

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(ANADOLU ÜNİVERSİTESİ İLE YÜRÜTÜLEN ORTAK PROGRAM)

***Escherichia coli* W3110'DA PORİN PROTEİNLERİNİN (OmpA, OmpC, OmpF,
OmpG, OmpT, LamB ve PhoE) METAL STRESİNDEKİ ROLLERİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

GÜLÇİN ÇETİN KILIÇASLAN

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2023

10552362

T.C.
BİLECİK ŐEHY EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(ANADOLU ÜNİVERSİTESİ İLE YÜRÜTÜLEN ORTAK PROGRAM)

***Escherichia coli* W3110'DA PORİN PROTEİNLERİNİN (OmpA, OmpC, OmpF,
OmpG, OmpT, LamB ve PhoE) METAL STRESİNDEKİ ROLLERİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

GÜLÇİN ÇETİN KILIÇASLAN

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2023

10552362

BEYAN

“*Escherichia coli* W3110’da Porin Proteinlerinin (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB ve PhoE) Metal Stresindeki Rollerinin Belirlenmesi” adlı doktora tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	<input checked="" type="checkbox"/>	DESTEK ALINMAMIŞTIR	<input type="checkbox"/>
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)		2015-01.BŞEÜ.04-02 (BAP)	
2- TÜBİTAK		120Z902 (TÜBİTAK 1002)	
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/.....	

Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN

Tarih

.....

İmza

.....

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren Sayın danışman hocam Prof. Dr. Cihan DARCAN'a;

Tez izleme komitemde yer alarak değerli görüşleri ile araştırmamın şekillenmesini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Semra İLHAN ve Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e; bunun yanında tez savunmama katılarak kritik noktaları eleştiren ve tezimin son şeklini almasını sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Prof. Dr. Önder İDİL'e;

Tez çalışmamın bir bölümünde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bir eş danışman gibi yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın hocam Doç. Dr. Rafiq GURBANOV'a;

Doktora çalışmalarını gerçekleştirebilmem için gerekli olan maddi desteği, 1002 kodlu 120Z902 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK ve 2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu proje ile destekleyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi'ne

Doktora eğitimim boyunca kendi bilgi ve tecrübeleri ışığında bana yol gösteren, yeri geldiğinde sosyal yeri geldiğinde bilimsel aktivitelerde yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ'ye;

Doktora çalışmalarımın son zamanlarında yanımda olan derdimi ve mutluluğumu paylaşarak desteğini gösteren Duygu BEKİRCAN ESKİ'ye; doktora tezimin özellikle yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Fırat Yavuz ÖZTÜRK'e; laboratuvar çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ ve Öğr. Gör. Osman TÜRKYILMAZ'a;

Doktora serüvenimin sonlarında bana olan manevi destekleri ile yanımda olan, değerli öğrencilerim Öğr. Gör. Sevinç KARAÇAM KOŞ ve Muhammed KOÇ'a;

Üniversite hayatım boyunca, beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için akademik camiada yer alan hocalarıma;

Beni sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek bu günlere getiren ve benden hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan annem Zübeyde ÇETİN, babam Erol ÇETİN ve abim Erçin ÇETİN ve ailesine; evlendikten sonra hayatıma giren, gelin olarak değil bir kızları olarak gören, sevgilerini, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen ikinci ailem olan Fatma Annem, Hayrettin Babam, Ahmet ve Zahid abilerim ve ailelerine; kendimi en çıkmazda hissettiğim anda sürpriz bir şekilde gelerek hayatıma renk ve şans getiren biricik servetim kızım Asya KILIÇASLAN'a; hem çalışma hayatımda hem de aile hayatımda desteğini, sevgisini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, zor anlarımda uzaklarda olsa bile her şekilde yanımda olduğunu hissettiren ve en önemlisi bana olan güvenini asla kaybetmeyen kıymetli eşim Fatih KILIÇASLAN'a sonsuz teşekkürler.

Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN

2023

ÖZET

***Escherichia coli* W3110'DA PORİN PROTEİNLERİNİN (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB ve PhoE) METAL STRESİNDEKİ ROLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Metaller, canlılar için oldukça önemlidir. Genellikle metaller, temel biyolojik süreçler için önemli olan biyomoleküllerin yapısal veya katalitik bileşeni olarak görev almaktadır. Ancak çeşitli nedenlerden dolayı doğada biriken bakır, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, civa ve krom gibi ağır metaller, canlıları olumsuz etkileyen en önemli çevre sorunlarından biri haline gelmiştir. Hücredeki metallerin homeostazi, öncelikle hücre içine ve hücre dışına metal taşınmasının düzenlenmesi ile ilgilidir. Bu nedenle membran geçirgenliğinde rolü olan porin proteinlerinin metal direncinin gelişmesinde önemli rolü olacağı değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, *Escherichia coli* W3110'nun dış membran kanal proteinlerinden OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB, ve PhoE porin proteinlerinin kobalt, bakır, çinko, kadmiyum ve nikel metallerine karşı rolleri belirlendi. Bununla birlikte, metal homeostazında yer alan CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxAR ve CusSR proteinlerinin porin genleri üzerindeki rolleri araştırıldı. Çalışmada kullanılmak üzere *E. coli* W3110 mutantları ve komplement hücreleri elde edildi. Porin proteinlerinin kobalt, bakır, çinko, kadmiyum ve nikel metallerine karşı rolleri, yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının çoğalma ve yaşam deneyleri yapılarak belirlendi. Porin genlerinin ifadelerinin çalışılan metallerin varlığında değişimi ve bu değişimde CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxAR ve CusSR proteinlerinin rolü gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. Son olarak, zayıflatılmış toplam yansıtma (ATR)–Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılarak, metale maruz kalan yabancı *E. coli* W3110 ile farklı porin mutantlarında meydana gelen moleküler profiller karşılaştırıldı. Çalışmalar sonunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri GraphPAD Prism 8.3.0 programında 2way ANOVA testine göre yapıldı ve $P \leq 0.05$ sistemine göre önem dereceleri belirlendi. Çalışma sonucunda, genel olarak OmpA ve OmpC proteinlerinin yokluğu hücreyi duyarlı hale getirirken, OmpF ve LamB'nin yokluğu metale karşı direnci arttırdığı belirlendi. Bütün metal streslerinde, yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompA*, *ompC*, *ompF* genlerinin sentezinin azaldığı, *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezinin ise önemli derecede arttığı belirlendi. *ompT* geninin sentezi kadmiyum metalinde önemli derecede baskılandığı, *lamB*'nin ise Cu ve Zn varlığında sentezinin arttığı ancak Cd ve Co varlığında ise azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar, porin proteinlerinin metal direnci geliştirmede önemli rolü olduğunu göstermektedir. Cd stresinde önemli rolü olduğu belirlenen *ompF* ve *lamB* genlerinin baskılanmasında NikR'nin, *ompT*

geninin baskılanmasından ve *phoE* geninin artışından NikR ve CueR'nin; ve *ompG*'nin artışından ise NikR ve Zur'un rollerinin olduğu belirlendi. Co stresinde, *ompC* ve *ompF*'nin baskılanmasından NikR'nin, *phoE* ve *ompG*'nin artışından ise RcnR ve NikR'nin rolü olduğu görüldü. Cu stresinde, *ompA*'nın baskılanmasının CpxA ve CusSR'nin; *ompC*'nin baskılanmasının CueR ve CusS'nin; *ompF* ve *ompT* sentezlerinin baskılanmasının CusS'nin; *ompG*'nin artışının NikR ve CusR'nin ve *phoE*'nin ise artışının NikR, Zur, CpxR ve CusSR sisteminin kontrolünde olduğu tespit edildi. Ni stresinde, anlamlı olarak belirlenen *ompA*'nın baskılanmasında, *ompG* ve *phoE*'nin artışından CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin rolü olmadığı farklı bir düzenleyicinin kontrolünde olduğu belirlendi. Son olarak, Zn stresinde ise *ompA* ve *ompC*'nin NikR ve Zur'un, *ompT*'nin ise NikR tarafından kontrol edildiği tespit edildi. Bu çalışma, metallerin detoksifikasyon etkinliğini karakterize etmeye yardımcı olabilir ve biyoremediasyonda kullanılacak aktif canlı hücrelerin elde edilmesi için rehberlik edebilir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli* (*E. coli*), gen ekspresyonu, porin, metal stresi, kızılötesi spektroskopi

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE ROLE OF PORIN PROTEINS (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB and PhoE) UNDER METAL STRESS IN *Escherichia coli* W3110

Metals are very important for microorganisms. Generally, metals act as the structural or catalytic component of biomolecules important for basic biological processes. However, heavy metals such as copper, cadmium, lead, zinc, nickel, mercury and chromium, which accumulate in nature for various reasons, have become one of the most important environmental problems that negatively affect microorganisms. Homeostasis of metals in the cell is primarily concerned with the regulation of metal transport into and out of the cell. Therefore, porin proteins, which have a role in membrane permeability, have an important role in the development of metal resistance. In this study, the roles of outer membrane channel proteins OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB, and PhoE porin proteins of *E. coli* W3110 against cobalt, copper, zinc, cadmium and nickel metals were determined. In addition, the roles of CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxAR and CusSR proteins on porin genes, which are involved in metal homeostasis, were investigated. *E. coli* W3110 mutants and complement cells were obtained for use in the study. The roles of porin proteins against cobalt, copper, zinc, cadmium and nickel metals were determined by growth and survival experiments of wild type *E. coli* W3110 and porin mutants. The change in the expression levels of porin genes in the presence of the studied metals and the role of CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxAR and CusSR proteins in this change were determined by real-time PCR. Finally, using attenuated total reflectance (ATR)–Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, the molecular profiles occurring in wild *E. coli* W3110 exposed to metal and different porin mutants were compared. Statistical analyzes of the data obtained at the end of the studies were performed in the GraphPAD Prism 8.3.0 program according to the 2way ANOVA test and their significance levels were determined according to the $P \leq 0.05$ system. As a result of the study, it was determined that the absence of OmpA and OmpC proteins in general sensitized the cell, while the absence of OmpF and LamB increased resistance to metal. It was determined that the synthesis of *ompA*, *ompC*, *ompF* genes decreased, while the synthesis of *ompG* and *phoE* genes increased significantly in wild type *E. coli* W3110 at all metal stresses. It was determined that the synthesis of the *ompT* gene was significantly suppressed in cadmium metal, and the synthesis of *lamB* increased in the presence of Cu and Zn, but decreased in the presence of Cd and Co. These results show that porin proteins have an

important role in developing metal resistance. In the suppression of *ompF* and *lamB* genes, which were determined to have an important role in Cd stress, NikR and CueR from suppression of *ompT* gene and increase of *phoE* gene; and from the increase of *ompG*, it was determined that NikR and Zur had roles. It was observed that NikR from the suppression of *ompC* and *ompF*, and RcnR and NikR from the increase of *phoE* and *ompG* in Co stress. In Cu stress, the suppression of *ompA* resulted in CpxA and CusSR; suppression of *ompC* CueR and CusS; CusS inhibition of *ompF* and *ompT* syntheses; It was determined that the increase of *ompG* was under the control of NikR and CusR and the increase of *phoE* was under the control of NikR, Zur, CpxR and CusSR systems. It was determined that CueR, RcnR, NikR and Zur proteins did not have a role in the suppression of *ompA*, which was determined significantly in Ni stress, from the increase of *ompG* and *phoE*, but under the control of a different regulator. Finally, under Zn stress, *ompA* and *ompC* were found to be controlled by NikR and Zur, and *ompT* by NikR. This study can help characterize metals detoxification efficiency and guide for obtaining active living cells to be used in bioremediation.

