil 4 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompG</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	17
Şekil 5 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompT</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	17
Şekil 6 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>lamB</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	18
Şekil 7 Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>phoE</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	18
Şekil 8 <i>E.coli</i> plate51 mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	19
Şekil 9 <i>E.coli</i> plate51 mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	19
Şekil 10 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların normal şartlardaki büyüme grafiği.....	20
Şekil 11 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların bakır (Cu) metali varlığında büyüme grafiği	20
Şekil 12 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların mangan (Mn) metali varlığında büyüme grafiği.....	21
Şekil 13 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların kadmiyum (Cd) metali varlığında büyüme grafiği.....	21
Şekil 14 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların kobalt (Co) metali varlığında büyüme grafiği	21
Şekil 15 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA::Km</i> ve <i>lamB::Km</i> mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu	22
Şekil 16 Yabanıl tip <i>E. coli</i> BW25113 ve <i>ompN::Km</i> mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu.....	23
Şekil 17 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompG::Km</i> , <i>ompT::Km</i> ve <i>phoE::Km</i> mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu	24
Şekil 18 Yabanıl tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompC::Km</i> ve <i>ompF::Km</i> mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu	25

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1 Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> yabancı tip ve mutant suşları.....	10
Tablo 2 Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.....	12
Tablo 3 PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	13
Tablo 4 PZR (Thermo) döngü koşulları.....	14
Tablo 5 Yabancı tip <i>E.coli</i> W3310 suşunda metallerin minimal inhibisyon değeri.....	19

1. GİRİŞ

1.1 Porin Proteinlerinin Genel Özellikleri

Porin proteinleri, gerekli besinlerin seçici alımını sağlayan, çevresel değişimlere karşı sentez oranı değişen ve hücreyi koruyan yapılardır. Dış membranda bu proteinlerin varlığı ilk kez 1976 yılında tanımlanmış ve porin ismi verilmiş olup, ilk tanımlanan porinler *Escherichia coli*'deki OmpF ve OmpC porin proteinleridir (Nakae, 1976). *E. coli*'deki bu proteinlerden OmpF'nin kristal yapısı ilk kez 1980, anatomik yapısı ise 1992 yılında ortaya konmuştur (Garavito ve Rosenbusch, 1980; Cowan ve ark., 1992).

Porin proteinleri, membran permeabilitesinde rolü olan, ortalarında bulunan deliklerden 600 kDa'dan küçük hidrofilik bileşiklerin alınımını sağlayan ve çapları 0,6-2,3 nm arasında değişen spesifik yada spesifik olmayan geçirgenlik özelliği gösteren su dolu kanallardır (Achouak ve ark., 2001). Porin proteinleri altta bulunan peptidoglikan tabakaya kovalent olmayan bağlarla bağlanmışlardır. *E. coli* 'de toplamda 20' nin üzerinde dış membran porin proteini tanımlanmıştır. Bu proteinler spesifik ve spesifik olmayan proteinler olarak 2 gruba ayrılmıştır. *E. coli* için spesifik porinlere LamB ve PhoE, spesifik olmayan porinlere ise OmpC ve OmpF örnek olarak verilebilir. *E. coli*'de LamB porininin ortasındaki kanal maltoz ve maltodekstrini, PhoE porininin ise fosfat moleküllerini geçirdiği için spesifik kanal olarak kabul edilirler (Koebnik ve ark., 2000).

Prilipov ve ark. (1998) çalışmalarında *E. coli*'deki OmpN porininin 39.152 Da moleküler ağırlığa sahip olduğunu, dış membranda düşük bir gen ürünü ortaya koyduğunu ve kısmen jelde bulunan diğer bantlar ile çakıştığı için fark edilemediğini ifade etmişlerdir. OmpN'nin fonksiyonel ve biyokimyasal substrat olarak spesifik olmayan porinlerden OmpC porinine benzediği gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada OmpG adı verilen ve porin olarak adlandırılan proteinin diğer porinler ile aminoasit dizi benzerliği göstermediği ifade edilmiştir (Fajardo ve ark., 1998). OmpF porin proteini 37, OmpC ise 36 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (Lugtenberg ve Van Alphen, 1983). OmpT yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığına sahip, 3b (Schnaitman, 1974) ve a protein (Lugtenberg ve ark.,1975) olarak da bilinen bir dış membran porinidir (Rupprecht ve ark., 1983). *E. coli*'de OmpT bakterinin karşılaştığı yabancı peptid maddesini yok eden yapısal bir proteazdır. (Haiko ve ark.,2009) OmpA porininin ise

madde transferinden farklı bir görevi olup, membranda oranı çevresel şartlar ile değişmeyen, dış membrana sağlamlık kazandıran bir proteindir (Koebnik, 1999; Arda, 2000). Enterik grup bakterilerde ve diğer gram negatif bakterilerde bulunan porin proteinleri farklı adlar ile adlandırılmıştır. OmpC ve OmpF porin proteinleri çevresel şartlardaki değişimlere göre hücrede yaklaşık olarak 10^4 - 10^6 arasında bulunmaktadır (Koebnik ve ark., 2000).

1.2 Porin Proteinlerinin Anatomik Yapısı

Porin proteinlerinin ortalarında bulunan deliklerin anatomik yapıları birbirinden farklıdır. Porinler konformasyonel yapıları ve fizikokimyasal özelliklerine göre ya trimerik yada monomerik organizasyona sahiptir. Ortalarında tek kanal bulunan porinlere *P. aeruginosa*'nın protein P porini, 3 ayrı kanal bulunanlara ise OmpC, LamB ve PhoE porinleri örnek olarak verilebilir. Bazı porinlerde ise kanal dış yüzeyde 3 ayrı delikten orijin aldıktan sonra ortaya yakın bir noktada birleşir ve tek bir kanal olarak periplazmik boşluğa açılır, bu tip porinlere en iyi örnek de *E. coli*'nin OmpF porinidir (Koebnik ve ark., 2000). 3 monomer ünitesi yüzeyde bulunan halkaların yakın ilişkileri ile birleşerek trimer yapıyı oluşturmaktadır. Yalnızca yüksek sıcaklıkta, SDS gibi deterjanların bulunduğu ortamlarda çözülebilen bu yapı, dış membran içine yerleşmiş yoğun bir molekül organizasyonu gerçekleştirir (Achouak ve ark., 2001).

Membranda bulunan porin proteinleri çok sayıda β -levha yapıları içerir (Koebnik ve ark., 2000). Porinler pseudosiklik β fiçi yapısı ortaya koyan antiparalel β ipliklerden oluşur (Cowan ve ark., 1992; Schirmer, 1998). Spesifik porinler 18, spesifik olmayan porinler ise 16 iplikli β levhaya sahiptir (Koebnik ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar sonucunda porin proteinleri dahil dış membranda bulunan proteinlerin tamamının β plakalı tabakalı protein yapısına, sitoplazmik membranda bulunan proteinlerin ise α heliks protein yapısına sahip olduğu ifade edilmiştir (Koebnik ve ark., 2000). Bu farklılığın dış membran proteinlerinin sentezinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bernstein, 2000).

Porinlerin madde transferini nasıl gerçekleştirdikleri tam olarak ortaya konamamış, fakat yapılan çalışmalar sonunda bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Kanalin ortasında L_3 loop olarak adlandırılan, kanalın ortasından daralmasını sağlayan ve porine kum saati şeklini kazandıran fonksiyonel bir yapının varlığı tespit edilmiştir (Bauer ve ark., 1989).

Bu yapının, kanalın madde transferinde önemli bir görevi olduğu ortaya konmuştur (Soares ve ark., 1995; Bainbridge ve ark., 1998a, 1998b). Porinlerin madde transferi ile ilgili ortaya atılan hipotezlerden birisi, genel porinler için voltaj kapısı mekanizması olup, bu mekanizma hala tam olarak çözülememiştir (Delcour, 1997; Van Gelder ve ark., 1997; Koebnik ve ark., 2000). Substrat spesifik porinlerde ise bu mekanizmanın olmadığı, madde transferinin yağda kayma mekanizması olarak adlandırılan başka bir mekanizma ile gerçekleştiği tespit edilmiştir (Dutzler ve ark., 1995; Meyer ve Schulz, 1997).

Yapılan çalışmalar sonucunda, voltaj kapısı mekanizmasında porinlerin daralma bölgesindeki yüklerin çok önemli görevi olduğu ifade edilmiş, yağda kayma mekanizmasında ise, spesifik substratın kanal boyunca geçişinde hidrojen bağlarının çok önemli olduğu, bu bağların sürekli olarak oluşup bozulması ilkesi ile çalıştığı ortaya konmuştur (Meyer ve Schulz, 1997; Liu ve Delcour, 1998; Dumas ve ark., 2000).