Keywords: *Escherichia coli* (*E. coli*), gene expression, porin, metal stress, Infrared spectroscopy

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. Bakterilerde Hücre Zarfı	2
2.2. Porinler	4
2.2.1. Porinlerin yapıları ve çeşitleri.....	4
2.2.2. Porinlerin görevleri.....	7
2.3. Metal Stresi.....	24
2.4. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	28
3. MATERYAL METOT	29
3.1. Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması.....	29
3.1.1. Nutrient agar besiyeri	29
3.1.2. Nutrient brot besiyeri.....	29
3.1.3. Luria Bertani (LB) agar besiyeri	29
3.1.4. Luria Bertani (LB) brot besiyeri.....	29
3.1.5. Soft agar	29
3.1.6. DM agar	29
3.1.7. SOB medium	30
3.1.8. SOC medium.....	30
3.2. Kullanılan antibiyotiklerin hazırlanması	30
3.3. Kullanılan metallerin hazırlanması.....	30
3.4. Kullanılan diğer solüsyonların hazırlanması	30
3.4.1. PBS (Phosphate Buffered Saline).....	30

3.4.2.	Ringer solüsyonu	30
3.4.3.	TBE hazırlama.....	31
3.4.4.	TE hazırlama	31
3.4.5.	1 M Tris-HCl (pH 8) hazırlama	31
3.4.6.	EDTA (0,5 M, pH 8) hazırlama.....	31
3.4.7.	1 M L-arabinoz.....	31
3.4.8.	Mg ²⁺ (2 M)	31
3.4.9.	Tris-EDTA (1 M) ile doyurulmuş fenol.....	31
3.4.10.	X-gal hazırlama (5-brom-4klor-3indol-beta-D-galaktopironosid).....	32
3.4.11.	0,1 IPTG hazırlama (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid).....	32
3.4.12.	Primerlerin sulandırılması ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması	32
3.5.	Kullanılan <i>E. coli</i> Suşları.....	32
3.6.	<i>E. coli</i> W3110 Mutantlarının Eldesi	32
3.6.1.	Transdüksiyon ile mutant eldesi	34
3.6.2.	Koloni polimeraz zincir reaksiyonu (Koloni PZR)	35
3.6.3.	Tek gen delesyonu ile mutant elde edilmesi	35
3.6.4.	Tamamlanmış (komplementer) hücrelerin eldesi	40
3.7.	Metallerin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerlerinin belirlenmesi.....	42
3.8.	Porin mutantlarının yaşamı üzerine metallerin etkisi.....	43
3.8.1.	Büyüme deneyleri.....	43
3.8.2.	Petri damlatma deneyleri	43
3.9.	Porin mutantlarında metallerin meydana getirdiği biyomoleküler değişimler	43
3.9.1.	Hücrelerin büyütülmesi ve toplanması	43
3.9.2.	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) deneyleri ve analizi	43
3.10.	Metaller ile ilişkili CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxA, CpxR, CusS ve CusR proteinlerinin porin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi.....	44
3.10.1.	Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarının metal varlığında büyütülmesi ve örneklerin toplanması.....	44
3.10.2.	Total RNA izolasyonu ve cDNA eldesi.....	44
3.10.3.	Gerçek zamanlı PZR (qPZR)	46
4.	SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	47
4.1.	Sonuç	47
4.1.1.	Çalışmada kullanılan mutantların ve komplementer hücrelerin elde edilmesi	47

4.1.2.	Çalışmada kullanılan yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların büyüme grafiği	51
4.1.3.	Kadmiyum (Cd) stresi.....	51
4.1.4.	Kobalt (Co) stresi	66
4.1.5.	Bakır (Cu) Stresi.....	79
4.1.6.	Nikel (Ni) stresi	103
4.1.7.	Çinko (Zn) stresi.....	117
4.2.	Tartışma.....	131
4.3.	Öneriler	151
KAYNAKÇA		153

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar.....	33
Tablo 3.2. Koloni PZR reaksiyon karışımı.....	35
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan gen primerleri	36
Tablo 3.4. Koloni PZR koşulları	37
Tablo 3.5 Tek gen delesyon metodunda kullanılan gene primerleri	37
Tablo 3.6. PZR reaksiyon karışımı.....	38
Tablo 3.7. PZR koşulları.....	38
Tablo 3.8. DpnI enzimi reaksiyon karışımı ve koşulları	39
Tablo 3.9. Komplementer hücrelerin elde edilmesinde kullanılan primerler.....	41
Tablo 3.10. LIC yönteminde ligasyon reaksiyon karışımı ve koşulları.....	42
Tablo 3.11. DNase I reaksiyon karışımı ve koşulları	45
Tablo 3.12. cDNA sentezi reaksiyon karışımı.....	45
Tablo 3.13. cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	45
Tablo 3.14. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışımı.....	46
Tablo 3.15. Gerçek zamanlı PZR koşulları	46
Tablo 3.16. Gerçek zamanlı PZR’da kullanılan primerler	46
Tablo 4.1. <i>E. coli</i> W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine kadmiyum metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri	52
Tablo 4.2. <i>E. coli</i> W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine kobalt metalinin MİK ve MSK değerleri.....	66
Tablo 4.3. <i>E. coli</i> W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine bakır metalinin MİK ve MSK değerleri	79

Tablo 4.4. <i>E. coli</i> W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine nikel metalinin MİK ve MSK değerleri.....	103
Tablo 4.5. <i>E. coli</i> W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine çinko metalinin MİK ve MSK değerleri.....	117

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1 Gram negatif bakterilerin temsili bir hücre zarf yapısı	4
Şekil 2.2 <i>E. coli</i> ’ de trimerik porinin hücre dışı ve yan görünümüleri gösterilmektedir	6
Şekil 2.3. <i>E. coli</i> ’ de monomerik porinin hücre dışı ve yan görünümüleri gösterilmektedir	7
Şekil 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompA</i> , <i>ompC</i> , <i>ompF</i> ve <i>ompG</i> mutantlarının ileri (F)-geri (R) ve F-Kanamisin geri (K1) primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.....	48
Şekil 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>ompT</i> , <i>lamB</i> ve <i>phoE</i> mutantlarının F-R ve F-K1 primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.....	48
Şekil 4.3. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantlarının F-R primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.	49
Şekil 4.4. Elde edilen porin mutantlarının komplement hücrelerin pLATE51 plazmitine özgü primerler Ligasyon ileri (LIC F)- ligasyon geri (LIC R) ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.	50
Şekil 4.5. Elde edilen <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarının komplement hücrelerin pLATE51 plazmitine özgü primerler (LIC F-R) ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü	50
Şekil 4.6. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin metalsiz ortamdaki büyüme grafiği	51
Şekil 4.7. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> ve <i>ompC</i> mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cd metali varlığında büyüme grafiği.....	53
Şekil 4.8. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cd metali varlığında petride yaşam deneyi.....	53
Şekil 4.9. Kadmiyum stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabani tip <i>E. coli</i> W3110 hücrelerinde porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi.....	54
Şekil 4.10. Cd iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompA</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	55

Şekil 4.11. Cd iyonları varlığında ve yokluğunda yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompC</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	56
Şekil 4.12. Cd iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompF</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.	57
Şekil 4.13. Cd iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompG</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	58
Şekil 4.14. Cd iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompT</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.	59
Şekil 4.15. Cd iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>lamB</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	60
Şekil 4.16. Cd iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>phoE</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	61
Şekil 4.17. 3100-2800 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	62
Şekil 4.18. 1800-1700 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	63
Şekil 4.19. 1700-1600 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	63
Şekil 4.20. 1600-1400 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	64
Şekil 4.21. 1250-1200 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	65
Şekil 4.22. 1100-1000 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	65
Şekil 4.23. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve bütün porin mutant suşlarının Co metali varlığında büyüme grafiği	67
Şekil 4.24. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Co metali varlığında petride yaşam deneyi.....	67
Şekil 4.26. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompA</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	69

Şekil 4.27. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompC</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	69
Şekil 4.28. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompF</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	70
Şekil 4.29. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompG</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	71
Şekil 4.30. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompT</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	72
Şekil 4.31. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>lamB</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	73
Şekil 4.32. Co iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>phoE</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	74
Şekil 4.33. 3100-2800 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	75
Şekil 4.34. 1800-1700 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	76
Şekil 4.35. 1700-1600 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	76
Şekil 4.36. 1600-1400 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	77
Şekil 4.37. 1250-1200 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	78
Şekil 4.38. 1100-1000 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Co iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	78
Şekil 4.39. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> , <i>ompC</i> ve <i>ompF</i> mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cu metali varlığında büyüme grafiği.....	80
Şekil 4.40. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cu metali varlığında petride yaşam deneyi.....	80
Şekil 4.41. Bakır stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabani tip <i>E. coli</i> W3110 hücrelerinde porin genlerinin sentez seviyesi	81