1.3 Porin Proteinlerinin Çevresel Şartlardaki Değişimlere Karşı Bakterilerin Korunması

Besin sınırlaması, büyüme oranının azalmasına neden olan ve bakterilerde fizyolojik ve biyokimyasal düzenlemeleri içeren geniş bir adaptasyon sağlayan stres şartlarından birisidir. Besin sınırlamasındaki bu düzenlemelerin arasında porin sentezinin de bakterilerde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Özkanca, 1993; Liu ve Ferenci, 1998). Açlık stresinde porinlerin düzenlenme mekanizmaları ile ilgili olarak kapsamlı çalışmalar yapılmasına rağmen mekanizma henüz tam olarak çözülememiştir (Liu ve Ferenci, 1998; Zhang ve Ferenci, 1999; Ferenci, 1999; Liu ve Ferenci, 2001). *E. coli*'de glukoz sınırlanmasında OmpF, azot sınırlanmasında ise OmpC'nin daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir (Liu ve Ferenci, 2001). Liu ve Ferenci (2001) çalışmalarında, açlık stresi altında OmpC ve OmpF porinlerinin sentezini OmpR'ye bağımlı olduğunu ifade etmişlerdir. Kemostat kültürler kullanarak, açlığın etkisi ile porin sentezini düzenleyen mekanizmaları çözmeye yönelik çalışmalarında, EnvZ sensörü olmadan da porin transkripsiyonunun olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu faktörlerin açlık stresindeki etkilerinin tam olarak bilinmediğini ifade etmişlerdir (Liu ve Ferenci, 2001). Porinlerin madde transferindeki rolleri düşünüldüğünde açlık stresinde bakterilerin besin maddelerini toplayabilmek için membran permeabilitesini porinler ile değiştirdiği ifade edilmiştir (Ferenci, 1999). Özkanca (1993, 1996)'nın çalışmalarında da açlık stresinde porin sentezinin düzenlendiği ortaya konulmuştur. Özkanca ve Flint (2002)

çalışmalarında göl suyunda 38 günlük açlık stresine maruz bırakılan *E. coli*'nin OmpF porin protein sentez düzeyinin 25 °C ve 37 °C'de artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. OmpC'nin ise nisbi olarak fazla değişiklik göstermediği, OmpA'nın miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. *E. coli*'de OmpF ve LamB gibi porinler şeker alımı için önemli olup 10^{-6} ve 10^{-7} M glukoz konsantrasyonlarında yaklaşık 20 katlık bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Liu ve Ferenci, 1998).

OmpF düzeyinin ortam osmolaritesinden daha çok besin sınırlamasından etkilendiği tespit edilmiştir (Pratt ve ark., 1996). Genelde metabolizmadaki enzimler substratları olmadığı sürece sentezlenmezler (McCleary ve ark., 1993). Bu şartlarda sinyal olarak görev yapacak küçük moleküller regülatör proteinler ile ilişkiye girerek metabolizmanın kontrolünü sağlarlar. AcP gibi bu küçük moleküllerin, porin proteinlerinde açlıkta düzenlenmesini sağladıkları bilinmektedir (McCleary ve ark., 1993).

Ortam osmolaritesi değiştiği zaman gram (-) bakteriler porin sentezlerini düzenleyerek dış membran permeabilitesini adapte ederler. OmpC ve OmpF porin proteinlerinin çevresel şartlara bağımlı olarak değişimi, ilk olarak osmotik stres ile yapılan çalışmalarda ortaya konmuş ve bu nedenle osmolariteye karşı kullanılan proteinler olarak ifade edilmiştir. Direkt osmolarite ile düzenlenen bu proteinlerden OmpF düşük osmolariteli şartlarda sentezlenirken, yüksek osmolariteli şartlarda ise OmpF baskılanarak OmpC porin proteini sentezlenmektedir (Slauch ve ark., 1988).

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

Lugtenberg ve ark. (1976) çalışmalarında porin protein sentez düzeyinin büyüme sıcaklığına bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Yine Andersen ve ark. (1989) çalışmalarında porinlerin sentezinin sıcaklığa bağlı olarak *micF* RNA ile kontrol edildiğini tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada da OmpF sentezinin 37°C'de düşük sıcaklıklara göre daha fazla azaldığı, OmpC sentezinin ise 5 ve 15°C'de daha fazla azalma gösterdiği ifade edilmiştir (Özkanca, 1993). Bağırsaklarda bakterilerin safra tuzları ve

diğer toksik bileşiklerden korunmasına yardımcı olmak için yüksek sıcaklıklarda, OmpF miktarının azaldığı ifade edilmiştir (Delihhas ve Forst, 2001).

E. coli'nin büyüme ortamına salisilat veya etanol katıldığında OmpF sentezinin arttığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Andersen ve ark., 1989; Rosner ve ark., 1991; Darcan ve ark. 2001). Darcan ve ark. (2001) etanol ile muamele edilen *E. colive S. typhimurium*'un OmpC ve OmpF porin proteinlerinin ve dış membran proteinlerinin büyük çoğunluğunun sentezinde dikkate değer artış olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yapılan bir çalışma da salisilik asitin OmpF porin sentezini *micF* RNA ile bloke ettiği tespit edilmiştir (Ramani ve Boakye, 2001). Darcan (1999), deniz suyunda yaptığı çalışmasında, formaldehit ve SDS gibi dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *E. colive S. typhimurium*'un dış membranındaki proteinlerin, OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentez düzeyini azalttığını göstermiştir. Özkanca (1993)'da göl suyunda yaptığı bir çalışmada SDS gibi deterjanlara maruz kalmış *E. coli*'de OmpC ve OmpF porin proteinlerinin neredeyse yok denecek kadar azaldığını belirtmiştir. Kimyasal kirlenici maddelerden olan mono Chlorophenol, pentachlorophenol ve kadmiyum klorid kimyasallarının da etkisi ile OmpF sentezinin azaldığı gösterilmiştir (Faber ve ark., 1993). Mar regülunun (kimyasal 9 maddelere direnç regülunu) porin proteinlerinin sentezini, özellikle OmpF porinini kontrol ettiği ortaya konmuştur (Cohen ve ark., 1988). Mar regülununun kimyasal maddelerin hücre dışına atılması ve hücrenin korunmasında önemli rolü vardır (Aleksun ve Levy, 1999).

Porinler ile ilişkili olarak yukarıda da açıklandığı gibi farklı stres şartlarında çalışmalar yapılmış ve çoğunlukla da OmpC ve OmpF porinlerinin rolleri belirlenmiştir. Fakat birçok çalışmaya rağmen farklı metallere karşı hücreyi koruması ile ilgili literatürde herhangi bilgiye rastlanılmamıştır. *E. coli*'de dış membran kanal proteini olarak görev yapan OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, OmpN, LamB, ve Pho E porin proteinlerinin metal alımında da görevleri olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak *ompC* ve *ompF* mutantları ile yapılan ön denemelerimiz sonucunda metal direncinde rollerinin olduğu tespit edilmiştir. Dolayısı ile bu projede *E. coli*'deki OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, OmpN, LamB, ve PhoE porin proteinlerinin kadmiyum, bakır, mangan ve kobalt metallere olan dirençleri detaylı olarak araştırılmış olacaktır.

2. MATERYAL METOD

2.1 Çalışmada kullanılacak Besiyerler ve Solüsyonlar

2.1.1 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.

2.1.2 Nutrient broth besiyeri

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

2.1.3 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.

2.1.4 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.

2.1.5 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.

2.1.6 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.

2.1.7 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.

2.1.8 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.

2.1.9 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.

2.1.10 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.

2.1.11 Tris-HCl hazırlama

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

2.1.12 X-gal hazırlama (5-brom-4klor-3indol-beta-D-galaktopironosid)

X-gal (Sigma), 20 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. 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.

2.1.13 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.

2.1.14 IPTG ve X-GAL'li besiyeri hazırlama

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

2.1.15 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 µl ependorflara steril olarak dolduruldu.

2.1.16 Kullanılan metallerin hazırlanması

CoCl₂, CuSO₄ MnSO₄ ve CdNO₃ 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.

2.2 Mutantların Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* yabani tip ve mutant suşları yurt dışından temin edildi (Japon Ulusal Genetik Merkezi). Elde edilen suşlar ve bu çalışmada yapılan suşlar Tablo 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.

Keio koleksiyondan elde edilen Tablo 1’de verilen *E. coli* BW25113 suşlarından hedef 7 gen bölgesi yabani tip *E.coli* W3310’a Kobayashi vd. (2000) nin kullandığı P1kc fajı ile transdüksiyon metodu kullanılarak aktarıldı ve bu şekilde çalışmada 7 mutant *E. coli* W3110 da elde edilerek kullanıldı.

2.2.1 P1kc Fajı İle Transdüksiyon

4 ml LB brot içerisine 1M CaCl₂’den final konsantrasyonu 2.5mM olacak şekilde ve 25 mg/ml olarak hazırlanmış kanamisin (Sigma) antibiyotiğinden final konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde eklendi. Tek bir bakteri kolonisinden besiyerine 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 ve P1kc fajından 10 µl konuldu. 37 °C’ de 20 dk inkübatörde (Nüve) bekletildikten 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 fajı) +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.

Tablo 1 Çalışmada kullanılan *E. coli* yabancı tip ve mutant suşları.

Suş Numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Wild type	Lab stok
JW0940	BW25113 <i>ompA</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW2203	BW25113 <i>ompC</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW0912	BW25113 <i>ompF</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1312	BW25113 <i>ompG</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1371	BW25113 <i>ompN</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW0554	BW25113 <i>ompT</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW3996	BW25113 <i>lamB</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW0231	BW25113 <i>phoE</i> ::km	Keio Koleksiyonu
CD1	W3110 <i>ompA</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD2	W3110 <i>ompC</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD3	W3110 <i>ompF</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD4	W3110 <i>ompG</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD5	W3110 <i>ompT</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD6	W3110 <i>lamB</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD7	W3110 <i>phoE</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
CD8	W3110 <i>ompA</i> ::km plate51:: <i>ompA</i>	Bu çalışmada yapıldı
CD9	W3110 <i>ompC</i> ::km plate51:: <i>ompC</i>	Bu çalışmada yapıldı
CD10	W3110 <i>ompF</i> ::km plate51:: <i>ompF</i>	Bu çalışmada yapıldı
CD11	W3110 <i>ompG</i> ::km plate51:: <i>ompG</i>	Bu çalışmada yapıldı
CD12	W3110 <i>ompT</i> ::km plate51:: <i>ompT</i>	Bu çalışmada yapıldı
CD13	W3110 <i>lamB</i> ::km plate51:: <i>lamB</i>	Bu çalışmada yapıldı
CD14	W3110 <i>phoE</i> ::km plate51:: <i>phoE</i>	Bu çalışmada yapıldı

2.3 Komplement Eldesi

2.3.1 Primer Eldesi

aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kitinin içerisindeki pLATE51 vektörüne uygun olarak çalışmada kullanılan genlerin ORF'una göre ilk ATG ve sonlandırma kodonu TAA'ya göre primerler Tablo 3'de görüldüğü gibi PRIMER3 programı ile dizayn edildi.

2.3.2 Gen bölgelerini içeren plazmitlerin eldesi

Yukarıda elde edilen mutantların rolleri çıkması durumunda güvenilirliğini sağlamak için tamamlama testleri yapıldı. Bunun için gerekli olan genleri içeren plazmitler aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kitinin prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

2.3.3 Ligasyon

E.coli W3110 bakterinin DNAsı kullanılarak genlerin Aligatör pLATE51 vektörüne uygun dizayn edilen Tablo3'de belirtilen primerler kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünü kullanılarak ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Alicator pLATE51 vektörüne ligasyon basamağı şu şekilde yapıldı; 2 µL 5X LIC tamponu, 1 PZR ürünleri. T4 DNA polimeraz (1u / µL), 1 µL saf su, 6 µL PZR ürünü oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. 0.5 M EDTA'dan 0.6 µL eklendi. 1 µL pLATE51 vektörü eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendi.

2.3.4 Transformasyon

2 ml LB brot içerisine 25 mg/ml km' den 2 µl eklendi ve ardından çalışmada yapmış olduğumuz Tablo 1' de verdiğimiz *E. coli* 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 antibiyotiği 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. Santrifüj

tüpüne 1 ml 0,1 M soğuk CaCl_2 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 CaCl_2 eklendi. Daha sonra yeniden süspansiyon edildi. 30 dk buzda bekletildi.

1,5 ml 2 adet steril santrifüj tüpünde bulunan 200 μl kompetent hücre üzerine 10-100 ng 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 SO C 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 Amfisilin antibiyotik içeren LB agar üzerine yayıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.4 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 0,2 ml'lik PZR tüpüne konuldu. Bakteri süspansiyonu üzerine Tablo 2' deki reaksiyon karışımından 7,5 μl dağıtıldı ve Tablo 4' deki koşullar altında PZR yapıldı. Her bir genin doğrulaması için uygun primerler de Tablo 3' de gösterildi.

Tablo 2 Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.

10x Thermo Pol. Reaksiyon Buffer(Biolab)	1,0 μl
10mM dNTP Mix	0,2 μl
10 μM 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
Toplam	10 μl

Tablo 3 PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Evrensel K1 geri primeri	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'
W3310:: <i>ompA</i> ileri primeri	5' TGGATACATTGCGCCAGCAA 3'
W3310:: <i>ompC</i> ileri primeri	5' CGAATGACGCACAACAAGGT 3'
W3310:: <i>ompF</i> ileri primeri	5' TATGCCGCCAACTTTACTCG 3'
W3310:: <i>ompG</i> ileri primeri	5' GTAGCTTCCCAGCAACAGTT 3'
W3310:: <i>ompN</i> ileri primeri	5' AGCCTGGTGGTACTGGATTT 3'
W3310:: <i>ompT</i> ileri primeri	5' TTGTCTTACACACCATCGGC 3'
W3310:: <i>lamB</i> ileri primeri	5'GCTTTGGCTATATGCTGGTCGCGA3'
W3310:: <i>phoE</i> ileri primeri	5' TTCAGCGTGCTGGTGGTCAGCAG3'
plate51:: <i>ompA</i> ileri primeri	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
plate51:: <i>ompA</i> geri primeri	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'
plate51:: <i>ompC</i> ileri primeri	5' GCCAAACGCTGGCCCGTTTTTCC 3'
plate51:: <i>ompC</i> geri primeri	5' CCTTTCGTGTTTTTCGACGACGG 3'
plate51:: <i>ompF</i> ileri primeri	5' GCCGTCAGTAAGCCATTTCAGCG 3'
plate51:: <i>ompF</i> geri primeri	5' CCAGCGGGTAATGTGATAACAAA 3'
plate51:: <i>ompG</i> ileri primeri	5' GCCAAACTGTTGATTGTCGAAGA 3'
plate51:: <i>ompG</i> geri primeri	5' CCCTGACCATCCGGCACCTCAAG 3'
plate51:: <i>ompN</i> ileri primeri	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
plate51:: <i>ompN</i> geri primeri	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'
plate51:: <i>ompT</i> ileri primeri	5' GGAGATGGGAAGTCATTAAGCAGCGGGGTTTCTAC3'
plate51:: <i>ompT</i> geri primeri	5' GGAGATGGGAAGTCATTAATGGCTAGTTATCCCCG3'
plate51:: <i>lamB</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATACAAGATGAAAAAGTTATTACCCT3'
plate51:: <i>lamB</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTCATTACGCATCTTATCCGGACA3'
plate51:: <i>phoE</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGAGCACTCT3'
plate51:: <i>phoE</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTCATTAGGTGAAGTTAACGGCGG3'

Tablo 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

2.5 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

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 OD₆₀₀ nm dalga boyunda 0,1' e ayarlandı. Daha sonra 60 ml'de 400 µl olacak şekilde stok bakteri kültürü hazırlandı. Bu kültürden 96 kuyucuklu mikro plakaya ilk kuyucuk 180 µl diğer kuyucuklar 100 µl olacak şekilde kültür eklendi. 180 µl' lik kuyucuğa projede yer alan antibiyotik ve metallere 20 µl eklenerek seri sulandırma yapıldı. Plakalar 37 °C' de 24 saat inkübe edildi ve MİK değerleri belirlendi.

2.6 Mutantların Metaller Üzerine Etkisinin Büyüme Grafiği ve Petride Dilüsyon Yöntemi İle Belirlenmesi

Elde edilen mutantların üzerine etki eden metallerin MİK değerleri belirlendi. Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantlar MİK_{3/4} değerinde metallerin varlığında büyüme grafikleri çizildi. Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantlardan tek bir bakteri kolonisi 2 ml nutrient broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılarak ön kültür hazırlandı. Daha sonra o ön kültürden alınarak 5 ml nutrient broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat çalkalamalı inkübasyona tekrar bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bakterilerin OD₆₀₀ nm dalga boyunda 0,1' e ayarlandı. Ayarlanan bakteri kültürlerinde 15 ml nutrient brot besiyerinde 37 °C'de 8 saat çalkalamalı inkübasyona bırakıldı ve 2 saatte bir örnek alınarak büyüme grafikleri çizildi.

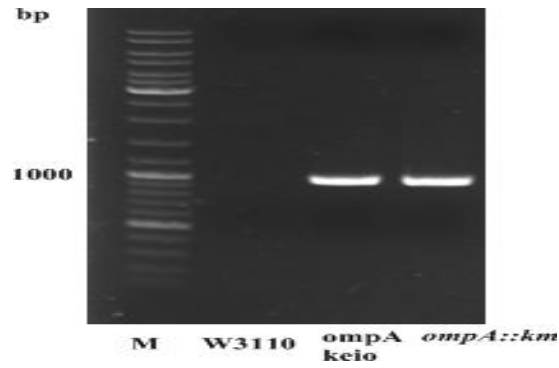
Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantlardan tek bir bakteri kolonisi 2 ml nutrient broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılarak ön kültür

hazırlandı. Daha sonra o ön kültürden alınarak 10 ml nutrient broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat çalkalamalı inkübasyona tekrar bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bakterilerin OD₆₀₀ nm dalga boyunda 1' e ayarlandı. Ayarlanan bakteriler ringer solüsyonu ile 10⁻¹-10⁻⁷ oranlarında dilüsyonları yapıldı. Yabanıl tipin MİK değeri dikkate alınarak 3 farklı konsantrasyon belirlendi ve bu miktarlarda metal içeren petrilere petride dilüsyon yöntemi ile bakterilerin 10⁻³-10⁻⁷ dilüsyonları ekim yapıldı. Son olarak, metal direncinde rolü olduğu belirlenen mutantlar üzerine tamamlama testi yapılarak doğrulaması yapıldı.