Şekil 4.42. Cu varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompA</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	82
Şekil 4.43. Cu varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cpxAR</i> ve <i>cusSR</i> mutantlarında <i>ompA</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	83
Şekil 4.44. Cu varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompC</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	84
Şekil 4.45. Cu varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cpxAR</i> ve <i>cusSR</i> mutantlarında <i>ompC</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	85
Şekil 4.46. Cu varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompF</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	86
Şekil 4.47. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cpxAR</i> ve <i>cusSR</i> mutantlarında <i>ompF</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	87
Şekil 4.48. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompG</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	88
Şekil 4.49. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cpxAR</i> ve <i>cusSR</i> mutantlarında <i>ompG</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	89
Şekil 4.50. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>ompT</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	90
Şekil 4.51. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cpxAR</i> ve <i>cusSR</i> mutantlarında <i>ompT</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	91
Şekil 4.54. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cueR</i> , <i>rcnR</i> , <i>nikR</i> ve <i>zur</i> mutantlarında <i>phoE</i> geninin transkripsiyonel seviyeleri.....	94
Şekil 4.55. Cu iyonları varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve <i>cpxAR</i> ve <i>cusSR</i> mutantlarında <i>phoE</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri	95
Şekil 4.56. 3100-2800 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	96
Şekil 4.57. 1800-1700 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	97

Şekil 4.58. 1700-1600 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	98
Şekil 4.59. 1600-1400 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	99
Şekil 4.60. 1250-1200 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	101
Şekil 4.61. 1100-1000 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.....	102
Şekil 4.62. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> mutant suşu ve bu mutantın komplement hücrelerinin Ni metali varlığında büyüme grafiği.....	104
Şekil 4.63. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Ni metali varlığında petride yaşam deneyi	104
Şekil 4.64. Nikel stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabani tip <i>E. coli</i> W3110 hücrelerinde porin genlerinin sentez seviyesi	105
Şekil 4.65. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompA</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	106
Şekil 4.66. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompC</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	107
Şekil 4.67. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompF</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	108
Şekil 4.68. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompG</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	109
Şekil 4.69. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompT</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	110
Şekil 4.70. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>lamB</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	111

Şekil 4.71. Ni iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>phoE</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	112
Şekil 4.72. 3100-2800 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	113
Şekil 4.73. 1800-1700 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	113
Şekil 4.74. 1700-1600 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	114
Şekil 4.75. 1600-1400 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	115
Şekil 4.76. 1250-1200 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	116
Şekil 4.77. 1100-1000 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	116
Şekil 4.78. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> , <i>ompC</i> , <i>ompF</i> ve <i>lamB</i> mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Zn metali varlığında büyüme grafiği.....	118
Şekil 4.79. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Zn metali varlığında petride yaşam deneyi.....	118
Şekil 4.81. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompA</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	120
Şekil 4.82. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompC</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	121
Şekil 4.83. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompF</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	122
Şekil 4.84. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompG</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	123
Şekil 4.85. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>ompT</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	124
Şekil 4.86. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>lamB</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	125

Şekil 4.87. Zn iyonları varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantlarında <i>phoE</i> geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.....	126
Şekil 4.88. 3100-2800 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	127
Şekil 4.89. 1800-1700 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	128
Şekil 4.90. 1700-1600 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	128
Şekil 4.91. 1600-1400 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	129
Şekil 4.92. 1250-1200 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	130
Şekil 4.93. 1100-1000 cm ⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.	130
Şekil 4.94. Kadmiyum (Cd) stresine karşı Yabani tip <i>E. coli</i> W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması	137
Şekil 4.95. Kobalt (Co) stresine karşı Yabani tip <i>E. coli</i> W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması	140
Şekil 4.96. Bakır (Cu) stresine karşı Yabani tip <i>E. coli</i> W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması	145
Şekil 4.97. Nikel (Ni) stresine karşı Yabani tip <i>E. coli</i> W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması	147
Şekil 4.98. Çinko (Zn) stresine karşı Yabani tip <i>E. coli</i> W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması	150

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
ATR FT-IR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
cDNA	: Komplementer deoksiriboz nükleik asit
CpxRA	: CpxA ve CpxR'den oluşan iki bileşenli düzenleyici
CusSR	: CpxA ve CpxR'den oluşan iki bileşenli düzenleyici
DEPC'li dH₂O	: Dietil pirokarbonat ile işlenmiş
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
sn	: Saniye
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribo nükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
F	: İleri primer
R	: Geri primerleri
LIC-F	: Plazmite spesifik ligasyon ileri primerleri
LIC-R	: Plazmite spesifik ligasyon geri primerleri
ATR FT-IR spektroskopisi	: Zayıflatılmış toplam yansıma -Fourier dönüşümlü kızılötesi
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopironasid
Km	: Kanamisin

Cm	: Kloramfenikol
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
LB	: Luria Bertani
LPS	: Lipopolisakkaritler
Mg⁺²	: Magnezyum
MgCl₂	: Magnezyum klorür
M	: Molar
mM	: Milimolar
L	: Litre
mL	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
Mol	: Moleküler ağırlık birimi
NaCl	: Sodyum klorür
OD	: Optik dansite
IM	: İç membran (inner membrane)
OM	: Dış zar (outer membrane)
OMP	: Dış zar (outer membrane) proteinleri
OmpA	: Dış membran proteini A
OmpC	: Dış membran proteini C
OmpF	: Dış membran proteini F
OmpG	: Dış membran proteini G
OmpR	: Dış membran proteini R
OmpT	: Dış membran proteini T

OmpX	: Dış membran proteini X
LamB	: Malto porin
PhoE	: Dış zar fosforin
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	: Potansiyel hidrojen iyonu
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNase	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Taq Polimeraz	: <i>Thermus aquaticus</i> 'dan elde edilen polimeraz enzimi
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TRIS	: Tris (hidroksimetil) aminometan
Tris-HCl	: Tris hidroklorik asit
UidA	: Beta-glukuronidaz

1. GİRİŞ

Dünyada endüstrinin ilerlemesi ile birlikte ortaya çıkan atık ağır metaller, ciddi bir çevre kirliliğine neden olmaktadır. Topraklarda biriken bakır, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, civa ve krom gibi ağır metaller mikroorganizma, bitki, hayvan ve insan yaşamı için toksik konsantrasyonlarda olabilir. Ortamda bulunan aşırı ağır metaller, hücrelerdeki proteinlerin ve metabolik süreçlerin engellenmesinin de başlıca sebeplerinden biridir. Ancak bazı bakteriler, atık maddelerin içindeki metilen klorit ve kükürt gibi toksik maddelerle beslenir. Bilim insanları, bu tür bakterileri kullanarak ortamdaki toksik maddeleri uzaklaştırma işlemi olan biyoremediasyonu iki şekilde uygularlar. Bunlardan ilki; atıkların döküldüğü bölgeye besin aktarımı yapılarak, toprağın bakteri kompozisyonuna göre, hâlihazırda toprakta bulunan bakteriler etkin duruma geçirilir ya da ikinci olarak, toprağa yeni bakteriler aktararak, zararlı atıklar zararsız yan ürünlere dönüştürülür. Daha sonra toprakta etkin durumdaki bakteriler ya ölürler ya da sayıları normal popülasyon düzeyine gelir. Böylece ekolojik dengede korunmaktadır.

Bakterilerin doğada en sık karşılaştığı stres faktörlerinden birisi metal stresi olduğundan, metallere karşı direnç mekanizmaları 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. Bakteriler bu yollardan bazılarını kullanarak farklı metallere karşı direnç geliştirmektedirler. Bu direnci geliştirmede *E. coli*'de dış membranda bulunan kanal proteinlerinin bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle de çalışmada, *E. coli*'nin dış membran kanal proteinlerinden OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB, ve PhoE porin proteinlerinin kobalt, bakır, çinko, kadmiyum ve nikel metallerine karşı rollerinin olup olmadığı belirlenecektir. Metallere karşı rolü olduğu belirlenen porin proteinlerinin sentezinde metallerle direkt ilişkili kontrol mekanizmalarının nasıl rol oynadığı araştırılacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Bakterilerde Hücre Zarfı

Tüm hücreler, metabolik ve makromoleküler biyosentetik süreçlerin dış ortamlardan ayrılmasını sağlayan membranlar ile çevrilidir. Biyolojik membranlar, bileşimleri ve yapıları bakımından önemli ölçüde farklılık gösterebilirler de enerji üretimi, biyosentetik reaksiyonlar, sinyalizasyon, besin alımı ve aktif taşıma gibi çeşitli işlevlerin yerine getirilmesinden sorumludurlar.

Bakteriler hayatta kalabilmek için kendilerini koruyan, gelişmiş ve karmaşık bir hücre zarf yapısına sahiptir. Bakteri hücre zarfı, koruyucu özelliğinin yanı sıra dışarıdan içeriye besinlerin ve içeriden dışarıya atık ürünlerin seçici geçişine izin veren çok katmanlı bir yapıdır. Hücre zarfının yapısal bileşimine bağlı olarak, bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Gram-negatif bakteriler, kendisi lipopolisakkarit içeren bir dış zar ile çevrelenmiş ince bir peptidoglikan hücre duvarı ile çevrilidir. Gram-pozitif bakterilerin dış zarı yoktur, ancak Gram-negatiflere göre daha kalın peptidoglikan katman ile çevrilidirler (Galdiero vd., 2012a). Gram negatif bakterilerin, antibiyotikler, ağır metaller gibi toksik kimyasalların penetrasyonunu engelleyen ek bir bariyer olan dış membran bulundurması, Gram pozitif bakterilere göre, bu kimyasallara karşı toleransının daha fazla olmasında önem arz etmektedir (O'Shea & Moser, 2008).

Gram negatif bakterilerde hücre zarfı, dış zar (OM), periplazmik boşluk (PG) ve sitoplazmik membran (İM) olmak üzere üç bölüme ayrılır (Silhavy vd., 2010). İM, fosfolipidler ve proteinlerden oluşan çift katmanlı lipid tabakasıdır. Bakteriler arasında değişmekle birlikte, *E. coli*'de fosfolipid içeriğinin büyük çoğunluğu fosfatidiletanolamin (%75), fosfatidilgliserol (%15) ve kardiyolipin (%5)' den oluşmaktadır (Kanemasa, 1968; Yamagami vd., 1970). İM proteinleri, integral proteinler, periferik proteinler ve lipoproteinler olmak üzere üç tipte olur. Birçok İM proteini küçük moleküllerin taşınmasının yanında oksidatif fosforilasyon, lipid biyosentezi ve sensör proteini gibi çeşitli biyokimyasal süreçlerde de görev alır (Tokuda & Matsuyama, 2004).

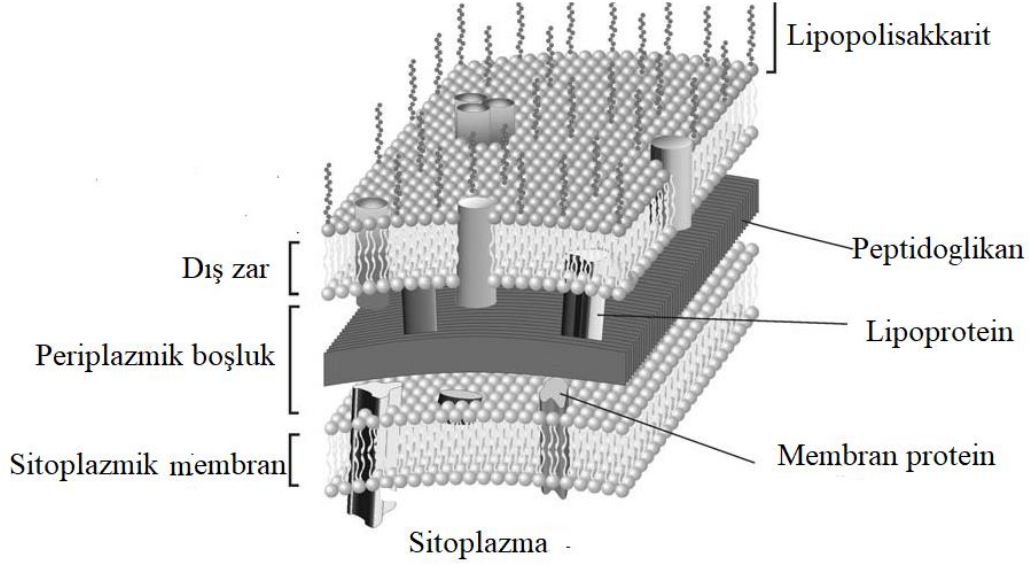
Sitoplazmik membran ile dış zar tabakası arasında periplazmik boşluk (PG) bulunmaktadır (Silhavy vd., 2006). PG, hücre hacminin yaklaşık %10' unu oluşturan bir bölümdür, peptidoglikan tabakası ve çözünür proteinler burada yer almaktadır (Mas vd., 2019). Periplazma, disülfür bağlarının oluşumunu katalize eden enzimleri içermesinden dolayı oksitleyici bir ortamdır (Nakamoto & Bardwell, 2004). Periplazmik proteinler, küçük

moleküllerin taşınmasında veya polimerlerin bileşiklere parçalanmasında görev alır. Hücrenin hayatta kalması için önemli olan birçok moleküler olay da periplazmada meydana gelir. Stres durumunda hücre zarfını oluşturan ve koruyan protein katlama ve taşıma faktörleri de burada bulunur (Duguay ve Silhavy, 2004; Mogensen ve Otzen, 2005). Ayrıca, çoğu iki bileşenli sistemin sensör proteinlerinin reseptör bölgeleri periplazmada bulunur (Hoch, 2000). Periplazmada gerçekleşen tüm bu olaylar, ATP'den yoksun olduğu için enerji olmadan gerçekleşir. Periplazmada yer alan peptidoglikan tabakası, hücre şekline katkıda bulunan ve hücrelerin az yoğun ortamda parçalanmasını önleyen bir hücre iskeleti görevi görür. Peptidoglikan tabakası oligopeptidlerle çapraz bağlanan glikan zincirlerinden oluşur ve Lpp (Braun'un lipoproteini) gibi peptidoglikan tabakasıyla ilişkili proteinler de bu yapıda yer alır (Braun, 1975; Vollmer & Höltje, 2004).

Gram negatif bakterilerin karakteristik bir özelliği olan dış zar (OM), yapısı ve bileşimi açısından benzersiz bir zardır. OM, yüzeysel olarak sitoplazmik zara benzeyen ve proteinleri de içerisinde barındıran bir çift lipid tabakasıdır. Ancak, dış zar ile sitoplazmik zarının yapıları arasında birçok farklılık bulunmaktadır. Sitoplazmik zar (İM), sitoplazma ve periplazma ile doğrudan temas halindeyken, dış zar (OM) periplazmayı dış ortamdan ayıran ve dış çevre ile direkt ilişkide olan zardır. OM, iç yüzeye bakan kısmı fosfolipitlerden ve dış yüzeye bakan kısmı esas olarak lipopolisakarit (LPS) olmak üzere glikolipitlerden oluşan çift tabakalı yapıya sahiptir. LPS, çift değerli Mg^{2+} ve Ca^{2+} katyonları ile çapraz bağlı negatif yüklü fosfat ve karboksilat gruplarını içermesi ile küçük moleküllerin geçirgenliğini fosfolipit tabakasına kıyasla 10 ile 100 kat azaltmaktadır (Snyder ve McIntosh, 2000). OM doymuş yağ asitleri ve fosfatidil etanolamin açısından zengin olduğundan, genel fosfolipit bileşimi İM'ninkinden biraz farklıdır (Kamio ve Nikaido, 1976; Smit vd., 1975). OM'nin yapısı, lipid A, kor polisakarit ve O antijen zincirlerinden oluşan LPS yapısının özellikleri ile birlikte çoğu hidrofilik ve hidrofobik özellikler taşıyan kimyasal maddelerin geçişi için zorlu bir bariyer oluşturur (Ishinaga vd., 1979; Lugtenberg & Peters, 1976; White vd., 1972). Bu da bakterilerin hayatta kalabilmesi için önemli bir özelliktir.

OM'de iki tip protein vardır. Bunlardan ilki OM'nin yaklaşık %90' ını oluşturan lipoproteinlerdir ve İM' nin dış yüzeyine bağlanan lipoproteinler gibi dış zarı alttaki peptidoglikan tabakasına sabitlemekle görevlidirler (Raetz ve Whitfield, 2002). İkinci tip protein olan integral dış zar proteinler (OMP'ler), integral İM proteinlerinden farklıdır. OMP'ler, α -sarmal transmembran alanları yerine, birçoğunun kanal olarak hizmet etmesine izin veren fiçi benzeri anti paralel β -plakalarına sahiplerdir (Schulz, 2002). Membranlar

hidrofilik çözünen maddeleri geçiremediği için, OMP' lerin oluşturduğu kanallar (porinler), besinlerin alınması ve atık ürünlerin atılması için hayati öneme sahiptir (Ruiz vd., 2008).



Şekil 2.1. Gram negatif bakterilerin temsili bir hücre zarf yapısı

Kaynak: (Galdiero vd., 2012)

2.2. Porinler

Dış zar, büyüme ve hücre fonksiyonu için küçük moleküllerin pasif alımına aracılık eden dış zar proteinlerini (OMP'ler) içerir (Nikaido, 2003; Pagès vd., 2008). Bu OM'nin protein kütesinin yaklaşık olarak %70' ini porinler olarak bilinen kanallar oluşturur ve tipik olarak hücre başına 10^4 - 10^6 kopyaya kadar bulunur (Prajapati vd., 2021; Zeth & Thein, 2010). Porinler, dış zardan hidrofilik moleküllerin pasif taşınmasını kolaylaştıran su dolu kanallardır. Bu proteinlerin esas olarak β -tabakalı yapılara (8 ila 26 iplikli) sahip olduğu ve besin alımı, atıkların dışa atımı, yapısal bütünlük, stres şartlarına karşı korumada ve OM biyogenezi dahil olmak üzere temel işlevleri yerine getirdiği bilinmektedir (Osborn ve Wu, 1980; Pavlova vd., 2016).

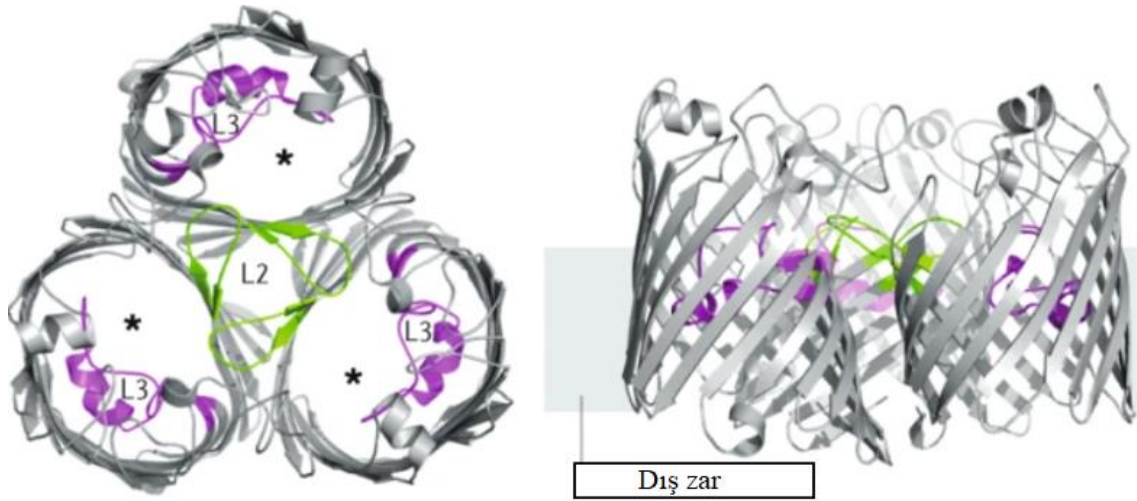
2.2.1. Porinlerin yapıları ve çeşitleri

Bakteriyel porinler uzun yıllardan beri çok detaylı olarak incelenmiştir; ilk olarak 1990' da yüksek çözünürlüklü X-ışını kullanılarak *Rhodobacter capsulatus*'un ana dış zar proteininin yapısı yayınlanmıştır (Weiss vd., 1990). Bu porinin yapısı, özdeş alt birimlerden oluşan homotrimerik yapıdadır. Her alt birim, bir gözenek içeren 16 sarmallı anti-paralel bir β -tabakalı yapıdan oluşur ve bu yapılar, hücre dışı tarafta bulunan sekiz ilmekten yalnızca

birinin (uzun ilmek L3) hücre içine katlanması ile birbirine bağlanarak kanal yapısını oluşturur. Bu L3 ilmeği, kanalın yüksekliğinin yarısında bir daralma bölgesi oluşturur ve önemli ölçüde gözeneklerin geçirgenliğine katkıda bulunur. Sonradan gerçekleştirilen çalışmalarda, küçük varyasyonlar olmakla birlikte yüksek benzerlik gösteren birçok porin yapısı belirlendi (Cowan vd., 1992; Weiss & Schulz, 1992).