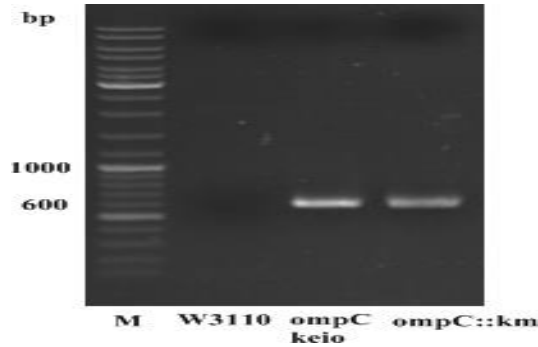
3. BULGULAR

3.1 Mutantların Elde Edilmesi

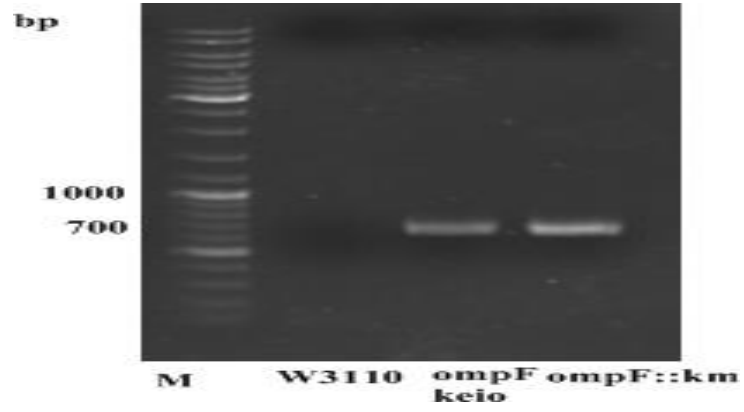
Transdüksiyon sonrasında Xgal-IPTG’li ortamda mavi koloni veren tek koloni bakteriler Km besiyerine ekildikten sonra buradan seçilen kolonilerden Tablo 3’ deki her bir gen için kendisine ait ileri primer ve k1 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Elde edilen mutantların PZR görüntüleri Şekil 1-7 de verilmiştir. Negatif kontrol olarak yabancı tip *E. coli* W3110 kullanılırken pozitif kontrol olarak herbir genin keio koleksiyondan alınan *E.coli* BW25113 suşundaki mutantlar kullanıldı. Şekil 1’de görüldüğü gibi 1-3’e kadar olan kuyucuklarda f-k1 primerleri ile elde edilen *ompA::km* mutanları bulunmaktadır ve 1041 bç bant büyüklüğüne sahip PZR ürünü elde edilmiştir. Aynı şekilde 1104 bç bant büyüklüğünde *ompC::km* (Şekil 2), 1089 bç bant büyüklüğünde *ompF::km* (Şekil 3), 906 bç bant büyüklüğünde *ompG::km* (Şekil 4), 954 bç bant büyüklüğünde *ompT::km* (Şekil 5), 1341 bç bant büyüklüğünde *lamB::km* (Şekil 6) ve 1056 bç bant büyüklüğünde *phoE::km* (Şekil 7) mutantları bulunmaktadır.



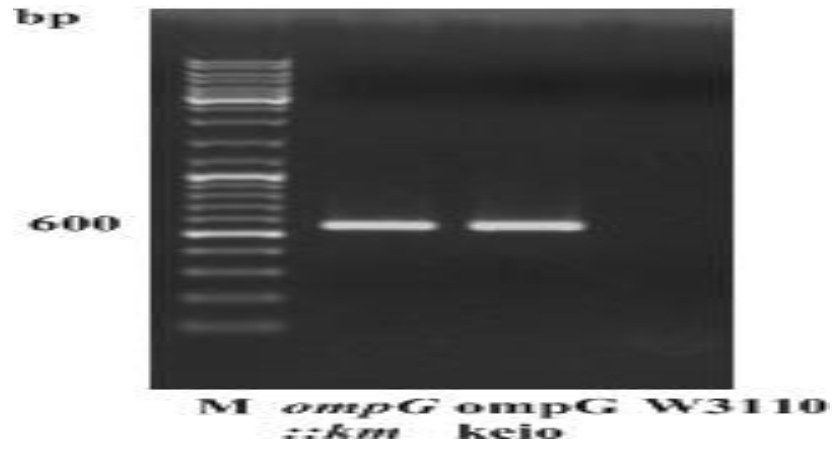
Şekil 1 Yabancı tip *E. coli* ve *ompA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



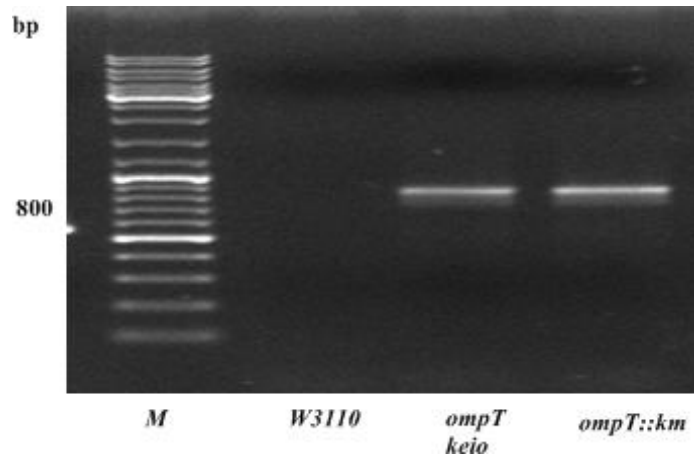
Şekil 2 Yabancı tip *E. coli* ve *ompC* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



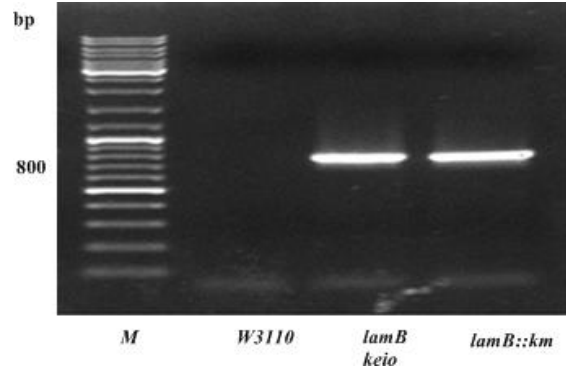
Şekil 3 Yabani tip *E. coli* ve *ompF* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



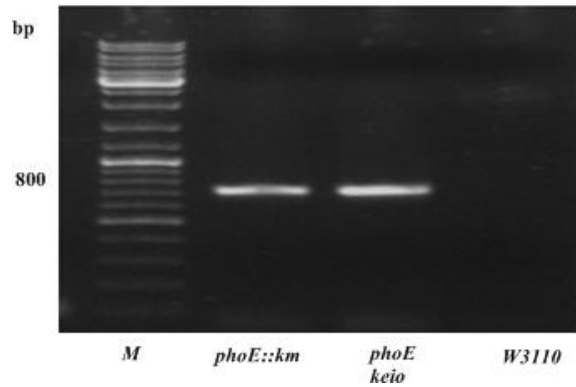
Şekil 4 Yabani tip *E. coli* ve *ompG* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 5 Yabani tip *E. coli* ve *ompT* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

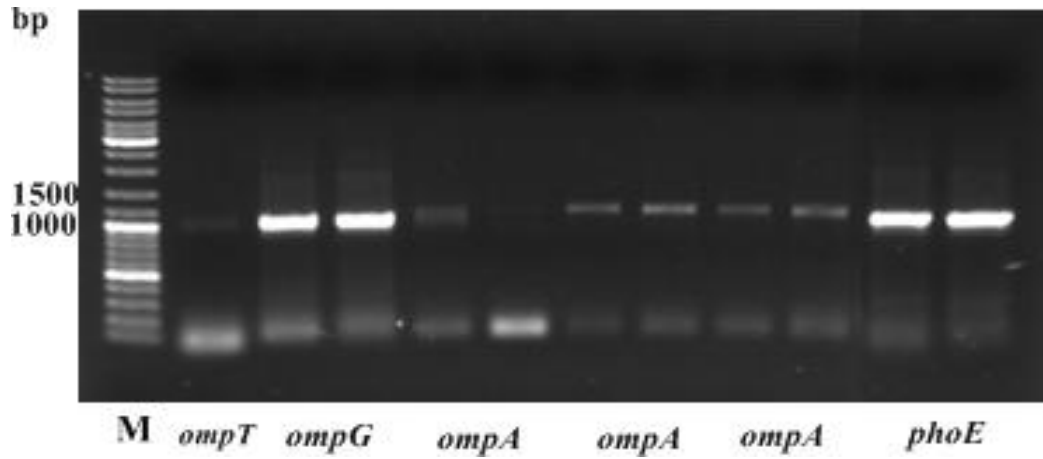


Şekil 6 Yabani tip *E. coli* ve *lamB* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

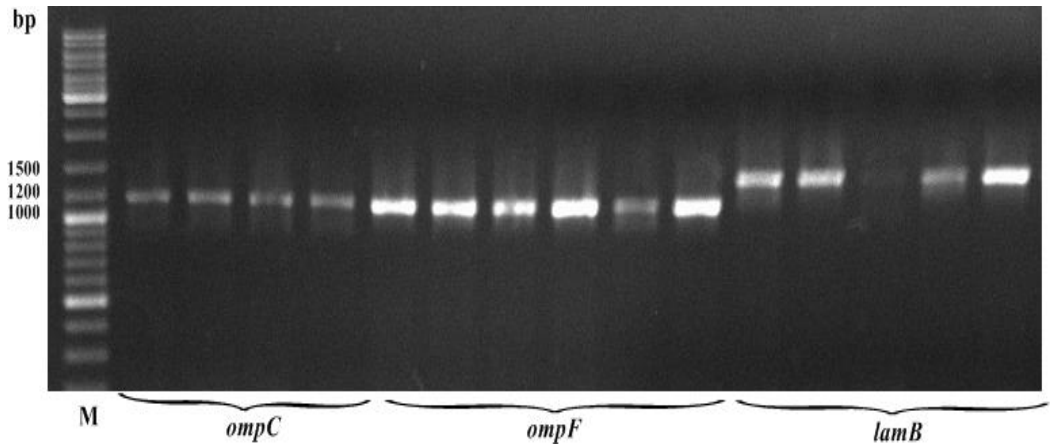


Şekil 7 Yabani tip *E. coli* ve *phoE* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

Yukarıda elde edilen mutantların rolleri çıkması durumunda güvenilirliğini sağlamak için tamamlama testleri yapıldı. Bunun için Aligatör primerleri kullanılarak aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kitinin belirlediği şekilde her biri için ayrı ayrı ilgili genleri içeren plate51 vektörü elde edildi. Elde edilen plazmitler izole edilip ilgili olan mutantlara transforme edildi. Transformasyon sonrasında oluşan koloniler uygun antibiyotik kontrolünün ardından PZR ile doğrulandı. Seçilen kolonilerden her bir gen için kendisine ait olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR ile doğrulama yapıldı. Elde edilen mutantların plazmidinin PZR görüntüleri Şekil 8-9' de verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlardan plate51::*ompT* mutanı 1054 bç, plate51::*ompG* mutanı 1006 bç, plate51::*ompA* mutanı 1194 bç, plate51::*phoE* mutanı 1156 bç (Şekil 8), plate51::*ompC* mutanı 1254 bç, plate51::*ompF* mutanı 1206 bç ve plate51::*lamB* mutanı 1498 bç (Şekil 9) bant uzunluğuna sahiptir.



Şekil 8 *E.coli* plate51 mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 9 *E.coli* plate51 mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

3.2 Metallerin MİK Değerleri

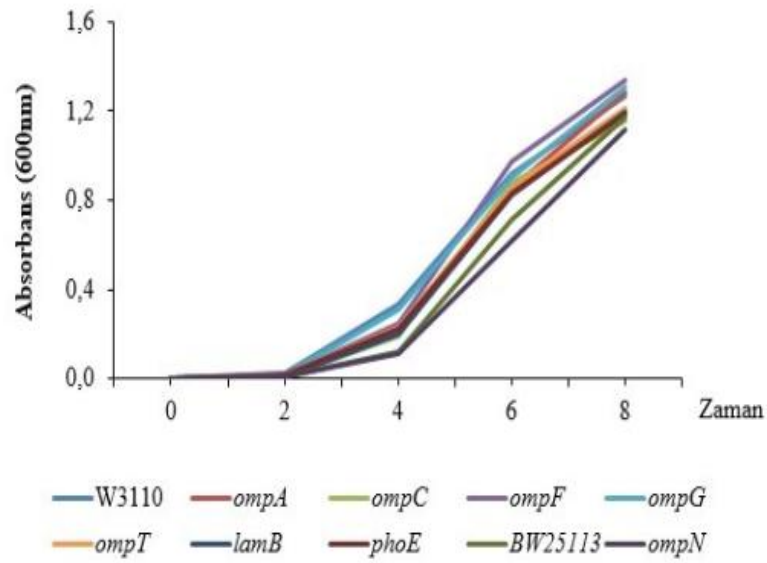
E. coli W3110 ile 4 farklı metalin minimal inhibisyon konsantrasyon değerlerini belirledik. Elde edilen sonuçlar Tablo 5' de verilmiştir.

Tablo 5 Yabani tip *E.coli* W3310 suşunda metallerin minimal inhibisyon değeri.

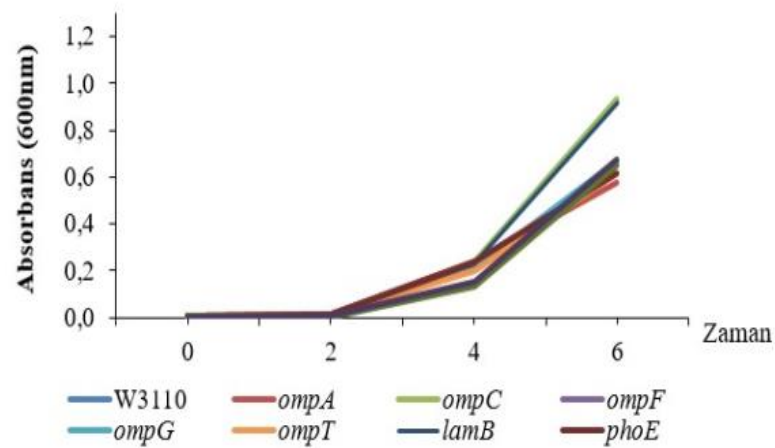
Metaller	MİK Konsantrasyonu($\mu\text{g/ml}$)
CdNO ₃	18,07 $\mu\text{g/ml}$
Co Cl ₂	74,35 $\mu\text{g/ml}$
CuSO ₄	234,37 $\mu\text{g/ml}$
MnSO ₄	405,6 $\mu\text{g/ml}$

3.3 Mutantların Metaller Üzerine Etkisinin Büyüme Grafiği ve Petride Dilüsyonu

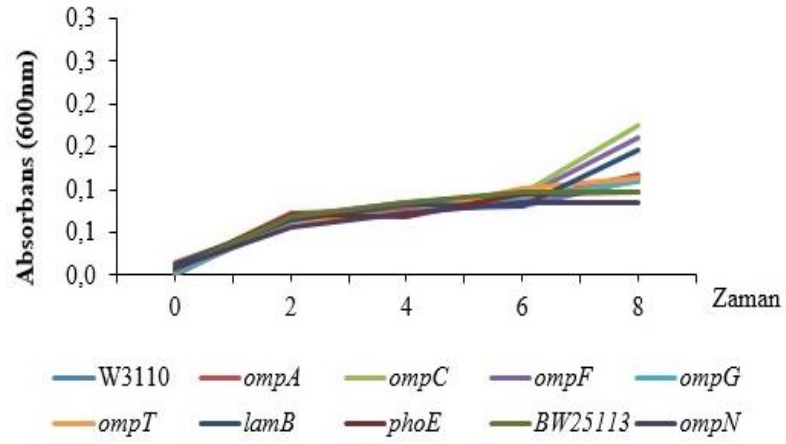
Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantların metaller üzerinde etkisi belirlenmeden önce normal şartlardaki büyüme grafiği Şekil 10'daki gibi çizildi Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantlar belirlenen MİK3/4 değerindeki metallerin varlığında büyüme grafikleri Şekil 11-17'deki gösterildiği gibi çizildi.



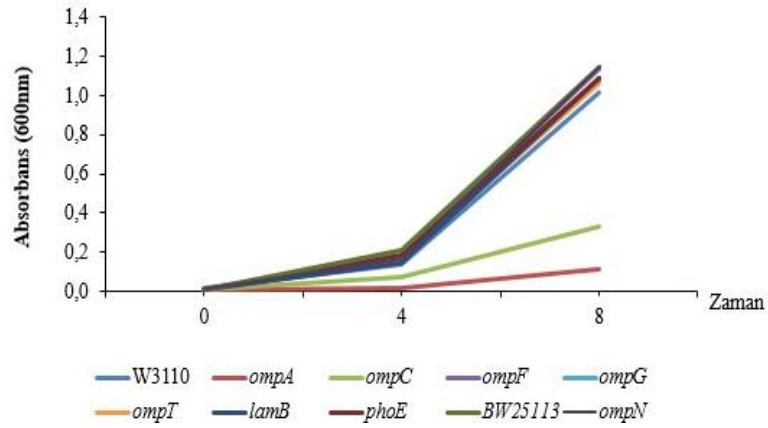
Şekil 10 Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantların normal şartlardaki büyüme grafiği