Şimdiye kadar incelenen porinlerin çoğunluğu tipik olarak oval şekle sahiptir ve monomerik yapıları, ortalama en 30–35Å ve yükseklik 50 Å boyutlarındadır. Tüm bu proteinler, zarlarda fazlaca bulunmaları, artan termal kararlılık ve düzenli beta-tabaka yapı içeriği (%60 oranında) ve ayrıca düzlemsel membranlardaki spesifik geçirgenlik profilleri gibi birçok benzer özellikleri paylaşırlar (Zeth vd., 2000). Yapılarının genel özelliği, birinci ve son β-tabakaları anti paralel bir şekilde eşleştirilmesiyle kanalın oluşmasıdır. Tüm β-tabakaları, periplazmik boşlukta 7 veya 8 küçük dönüşle, hücre dışı tarafa bakan 8 veya 9 uzun ilmek (Loop, L) ile bağlanır. Tüm porinlerde, gözenek merkezindeki daralma, hücre yüzeyine maruz kalmayan ancak kanal kısmına geri katlanarak yerleştirilmiş uzun bir L3 ilmek tarafından oluşturulur. Kanalın ana hatlarını oluşturan rezidülerin (aminoasitlerin) türü, gözeneğin özgüllüğünü belirler. Tüm porinler, OM'de homotrimerler oluşturur; her alt birim bir kanal üretir ve bu nedenle üç kanal (trimer) içerir. Çoğu porin için, L1, L2 ve L4 ilmekleri, porin trimer içindeki monomer-monomer etkileşimleri için önemlidir. L3 ilmek iç kısımdadır, L5, L6 ve L7 ilmekleri yüzeyseldir; ilmek L8, dış tarafta kanal açıklığının oluşumuna katkıda bulunarak varilin iç kısmına geri katlanır. Yüzeysel ilmeklere karşılık gelen peptid dizileri, porinlerin biyolojik aktivitesinin çoğundan sorumludur. Diğer bir özelliği ise, dış ve sitoplazmik zar sınırlarında yer alan tirozin ve fenilalanin rezidülerine sahip aromatik halkaların varlığıdır. Tirozin rezidüleri dış bölgelerde daha sık bulunurken, fenilalanin rezidüleri asimetrik zarın periplazmik tarafında bulunur (Schulz, 1993). Bu aromatik halkalar ayrıca α-sarmal zar proteinlerinde de bulunur ve muhtemelen zarların kenarlarında ikincil yapı elemanlarını ayarlanmasından sorumludur (Elofsson & Von Heijne, 2007). Bu halkalar arasında yer alan ve lipid ortamına bakan rezidüer (örn. lösin, valin ve izolösin), çoğunlukla yüksek hidrofobik değerlerine sahiptir. Genellikle yüklü olan ilave halkalar, bakteri porinlerinde bulunur ve lipid baş grupları veya LPS molekülleri ile daha sıkı bir etkileşim kurarak etki edebilirler (Zeth vd., 2000). Hemen hemen tüm porinlerin C-ucunda, dış zarda içe taşıma ve katlanma için gerekli olan bir fenilalanin rezidüsü bulunmaktadır (Schleiff & Soll, 2005; Walther vd., 2009).

Gözenek çapı, genel porinler için 15 Å'ye kadar değişirken, yüksek seçicilikteki porinler için 6 Å'ye kadar değişmektedir. Büyük gözenekler, genellikle zıt taraflarında bulunan yüklü rezidüer sayesinde, gözenek deliğinde sınırlı bir elektrik alanı oluşturur. Bu alan, düşük polariteli çözünen maddeler için bir voltaj bariyerinin oluşmasını sağlar. Böylece bakteri, şekerler gibi büyük polar molekülleri toplamak için geniş bir por sunarken, antibiyotikler gibi istenmeyen polar olmayan molekülleri dışarıda bırakabilir. Gözenek özelliklerini nokta mutasyonları ile değiştirdiğini gösteren bir çalışmada, L3 ilmeğindeki mutasyon sonucunda sukroz porininin maltoporine doğru değiştiğini göstermişlerdir (Jeanteur vd., 1994).



Şekil 2.2 *E. coli*' de genel trimerik porinin hücre dışı ve yan görünümü

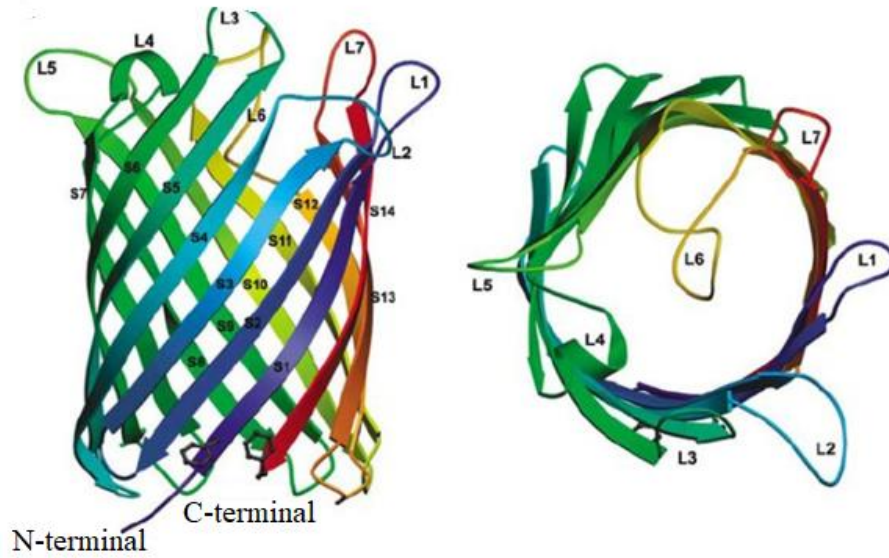
Kaynak: Protein Data Bank ID 2J1N. (Vergalli vd., 2020)

(Her bir porin monomerinin gözenekleri yıldızlarla belirtilmiştir. Porinler, dış zara gömülü halde olan β -tabakalarından (gri renkli) oluşur. Hücre dışı döngü L2 yeşil renklidir ve gözenek daraltıcı döngü L3 mor renklidir.)

Dış zarda belirli substratlara özgü gözenekler de bulunmaktadır. Bu sınıfın en iyi bilinen proteinleri, *Salmonella typhimurium*'da sü kroza özgü ScrY ve *E. coli*'de maltooligosakarite özgü maltoporin LamB'dir (Charbit, 2003; Forst vd., 1998). Her iki protein de 18 β -tabakalı antiparalel ipliklerden oluşan monomerlerle homotrimerler oluşturur. L3 ilmeği, varil içinde geri katlanır ve hidrofilik yüzeye maruz kalan ilmekler oluşturur. Genel porinlerden farklı olarak, gözenekleri 18 (16 yerine) β -tabaka içerir ve bazı dış ilmekler, alttaki gözeneği koruyan ve por girişini kısıtlayan bir şemsiye oluşturmak üzere

birleşerek onu maltodekstrinler şekline uyum sağlayabilen uzun bir gözenek haline dönüştürür (Galdiero vd., 2012b).

Porin yapıları tipik olarak protein ailesinin tanımına bağlı olarak 16 veya 18 β -plakalı tabaka yapıları içerir (Nikaido, 2003). ScrY veya LamB gibi şekere özel kanallar 18 β -tabakalıyken, Omp32, OprP ve PhoE gibi küçük ve çoğunlukla inorganik moleküllerin alımında yer alan kanallar 16 β -tabakalıdır (Korteland vd., 1982a; Moraes vd., 2007; Zachariae vd., 2006). Yeni araştırmalara göre, porinlerin 16'dan daha az sayıda β -tabakadan (8, 12 ve 14) oluştuğu belirlenmiş ve monomerik olmalarına rağmen, porin olarak sınıflandırılmıştır. Son zamanlarda OmpG'nin veya CymA'nın (14 β -tabakalı monomerik proteinler) farklı şekilde katlanan bir yapı gösterdiği ortaya koyulmuştur (Pajatsch vd., 1999; Yıldız vd., 2006a). Bu sayede, daha önce spesifik olmayanlar olarak sınıflandırılan bir dizi porinin küçük, tipik olarak negatif yüklü ligandları (organik asitler veya fosfatlar) bağladığı kanıtlanmıştır (Moraes vd., 2007; Zachariae vd., 2006).



Şekil 2.3. *E. coli*' de genel monomerik porinin hücre dışı ve yan görünümü

Kaynak: (Yıldız vd., 2006).

2.2.2. Porinlerin görevleri

Porinlerin fonksiyonel özellikleri 40 yılı aşkın bir süredir araştırma konusu olmuştur (Nikaido, 2003). Yapıları, konumları ve bakteri yüzeyindeki sayılarının fazla olması onlara birden fazla işlev sağlar (Achouak vd., 2001). Böylece porinler, bakteri hücrelerinin hızlı adaptasyonuna ve hayatta kalmasına izin vererek çeşitli biyolojik fonksiyonları etkileyebilir.

Dış zar (OM), Gram negatif bakterilerin ayırt edici özelliğidir. Sitoplazmik zarı ve peptidoglikan tabakasını çevreler ve en önemli işlevlerinden biri, iç ve dış ortam arasında geçirgenlik bariyeri oluşturmasıdır. OM, genellikle lipofilik moleküllerin girişini kısıtlamaktadır. Belirli boyutlardaki küçük hidrofilik moleküller, gözenek oluşturucu proteinleri kullanarak bariyerden geçebilir (Henderson vd., 2016). Öte yandan, sitoplazmik zar hidrofilik çözünenlere bir engel oluşturur, sadece özel taşıyıcıların varlığında geçişleri kolaylaştırabilir. Hücre zarfı geçirgenliğinin kritik önemine rağmen, hemen hemen tüm moleküller için giriş yolu sistematik olarak tanımlanmamıştır (Prajapati vd., 2021b). Besinler ve antimikrobiallar, dış zardan lipid çift tabakası veya porinler olmak üzere iki farklı yolla nüfuz edebilmektedir. Hidrofobik moleküller ağırlıklı olarak lipid yolunu kullanırken, hidrofilik moleküller porinleri tercih etmektedir (Domínguez-Medina vd., 2020; Im & Khalid, 2020).