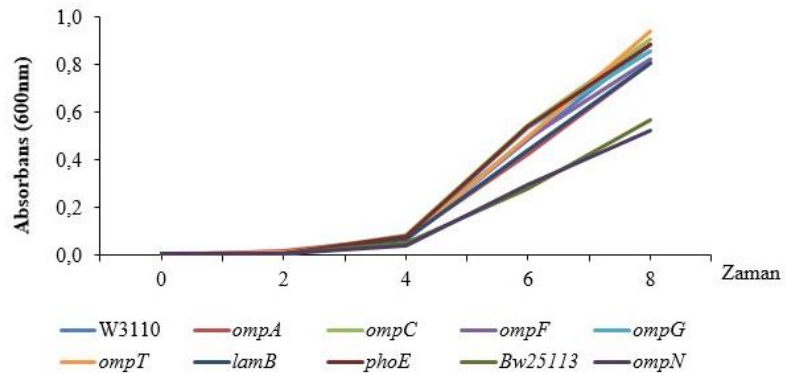
Şekil 11 Yabancıl tip *E. coli* W3110 ve mutantların bakır (Cu) metali varlığında büyüme grafiği



Şekil 12 Yabanıl tip *E. coli* W3110 ve mutantların mangan (Mn) metali varlığında büyüme grafiği

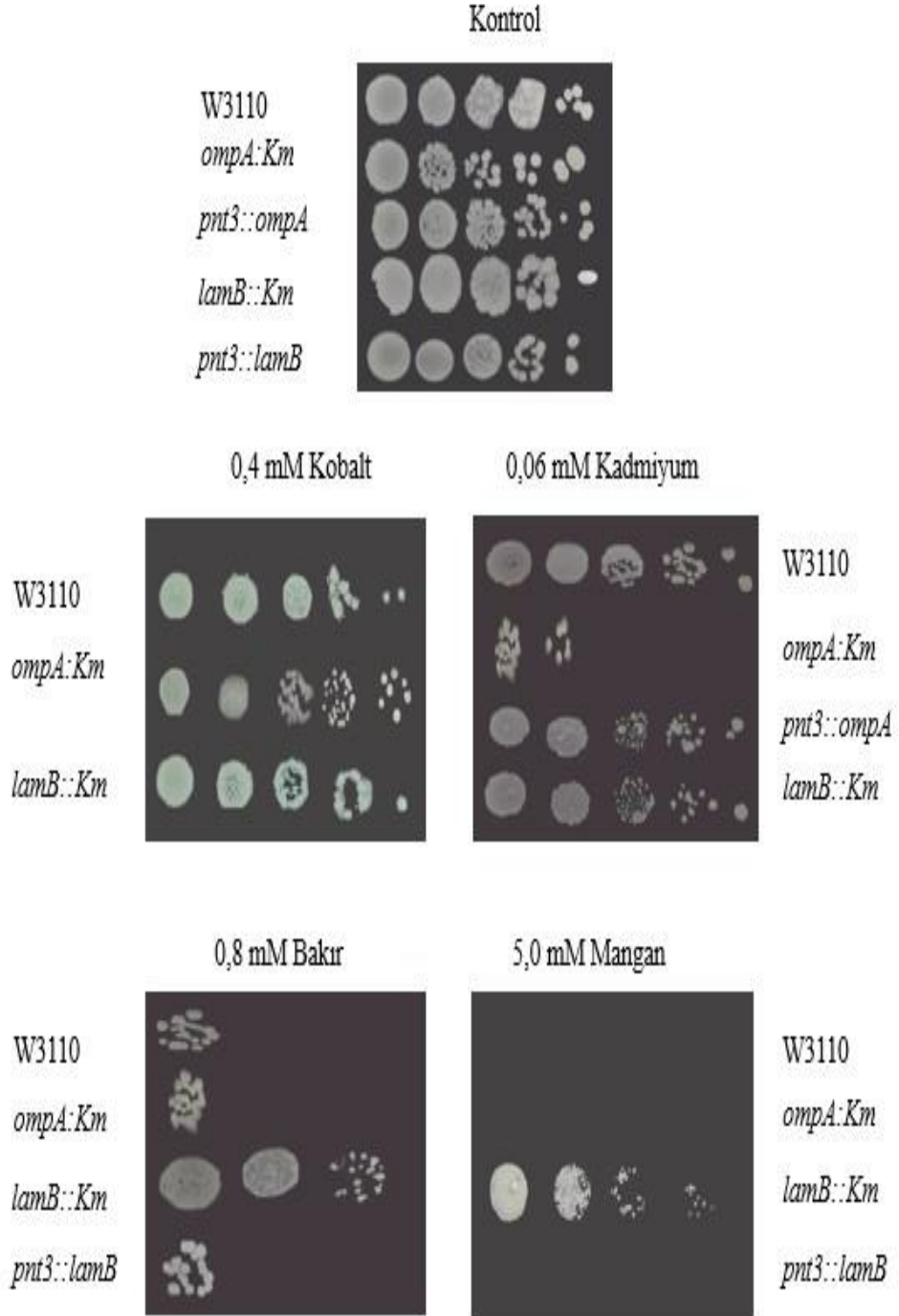


Şekil 13 Yabanıl tip *E. coli* W3110 ve mutantların kadmium (Cd) metali varlığında büyüme grafiği

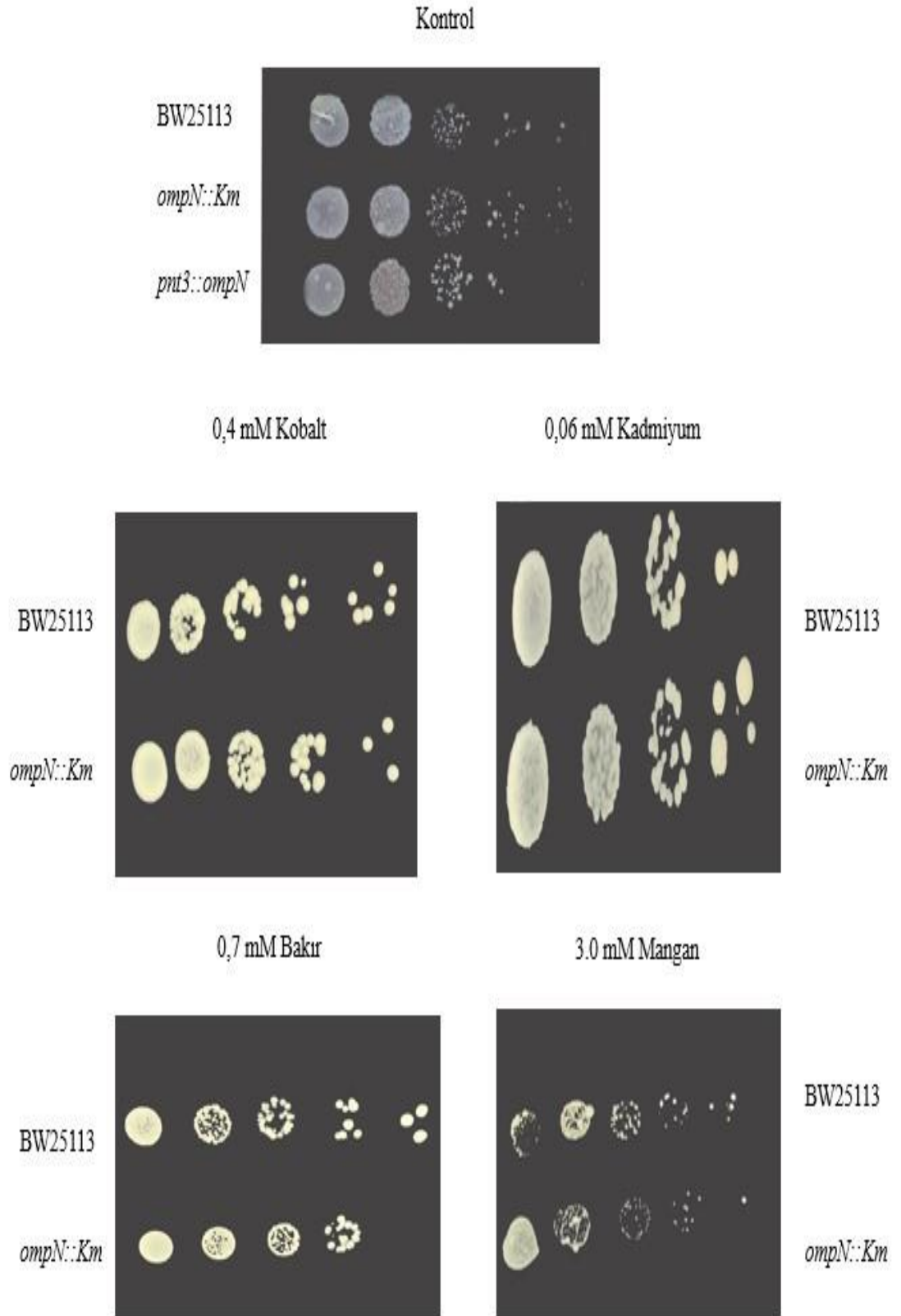


Şekil 14 Yabanıl tip *E. coli* W3110 ve mutantların kobalt (Co) metali varlığında büyüme grafiği

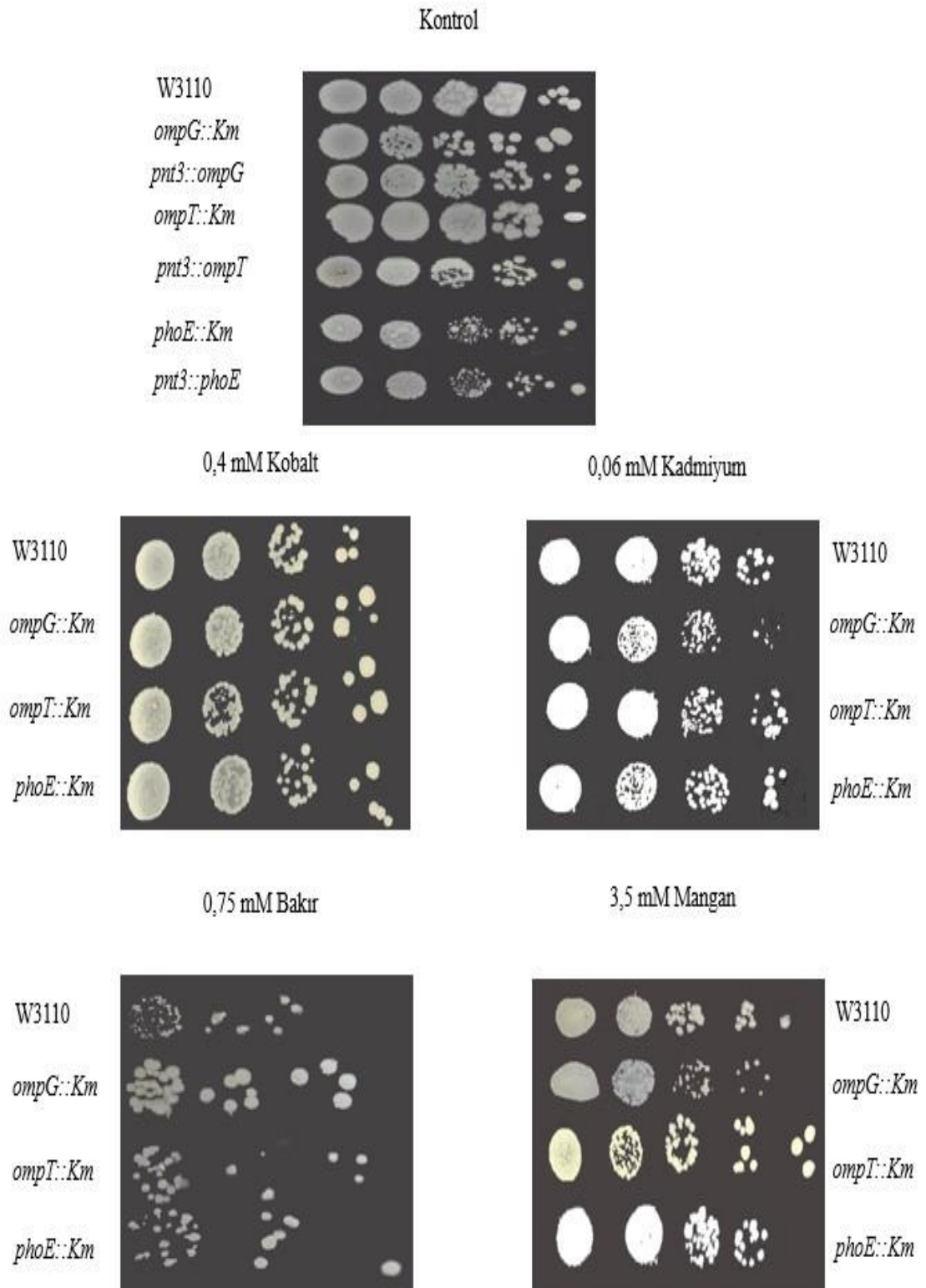
Aynı bakteriler üzerine belirlenen 3 farklı metal konsantrasyonlarında yapılan petride dilüsyon yönteminden sadece net şekilde belli olanlar Şekil 15-18'de gösterildi.



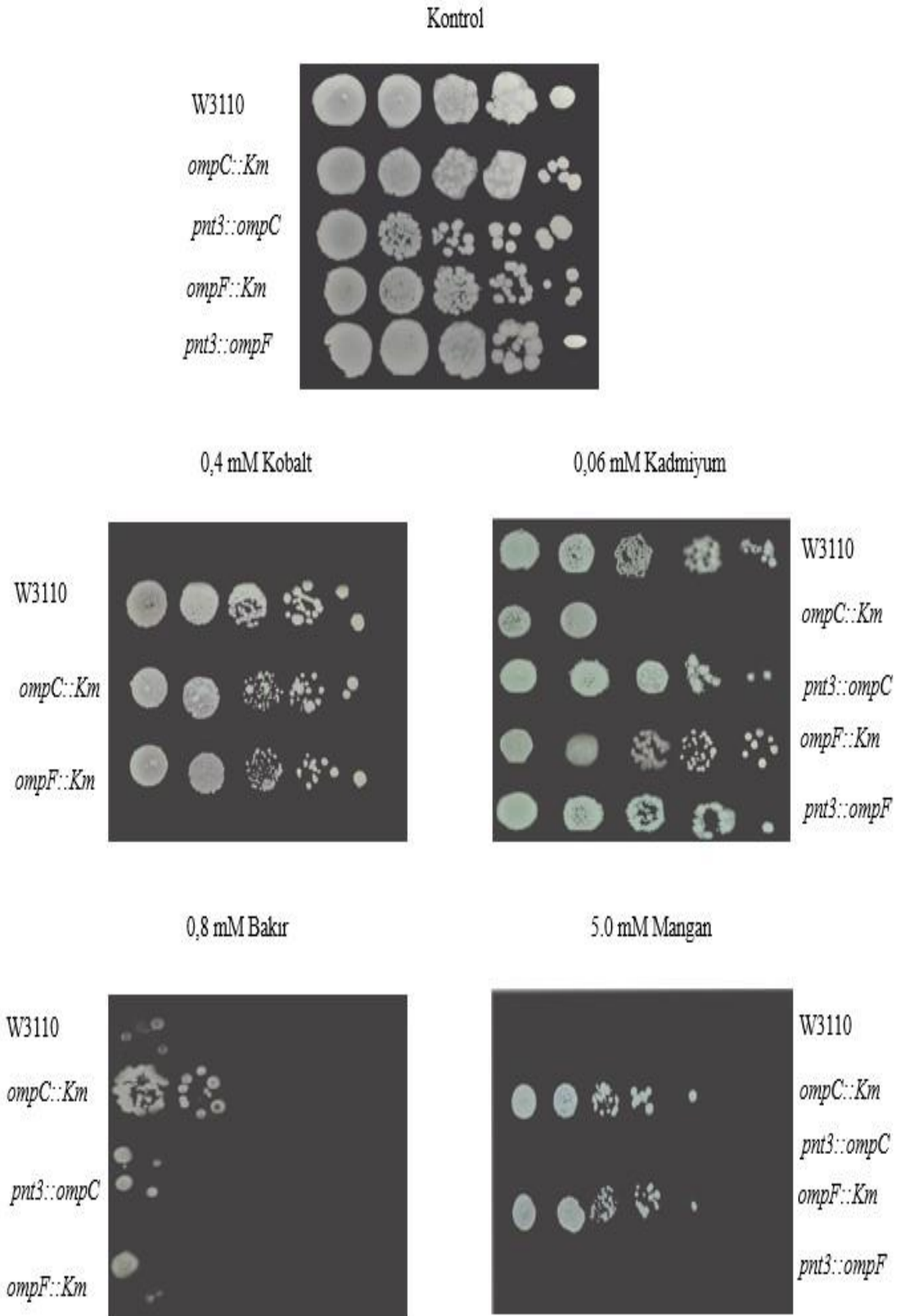
Şekil 15 Yabancıl tip *E. coli* W3110, *ompA::Km* ve *lamB::Km* mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu



Şekil 16 Yabancıl tip *E. coli* BW25113 ve *ompN::Km* mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu



Şekil 17 Yabancıl tip *E. coli* W3110, *ompG::Km*, *ompT::Km* ve *phoE::Km* mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu



Şekil 18 Yabancıl tip *E. coli* W3110, *ompC::Km* ve *ompF::Km* mutantlarının metal varlığında petri dilüsyonu

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

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 önemde 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 yeresahip 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 içine alımının engellenmesi, ya hücre dışına atılmasının artırılması, ya da çeşitli yollarla detoksifiye edilmesinin sağlanmasıdır. Farklı metaller için bu yollardan bazıları

kullanılarak direnç geliştirilmektedir. Bu proje kapsamında gram negatif bir bakteri olan *Escherichia coli* ve mutantları üzerine bakır, kobalt, mangan ve kadmiyum metalinin etkileri araştırılmıştır.