2.2.2.1. Porinlerin seçici geçirgenlikleri

Gram-negatif bakteri, OM'de spesifik olmayan alım kanalları (veya porinler) içerir ve adından da anlaşılacağı gibi, nüfuz eden çözünenlere karşı bağlanma afiniteleri yoktur veya çok azdır (Kojima & Nikaido, 2013). Genel olarak, bu proteinler büyük çaplı (<10 Å) içi boş bir gözenek oluşturur ve 600 Da'dan küçük hidrofilik çözünenlerin konsantrasyon gradyanı boyunca pasif difüzyonuna izin verir (Acosta-Gutiérrez vd., 2018). *Rhodobacter capsulatus*'tan OmpF porinin (1.8 Å) ve *E. coli*'den OmpF ve PhoE porinlerinin (2.4 ve 3 Å) yüksek çözünürlüklü atomik yapılarının ortaya koyulmasından bu yana, çeşitli mikroorganizmalardan birçok spesifik olmayan kanal kristalize edilmiştir (Weiss, M. S.; Schulz, G. E 1992; Cowan vd.,1992). *E. coli*'deki OmpF, yapısal ve biyokimyasal olarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Yapısal olarak, OmpF kanalı (ve diğer genel porinlerin çoğu), bağımsız monomerlerin 16 sarmallı bir β-plaka oluşturduğu ve hücre dışı tarafta bulunan sekiz ilmekten yalnızca birinin katlandığı bir homotrimer oluşturur (bkz. Şekil 4A). Gözenek boyutunu azaltmak için kanala geri döner. Kanalin bu dar kısmı genellikle "kuşgözü" veya "daralma" bölgesi olarak adlandırılır. Her bir OmpF monomeri, kanalin merkezinde 6,5–7 Å çapında bir boşluk oluşturarak kanal eksenini boyunca kum saati şeklinde bir tünel oluşturur (Cowan vd., 1992). Enterobacteriaceae'deki porinler yıllardır araştırılmaktadır. Örneğin *E. coli* OmpF, yapısal ve biyokimyasal olarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Yapısal olarak, OmpF kanalı (ve diğer birçok genel porin), gözenek boyutunu azaltmak için hücre dışı tarafta bulunan sekiz ilmeğin yalnızca bir tanesi tabakaya geri katlanmaktadır. Kanalin bu dar kısmı genellikle "por" veya "daralma" bölgesi olarak

belirtilir. Her OmpF monomeri, kanalın merkezinde 6.5–7 Å çapında bir boşluk oluşturarak kanal eksenini boyunca kum saati şeklinde bir tünel oluşturur (Cowan vd., 1992). Ayrıca, yüklü amino asitlerin delikli bölge içindeki asimetrik dağılımı, yani L3 halkası üzerindeki asidik rezidüleri ve kanalın dış kısmındaki bazik rezidüleri, katyonlar ve anyonlar için farklı nüfuz etme yollarından sorumlu enine bir elektrik alanı oluşturur (Dhakshnamoorthy vd., 2010). *E. coli*'den iyi bilinen diğer iki porin olan OmpC (ozmoporin) (Baslé, vd., 2006) ve PhoE (fosfoporin) (Cowan vd., 1992), çok benzer yapıya sahiptir. OmpC, zayıf bir şekilde katyon seçicidir, OmpF'ye benzer, ancak kabaca 5,5–6 Å'lık daha dar bir halka bölgesi nedeniyle daha fazla boyut kısıtlayıcıdır. PhoE ise anyonları tercih eder ve fosfat açlığı koşullarında ifade edilmektedir. Bununla birlikte, OmpE35 ve OmpE36 (*Enterobacter cloacae*) (Arunmanee vd., 2016; Acosta-Gutiérrez vd., 2018), Omp35 ve Omp36 (*Klebsiella aerogenes*), OmpK35 ve OmpK36 (*K. pneumoniae*) (Acosta-Gutiérrez vd., 2018) ve OmpF (*S. typhi*) (Balasubramaniam vd., 2012) dahil olmak üzere diğer bakterilerden OmpF ve OmpC'nin yapısal ortologları, yapısal olarak çözülmüş ve ayrıca 16 sarmallı β-plaka kıvrımlarına ve benzer amino asit dağılımlarına sahip olduğu, bunun sonucunda tümünde zayıf bir katyon seçiciliğine neden olduğu bulunmuştur. Birçok genel porin ile karşılaştırıldığında, *Vibrio cholerae*'den OmpU ve OmpT'nin yapıları yeni özellikler ortaya çıkardı. Porin OmpU'nun kanalı, periplazmik taraftan başlayan genişletilmiş bir N-terminali tarafından kapatılırken, OmpT durumunda daralma bölgesi, büyük geçirgenlik bariyerleriyle sonuçlanan hücre dışı döngü L8 tarafından oluşturulur (Pathania vd., 2018).

İşlevsel olarak, spesifik olmayan kanallar, birçok antibiyotik sınıfı için birincil giriş yolunu oluşturur. Bu nedenle, bu gözeneklerde meydana gelen ve antibiyotik direncine yol açan yapısal modifikasyonları anlamak çok önemlidir (Prajapati vd., 2022). Şimdiye kadar, bir porinin antibiyotikli olarak sadece üç kristal yapısı (ampisilin, karbenisilin ve ertapenem ile OmpF) elde edilmiştir (Ziervogel, vd., 2013). Kristal yapıların az olmasının nedeni, kanallardan geçen çözünen maddelere karşı zayıf afiniteden kaynaklanmaktadır (Kojima ve Nikaido, 2013). Housden vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, OmpF ve OmpC kanallarının, OmpF içindeki OBS1 alanını (2-26 rezidüleri) kristalleştirerek, zayıf bir antimikrobiyal potansiyele sahip 83 kalıntı uzunluğunda bir polipeptit olan bakteriyosin kolikinin (ColE9) taşınması için nasıl kullanıldığını göstermektedir (Housden vd. 2010). Klinik veya klinik olmayan antibiyotiğe dirençli bakterilerde porinlerin yapısal modifikasyonları gösterilmiştir. Kolikine dirençli *E. coli* suşu durumunda, G119D mutasyonu tarafından L3 halkasının omurga yapısındaki değişikliklerin gözenek çapını ve ardından

kolikinin geçirgenlik oranını azalttığı bulundu. Kolikine N-dirençli *E. coli* suşunda, G119D mutasyonu tarafından L3 halkasının omurga yapısındaki değişikliklerin gözenek çapını ve ardından kolikinin geçirgenlik oranını azalttığı bulundu (Jeanteur, vd., 1994). Başka bir çalışmada, porin OmpK36'nın L3 döngüsüne iki amino asit eklenmesinin gözenek çapını %26 azalttığı ve *K. pneumoniae*'nin klinik izolatı ST258'de karbapenem direncine neden olduğu bulunmuştur (Wong, vd. 2019). OmpC' de, *E. coli*'nin klinik izolatlarından belirlenen dört mutant yapının, gözenek çapını değiştirmeden gözenekteki enine elektrik alanını değiştirerek sefotaksim, imipenem ve gentamisin dahil olmak üzere antibiyotiklerin geçirgenliğini azalttığı bulundu (Lou vd., 2011). Bu çalışmalardan, gözenek yapılarını değiştirmenin, ilgili organizmalar için antibakteriyel direnç kazanma ve hücrenin canlılığı için gözenek işlevselliğini koruma arasında bir uzlaşma olduğu sonucuna varılabilir.

Diğer işlevsellikler açısından, OmpF porininin, OM simetrisinin korunmasındaki rolü ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. OmpF'nin, iç yaprakçığa gömülü monomerik 20 Å kalınlığında halka biçimli bir protein olan MlaA proteini ile kararlı bir kompleks oluşturduğu bulunmuştur. MlaA'nın önce dış tarafta bulunan fosfolipitleri çekerek, ardından onları periplazmik boşluğa taşıyarak hareket ettiği gösterilmiştir. Böylece, bu fosfolipitler, OM'nin asimetrisini korumak için dış yaprakçıktan çıkarılır. Aynı zamanda, OmpF'nin bu süreçte doğrudan bir rolü olmadığı gösterildi. (Abellón-Ruiz vd. 2017). MlaA'nın neden OmpF ile bir kompleks oluşturması gerektiği şu anda belirsizliğini koruyor (Prajapati vd., 2022).

Besin taşınımında spesifik olmayan kanalların yapısal yönleri de incelenmiştir. Örneğin, ATP analogu AMP-PNP'nin, sükrözün ve galaktozun taşınması ile PorB'nin kristal yapıları çözülmüştür (Tanabe vd., 2010). Benzer şekilde, Sezyum-PorB, Ca²⁺-MOMP ve K⁺/Rb⁺/Mg²⁺-OmpF gibi birkaç farklı durumda porlarla iyon etkileşimleri araştırılmıştır (Dhakshnamoorthy vd., 2010; Yamashita vd., 2008). Ayrıca, moleküler düzeyde porinlerin LPS molekülleri ile etkileşimini anlamak için bazı çalışmalar da yapılmıştır. Örneğin, LPS moleküllerine sahip *E. cloacae*'de porin OmpE36'nın X-ışını yapısı, L4 ve L5 halkalarının yakınında iki bağlanma bölgesi olduğunu ortaya çıkarmıştır. OM'nin bütünlüğünü korumadaki önemli rolleriyle bilinen Ca²⁺ iyonları da burada bulunmaktadır (Arunmanee vd., 2016).

Diğer bir OM difüzyon kanalı, substrata özgü kanallardır. Bu kanallar yapıları gereği mikromolar aralıkta afiniteleri olan belirli substratlar için güçlü bağlanma (veya afinite) bölgelerinin varlığında bağlanabilir; bu da bu kanalları substrat konsantrasyonu düşük olduğunda bile çok etkili olmasını sağlar (Nikaido, 2003). Aynı zamanda, kanalın işlevi, ilgili substrat moleküllerinin taşınması olduğundan, bağlanma çok güçlü olmamalıdır. Spesifik

olmayan gözeneklerden temel bir fark olarak, spesifik kanallar yüksek substrat konsantrasyonlarında doygunluk gösterir. Başlangıçta, belirli kanalların 18 tabakalı bir β -varil mimarisine sahip olacağı düşünülmüştür, örneğin, *E. coli* LamB. Bununla birlikte, çeşitli bakterilerden çok sayıda spesifik kanal yapısının belirlenmesi, β iplikçiklerinin sayısı, gözenek çapları ve amino asit dağılımları açısından büyük bir çeşitlilik ortaya çıkarmıştır. Genel porinlerden farklı olarak, çoğu spesifik kanalda, birden fazla hücre dışı ilmeğin, yani genellikle iki ile dörde kadar içe doğru katlandığı, gözenek çapını düşürdüğü ve boyut sınırını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Genellikle ~ 200 Da veya daha düşük) (Eren vd., 2012).