Porinler ile ilişkili olarak yukarıda da açıklandığı gibi farklı stres şartlarında çalışmalar yapılmış ve çoğunlukla da OmpC ve OmpF porinlerinin rolleri belirlenmiştir. Fakat birçok çalışmaya rağmen farklı metallere karşı hücreyi koruması ile ilgili literatürde herhangi bilgiye henüz rastlanılmamıştır. *E. coli*'de dış membran kanal proteini olarak görev yapan OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, OmpN, LamB, ve Pho E porin proteinlerinin metal alımında da görevleri olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak *ompC* ve *ompF* mutantları ile yapılan ön denemelerimiz sonucunda metal direncinde rollerinin olduğu tespit edildi. Dolayısı ile bu projede *E. coli*'deki OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, OmpN, LamB, ve PhoE porin proteinlerinin kadmiyum, bakır, mangan ve kobalt metalleri üzerindeki rolleri araştırıldı. Sonuç olarak; herhangi bir metalin varlığında *ompG*, *ompT*, *phoE* ve *ompN* genlerinin mutantları yabancıl tip *E.coli* W3110'den farklı sonuç vermediği tespit edilmiştir. Kobalt metal varlığında (0,4 mM) herhangi bir mutant yabancıl tip *E.coli* W3110'den farklı değildir. Kadmiyum metal varlığında (0,06 mM) *ompA* ve *ompC* mutant hücrelerinin duyarlılık kazandığı belirlenmiştir. Mangan metal varlığında (5 mM) *ompF*, *ompC* ve *lamB* mutant hücrelerinin direnç kazandığı belirlenmiştir. Bakır metal varlığında (0,8 mM) ise, *ompC* ve *lamB* mutant hücrelerinin direnç kazandığı belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda hem büyüme grafiğinde hem de petride dilüsyon deneylerinde yabancıl tip *E.coli* W3110 ve mutantların metal varlığındaki etkileri ortaya konularak birbirini doğrulamıştır.

5. KAYNAKLAR

Achouak, W., Heulin, T. and Pages, J. M., 2001. Multiple facets of bacterial porins. FEMS Microbiology Letters, 199, 1-7.

Alekshun, M. N. and Levy, S. B., 1999. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. Trends in Microbiol. 7 (10), 410-413.

Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M. and Delihias, N., 1989. The function of micF RNA: micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 17961-17970.

Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayınları seri 46, Ankara, 548 s.

Bainbridge G, Mobasheri H, Armstrong G A. Lea E.J.A. and Lakey J H. 1998a. Voltage-gating of *Escherichia coli* porin: a cysteine-scanning mutagenesis study of Loop 3. J. Mol. Biol. 275, 171-176.

Bainbridge, G., Gökce, I. and Lakey, J. H., 1998b. Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin B barrel membrane channels. FEBS Lett. 431, 305-308.

Bauer K., Struyve M., Bosch J., Benz, R. and Tomassen J., 1989. One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 16393-16398.

Bernstein, H. D., 2000. The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. Curr. Opinion Microbiol. 3, 203-209.

Bruins, R. M., Kapil, S. and Oehme W. F., 2000. "Microbial Resistance to Metals in the Environment", Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, 198-207

Cohen, S. P., McMurry, L. M. and Levy, S. B., 1988. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170 (12),5416-5422.

Cowan S. W., Schirman T., Rummel G., Steiert M., Ghash R., et al., 1992. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. Nature, 358, 727-733.

Darcın, C., 1999. Deniz suyunda dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *Escherichia coli* ML30 ve *Salmonella typhimurium* LT2 bakterilerinin protein sentezine olan etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 71 s.

Darcın, C., Özkanca, R., Şahin, N., Işık, K., ve Karıptaş, E., 2001. Dezenfektan özellikteki bazı kimyasal maddelerin deniz suyundaki *Escherichia coli* ML30 ve *Salmonella typhimurium* LT2'nin dış membran protein sentezine etkisi. Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25 (2), 57-66.

Delcour, A. H., 1997. Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. *FEMS Microbiology Letters*, 151, 115-123.

Delihhas, N. and Forst, S., 2001. MicF: An antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J. Mol. Biol.* 313, 1-12.

Dumas, F., Koebnik, R., Winterhalter, M. and Van Gelder, P., 2000. Sugar transport through maltoporin of *Escherichia coli*, Role of polar tracks. *J. Biol.Chem.* 275 (26), 19747-19751.

Dutzler, R., Wang, Y. F. and Rizkallah, P. J., 1995. Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure*, 4, 127-134.

Faber, F., Egli, T. and Harder, W., 1993. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol. Letters*, 111, 189-196.

Fajardo, D. A., Cheung, J., Ito, C., Sugawara, E., Nikaido, H., et al., 1998. Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K-12 porin protein, OmpG, which produces unusually large channels. *J. Bacteriol.* 180 (19), 4452-4459.

Ferenci, T., 1999. Regulation by nutrient limitation. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 208-213.

Garavito, R. M. and Rosenbusch J. P., 1980. Three dimensional crystals of an integral membrane proteins an initial X ray analysis. *J. Cell Biol.* 86, 327-329.

Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, Lähteenmäki K, Korhonen TK., 2009. "Invited review: Breaking barriers--attack on innate immune defences by ompT surface proteases of enterobacterial pathogens". *Innate Immun* 15 (2): 67–80.

Heyde, M. and Portalier, R., 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12 by pH. *Mol. Gen. Genet.* 208, 511-517.

Heyde, M., Lazzaroni, J. C., Magnouloux, B. B. and Portalier, R., 1988. 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.

Kılıç, K. N. and Dönmez, G., 2008. "Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması" *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR, 06: 27-33.

Koebnik, R., 1999. Structural and functional roles of surface exposed loops of the barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 3688-3694.

Koebnik, R., Locher, K. P. and Van Gelder, P., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37(2), 239-253.

Le Dain, A. C., Hase, C. C., Tommassen, J. and Martin, B., 1996. Porins of *Escherichia coli*: unidirectional gating by pressure. *EMBO J.* 15, 3524-3528.

Liu, N. and Delcour H., 1998. The spontaneous gating activity of OmpC porin is affected by mutations of a putative hydrogen bond network or of a salt bridge between the L₃ loop and the barrel. *Protein Eng.* 11, 797-802.

Liu, X. and Ferenci, T., 1998. Regulation of porin mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180 (15), 3917-3922.

Liu, X. and Ferenci, T., 2001. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. *Microbiology*, 147, 2981-2989.

Lugtenberg, B. and Van Alpen, L., 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 737, 51-115.

Lugtenberg, B., Meyer J., Peters R., van der Hoek, P. and van Alphen, L., 1975. Electroforetic resolution of the "major outermembrane protein" of *E. coli* K12 into four bands, *FEBS Lett.*, 58:254-258..

Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. and Berendsen, W., 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 147 (3), 251-262.

McCleary, W. R., Stock, J. B. and Ninfa, A. J., 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 175 (10), 2793-2798.

Meyer, J. E. W. and Schulz G. E., 1997. Energy profile of malto oligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from statistical analysis of saccharide protein interactions. *Protein Science*, 6, 1084-1091.

Nakae, T., 1976. Identification of outer membrane protein of *Escherichia coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 877-884.

Özkanca, R. and Flint, K. P., 2002. The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 533-537.

Özkanca, R., 1993. Survival and physiological status of *Escherichia coli* in lake water under different nutrient conditions, Ph D., Department of Biological Sciences, University of Warwick, England, p. 297.

Özkanca, R., 1996. Metabolik olarak aktif fakat kültürü yapılmayan *Escherichia coli*'nin göl suyundaki yaşamı ve determinasyonu. *Tr. J. of Biology*, 20, 87-97.

Prilipov A., Phale P. S., Koebnik R., Widmer, C. and Rosenbusch J. P., 1998. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* B^E. *J. Bacteriol.* 180 (13), 3388-3392.

Ramani, N. and Boakye, K., 2001. Salicylate inhibits the translation and transcription of *ompF* in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 47, 1053-1057.

Rosner, J.L., Chai, T.J., and Foulds J., 1991. Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173 (18), 5631-5638.

Rupprecht, K.R., Gordon, G., Lundrigan, M., Gayda, R.C., Markovitz, A., and Earhart, C., 1982. *ompT*: *E.coli* K12 structural gene for protein a (3b). *J. Bacteriol.* 153(2): 1104-1106.

Schnaltman, C.A., 1974. Outer membrane proteins of *E. coli* III. Evidence that the major protein of *E. coli* 0111 outer membrane consists of four distinct polypeptide species. *J. Bacteriol.* 118:442-453.

Schirmer, T., 1998. General and specific porins from bacterial outer membrane. *J. Struct. Biol.* 121, 101-109.

Shrivastava, A., Singh, V., Jadon, S., Bhaduria, S., 2013. "Heavy metal tolerance of three different bacteria isolated from industrial effluent" Ankita Shrivastava, *IJPRBS*, 2(2): 137-147.

Slauch, J. M., Garrett, S., Jackson, D. E. and Silhavy T. J., 1988. EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170 (1), 439-441.

Soares, C. M., Björkstén, J. and Tapia, O., 1995. L₃ loop mediated mechanism of pore closing in porin. *Protein Eng.* 8, 5-12.

Thomas A. D. and Booth I. R., 1992. The regulation of the porin gene *ompC* by acid pH. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1829-1835.

Van Gelder, P., Saint, N. and Van Boxel, R., 1997. Pore functioning of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*: Mutagenesis of constriction loop L₃. *Protein Eng.* 10, 699-706.