Substrata özgü kanallarda, spesifik substratlara yönelik artan afinite, bazı kristal yapıların belirlenmesini sağlamıştır. Bu yapılar, ilgili taşıma süreçlerinin altında yatan moleküler özelliklerin karakterizasyonunun ortaya koyulmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Örneğin, Dutzler vd., (1996), farklı boyutlarda maltoz şekerleri ile 18 tabakalı homotrimerik LamB kanalının (maltoporin) ilk kristal yapısını belirlemişlerdir (Dutzler vd., 1996) Bu yapılar, aromatik rezidülerin, şeker moleküllerinin hidrofobik çekirdekleri ile taşınmasına yardımcı olduğunu ortaya çıkardı. Benzer özelliklere sahip bir diğer kanal ise *S. typhimurium*'dan belirlenen sükroza özgü ScrY kanalıdır (Forst vd., 1998). Benzer şekilde, *Vibrio harveyi*'den yakın zamanda belirlenen kitooligosakkarit alım kanalı VhChiP'de, aromatik kalıntıların şeker alımını yönettiği tekrar gösterilmiştir. Bu kanal kararlı bir trimer oluşturur, ancak LamB ve ScrY kanallarından farklı olarak her bir varil yalnızca 16 şeritten oluşur. Yeni bir özellik olarak, yaklaşık 20 rezidüden oluşan uzatılmış N-ucunun bitişik monomerlerden birine katlandığı bulundu (Aunkham vd., 2018).

P. aeruginosa'daki hem monofosfata özgü OprP hem de polifosfata özgü OprO kanalları, her bir monomerin 16 sarmallı bir β -varilli trimerik düzenekler oluşturur. Hücre dışı taraftan gözeneğin merkezine giden ve yine merdiven benzeri bir yapı oluşturan arginin rezidüleri içerirler (Modi vd., 2015). Bu "arginin merdiveni"nin, fosfatları düşük konsantrasyonlu bir ortamdan çekmek için gerekli olduğuna inanılıyor (Moraes vd. 2007). Buna karşılık, *Pseudomonas putida*'da olan şekere özgü OprB kanalı da 16 sarmallı bir varilden oluşur ancak monomeriktir. Ek olarak, Enterobacteriaceae'da bulunan şeker kanallarına (LamB ve ScrY) kıyasla, OprB gözeneği boyunca aromatik rezidülerinin olmaması, monosakkaritlerin polisakkaritlere göre daha çok seçici olmasını sağlamıştır (van den Berg vd. 2012)

Bakteriyel porinler, hidrofilik besinlerin ve antibiyotiklerin dış zar boyunca nüfuz etmesine izin verir, ancak aynı zamanda periplazmik boşluktan proton sızıntısına da katkıda

bulunur, bu da aktivitelerinin dinamik olarak düzenlenebileceğini düşündürür. Burada, *Escherichia coli*'de porin geçirgenliğinin periplazmik iyonlardaki değişiklikler tarafından kontrol edildiğini, periplazmik asitleştirme tarafından inhibe edildiğini, böylece elektron taşıma zinciri aktivitesi sırasında proton kaybını sınırladığını ve açlık sırasında arttırılarak besin alımını teşvik ettiğini gösteriyoruz. Glikozdaki büyüme, potasyum kanalını (Kch) aktive ederek periplazmik potasyumu arttırır, gelişmiş porin geçirgenliğini ve membran aksiyon potansiyellerini tetikler. Porin geçirgenliğinin bu metabolik kontrolü, lipid ortamında bakteriler büyüdüğünde antibiyotik duyarlılığındaki bilinen azalmayı açıklamaktadır. (Santiago vd., 2022)

2.2.2.2. Porinlerin direnç mekanizmalarındaki rolü

Bakterilerin antimikrobiyal moleküllere karşı dirençleri doğal olabildiği gibi sonradan da kazanılabilmektedir (Fernández & Hancock, 2012a). Doğal direnç, bakterilerin genetik yapısından kaynaklanmaktadır. Örneğin, bazı moleküller Gram-pozitif bakterileri etkilerken, Gram negatif bakterilerde bulunan dış zar (OM) ile moleküllerin geçişini önleyerek hedeflerine ulaşması engellenmiş olur (Tsuchido & Takano, 1988). Gram negatif bakterilerde OM'nin geçirgenliği değişkenlik göstermektedir. Örneğin, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia* bakterileri, *E. coli*'den 10 ila 100 kat daha düşük OM geçirgenliğine sahiptir. Bu durum, daha geniş OM kanallarının olmamasına bağlanmaktadır (Breidenstein vd., 2011). Sonradan kazanılmış dirençler ise, genellikle uygun olmayan koşullarla, örneğin antimikrobisidler veya dezenfektanlarla karşılaşılmasıyla indüklenir ve geri dönüşü olmayan genetik değişikliklere neden olur, bu da dikey olarak sonraki nesillere veya yatay olarak aynı nesille ve farklı bakterilere aktarılabilir (Darby vd., 2022). Direnç elde etmenin bir yolu, antimikrobiyal moleküllerin hücre içi birikimini azaltmaktır. Bu, molekülün hücre içine alımını azaltarak, örneğin *E. coli*'de OmpF kanalının aşağı regülasyonu (Jaffe vd., 1982b) veya dışarıya atımını artırarak olabileceği gibi, *E. coli*'de AcrAB-TolC gibi çeşitli akış pompalarının yukarı regülasyonu ile de başarılabilmektedir (H. Wang vd., 2001). Bakteriler ayrıca molekülleri modifiye eden enzimlerin ekspresyonu (Schwocho vd., 1995); enzimlerin hidrolizi (Tzouveleki vd., 2003), hedef protein modifikasyonları (Weigel vd., 2002) ve biyofilm oluşumu (Shigeta vd., 1997) gibi mekanizmalar sayesinde de direnç kazanabilirler.

Bugüne kadar, Gram negatif bakterilerin klinik izolatlarında porin bazlı direnç mekanizması tanımlanmıştır. Tüm bu çalışmalarda, antibiyotik translokasyonunda ilgili kanalların rolü, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) veya büyüme deneyleri,

elektrofizyoloji deneyleri, floresan deneyleri, jel elektroforezi ve genom analizi dahil olmak üzere farklı tekniklerin bir kombinasyonu kullanılarak tanımlamalar yapılmıştır. Literatürde yapılan birçok çalışma, özellikle karbapenem sınıfı antibiyotiklerin çoğu bakteride porin aracılı direnç mekanizmalarını tetiklediğini ortaya koymaktadır. Bu durum bileşiklerin moleküler boyutları, ilgili porin çapları ile ilişkilidir (Reck vd., 2019; Ruggiu vd., 2019). Ayrıca, belirli antibiyotiklere karşı dirençte sıklıkla birden fazla porinin rol oynadığı da belirtilmelidir. Aynı zamanda, bu porlardan birinin bile kaybının, ilgili antibiyotik molekülünün etkisizliği ile sonuçlanabileceği yaygın olarak görülmektedir. Bakteriler, özellikle antimikrobiyal moleküllerin alımını azaltmak için çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir (David vd., 2019; Rocker vd., 2020; Vergalli vd., 2020b).

Antibiyotiklerin hücreye girebilmesi için, antimikrobiyal türüne bağlı olarak farklı mekanizma yolları ile gerçekleşebilen dış zar bariyerini aşması gerekir (Hancock, 1987). Hidrofilik antibiyotiklerin ana giriş yolu, dış zar proteinlerinin oluşturduğu su dolu kanallardır. Bu nedenle, bir hücrenin sahip olduğu porinlerin sayısı ve türü, geçirgenliği ve dolayısıyla mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığını veya direncini belirleyecektir. Örneğin, antimikrobiyallere karşı yüksek direnç seviyeleri ile bilinen *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*, birçok antibiyotiğe karşı genel dirençlerinin temelini oluşturan düşük zar geçirgenliğine sahiptir. Bu nedenle, porinlerin ekspresyonunu ve/veya fonksiyonunu etkileyen mutasyonlar, bakterilerin antimikrobiyallere duyarlılığı üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Bu mutasyonlar, (en yaygın olarak) porin kaybı, porin kanalının boyutunda veya iletkenliğinde bir değişiklik veya bir porinin daha düşük bir ekspresyon seviyesi gibi farklı etkilere sahip olabilir. Bununla birlikte, bu değişikliklerin tümü, antimikrobiyalin hücre içine sınırlı, önemli ölçüde daha yavaş difüzyonu ve sonuç olarak azalan bakteri ölümü ile sonuçlanır. Özellikle porinle ilişkili mutasyonlar, β -laktamlara, florokinolonlara, tetrasikline ve kloramfenikole karşı direnci büyük ölçüde etkileyebilir (Fernández & Hancock, 2012b).

Porin kaybının antibiyotik direnci üzerindeki etkisi onlarca yıldır bilinmektedir. En erken örneklerden biri, 1981'de belirlenen *E. coli*'den OmpF porininin β -laktamlara dirençte yer almasıdır (Harder vd., 1981). O zamandan beri, birçok bakteri türünde antibiyotik direncinde yer alan porinler tanımlanmıştır. Bazı durumlarda, antibiyotiğe dirençli suşlar, bir veya daha fazla porinde tam bir kayıp gösterir. Örneğin, *P. aeruginosa* karbapenem dirençli klinik izolatlarda dış zar porin OprD'nin eksikliği, translasyonun erken sonlanmasını sağlayan bir nokta mutasyondan veya düzenleyici mutasyonlardan (Köhler vd., 1997a; Ochs, McCusker, vd., 1999a), porin kodlayan gen içinde delesyon veya ekleme elemanlarının

varlığından (Sanbongi vd., 2009; Wolter, 2004) kaynaklı olabilir. Daha düşük bir transkripsiyon seviyesi ile sonuçlanan promotör bölgedeki nokta mutasyonları, porin kaybının başka bir nedenidir. Örneğin, SDS-PAGE analizine göre, OmpF'den yoksun olduğu görülen ve ertapeneme dirençli *Enterobacter cloacae* izolatında, promotöründe *ompF* geninin ekspresyonununun 20 kat azalmasına yol açan bir mutasyonun varlığı tespit edildi (Doumith vd., 2009). Örneğin, *Enterobacter aerogenes*'in OmpF/OmpC benzeri proteininin 3. döngüsündeki bir G'den D'ye mutasyonu, gözenğin iletkenlik kaybına ve sonuç olarak β -laktamlara duyarlılığın azalmasına yol açar (Dé vd., 2001). Benzer şekilde, *Neisseria gonorrhoeae*'nin porin PIB'sinin L3 döngüsündeki mutasyonlar, bir *mtrR* mutasyonu nedeniyle bir akış pompasını aynı anda aşırı eksprese eden suşlarda penisilin ve tetrasikline direnç sağlar (Olesky vd., 2002, 2006). Bununla birlikte, tüm dirençli izolatlar, porinlerin ekspresyon seviyesinde belirgin bir azalma göstermez ve bu durumda direnç, porinlerin işlevini etkileyen mutasyonlardan kaynaklanabilir. Örneğin, farklı porinlerin L3 ipliğinde meydana gelen belirli mutasyonların antibiyotiklere karşı direncin artması ile sonuçlandığı bilinmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi, L3 daralma bölgesini oluşturmak için kanalın iç kısmına katlanır ve böylece elektrostatik alana ve gözenek lümeni içindeki kanalın en dar kısmına katılır (Koebnik vd., 2000b). Bunun, moleküllerin porin kanalı boyunca taşınması üzerinde doğrudan bir etkisi vardır. *Vibrio cholerae*'de, antibiyotik bağlama bölgesi olduğu tahmin edilen OmpU'daki bir D116A mutasyonu, sefalosporin grubu antibiyotiklerde direncin artmasına neden olur (Pagel vd., 2007). Öte yandan, *P. aeruginosa* OprD'de imipenem bağlanması L2 ve L3'ün varlığını zorunlu kılar (Ochs vd., 2000), dış döngüler L5, L7 ve L8, OprD kanal girişini daraltmaya ve antibiyotiklerin spesifik olmayan geçişini önlemeye çalışmaktadır (Huang vd., 1995). Daralma bölgesindeki mutasyonlar, birkaç dirençli *E. coli* izolatının OmpC kanalından sefotaksim ve diğer β -laktamların geçişini azaltmıştır (Lou vd., 2011).

Üçüncü tip bir mutasyon, porin genlerin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici proteinleri etkileyenleri içerir. Örneğin, *ompR* ve *envZ* genlerini içeren *ompB* operonunun, *E. coli*'de OmpC ve OmpF ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Pratt vd., 1996). Jaffe ve ark. (1982), *ompB*'deki mutasyonlarla *E. coli*'nin spontan sefoksitine dirençli mutantlarının tanımlanmasını sağlamışlardır (Jaffe vd., 1982a). OmpB lokusuna ek olarak, Rob, SoxS ve MarA gibi diğer birçok proteinin ve *micF* gibi küçük RNA'ların porin genlerinin transkripsiyonunun düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir (De la Cruz & Calva, 2010). Potansiyel olarak, bu lokusların herhangi birindeki çeşitli mutasyonlar, porin ifadesinde ve sonuç olarak antibiyotik direncinde değişikliklere yol açabilir. Diğer bir örnek, belirli

antimikrobiyal peptitlerin varlığında, *P. aeruginosa*'nın OprD porininin aşağı regülasyonunun sebebi, bu porinin baskılanmasını sağlayan ParRS iki bileşenli sistemi aktive eden mutasyonlardan kaynaklandığının bulunmasıdır (Muller vd., 2011). OprD'yi aşağı doğru düzenlerken akış pompası MexEF-OprN'yi yukarı doğru düzenleyen nfxC mutasyonları dahil olmak üzere çeşitli başka düzenleyici mutantlar mevcuttur (Köhler vd., 1997b; Ochs, Lu, vd., 1999; Ochs, McCusker, vd., 1999b).

Bazı çalışmalar, antibiyotik tedavisi sırasında porin kodlayan genlerde mutasyon taşıyan bakterilerin seçilimini göstermiştir. Örneğin, çeşitli antimikrobiyallerle tedavi gören bir hastadan alınan *E. coli* izolatları, OmpC proteininde, tümü sefotaksime karşı artan direnç sağlayan dört farklı varyantla sonuçlanan değişiklikler göstermiştir (Lou vd., 2011). Aynı şekilde, Oteo ve ark. (2008), ertapenem ile tedavi edilen bir hastadan üç *E. coli* izolatının geri kazanıldığını bulmuşlardır (Oteo vd., 2008). İlk izolat karbapenemlere duyarlı iken, ikincisi OmpF ve OmpC porinlerini kaybetmesi nedeniyle imipenem dirençli bulunmuştur. Bununla birlikte üçüncü *E. coli* izolatının ise duyarlı fenotipi geri kazandığını gözlemişlerdi. Antibiyotiklere maruz kalmanın in vitro deneyleri de benzer sonuçlar göstermiştir. *P. aeruginosa* suşlarının laboratuvar koşullarında meropenem maruz kalmaları sonucunda porin OprD'nin kaybı ile karbapenem dirençli hücrelerin seçimi (Henrichfreise vd., 2007), bu *oprD* mutanı veya OprD'nin ekspresyonunu etkileyen düzenleyici mutant hücrelerin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının yoğun imipenem tedavisi sırasında bulunmasını sağlamıştır (Fukuda vd., 1995; Lynch vd., 1987).

Porin değişiklikleriyle ilgili mutasyon direnci, patojenlerin direncindeki adım adım artışla ilişkilendirilebilir (Fernandez vd., 2011). Bu nedenle, herhangi bir özel porinin kaybı, mikroorganizmanın genel direnci üzerinde küçük ila orta dereceli bir etkiye sahiptir ve bu da düşük seviyeli dirence yol açar. Bununla birlikte, çeşitli direnç mekanizmalarını etkileyen bir dizi bağımsız mutasyon olayının birikmesi, bakteriye yüksek düzeyde direnç elde edene kadar kademeli olarak artan direnç sağlayabilir. Bu nedenle, porin kaybının etkisinin ek mekanizmalarla arttırıldığı bakteri suşlarını gözlemlemek oldukça yaygındır. Örneğin, *Serratia marcescens* meropenem dirençli suşlar, AmpC β -laktamazını aşırı üretir ve porin OmpF'den yoksundur (Suh vd., 2010). Benzer şekilde karbapenemazları olan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *E. coli* suşları da bazı dış zar proteinlerinde eksiklik gösterebilmektedir (Gülmez vd., 2008; Landman vd., 2009). *K. pneumoniae*'de siprofloksasine direnç, çok adımlı bir direnç kazanımı süreci gibi görünen *gyrA*, *parC* ve *ompK35*'teki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Chen vd., 2003). Diğer bir açık örnek, β -

laktamaz geni barındıran integron taşıyan, iki akış pompasını aşırı eksprese eden ve OprD'den yoksun olan *P. aeruginosa* karbapenem dirençli izolattır (Maniati vd., 2007). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, sefpirome ve sefepime dirençli, OmpC ve OmpF'den yoksun ve aynı zamanda TEM-1 veya OXA-1 β -laktamaz üretim düzeylerinin arttığını gösteren *E. coli* klinik izolatlarını da tanımlamıştır (Beceiro vd., 2011).

Bakteriler, buldukları ortamdaki değişikliklere yanıt olarak transkriptomlarını çok hızlı değiştirebilir ve böylece hayatta kalma şanslarını artırabilir. Bu modifikasyonlardan bazıları, bakteriye antimikrobiyal zorluğa karşı daha büyük bir dayanma yeteneği kazandırır. İyon konsantrasyonları, sıcaklık ve en önemlisi ölümcül olmayan dozlarda antimikrobiyallere maruz kalma dahil olmak üzere belirli bir antibiyotiğe karşı geçici olarak direnç kazanılmasına yol açabilir (Fernández vd., 2011). Porinler ifadesi, belirli sinyallere yanıt vermek için ince bir şekilde düzenlenir ve böylece büyüme koşullarına bağlı olarak bir bakterinin direncini değiştirir.

Antibiyotiklere maruz kalmanın porinlerin ekspresyonunu ve sonuç olarak hücre zarfının geçirgenliğini düzenlediği birkaç örnek vardır. Örneğin, *E. coli* hücrelerinin klortetrasiklin veya tetrasikline maruz kalması, çok sayıda porinin aşağı regülasyonuna yol açar (Lin vd., 2010; D. Zhang vd., 2008). Benzer şekilde, benzodiazepin ilacı diazepamın inhibitör altı konsantrasyonları, porin ekspresyonunu azaltarak ve akış sistemlerini indükleyerek *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de adaptif çoklu direncin gelişimini sağlar (Tavío vd., 2004). Bu fenotip norfloksasin, kloramfenikol, tetrasiklin, nalidiksik asit ve β -laktamlara duyarlılığın azalmasına yol açmıştır. Benzer şekilde *Moraxella catarrhalis*, amino penisilinlere maruz kalmaya porin M35'in ekspresyon seviyesini azaltarak yanıt verir ve sonuç olarak bu antibiyotiklere karşı adaptif direnç geliştirir (Jetter vd., 2010). M35 ayrıca 37°C'deki büyümeye kıyasla 26°C veya 42°C'deki büyüme sırasında ve ayrıca ozmotik stres ve demir sınırlaması ile aşağı regüle edilen sıcaklık tarafından düzenlenir. *E. coli*'de biyosit benzalkonyum klorüre adaptasyon, OmpA, OmpF ve OmpT gibi birkaç OMP'nin varlığının azalmasına neden oldu (Bore vd., 2007). Bu çalışmanın yazarları, bunun yalnızca bu kuaterner amonyum bileşiğine değil, aynı zamanda kloramfenikol, siprofloksasin, nalidiksik asit, ampisilin ve sefotaksim gibi antibiyotiklere karşı artan tolerans sağladığını gözlemlediler. *Serratia marcescens*'te iki ana porin olan OmpF ve OmpC'nin varlığı ozmotik strese, sıcaklığa, pH'a ve eklenen salisilatı göre değişir (Begic & Worobec, 2006). Salisilatın, *marRAB* operonunun ekspresyonunu teşvik ederek *E. coli*'de çoklu antibiyotik direnci fenotipini indüklediği bilinmektedir (Aleksun & Levy, 1999).

Bir bakteri hücrenin dış zarındaki porinlerin sayısı ve türü, onun besin alımına izin verme kabiliyetini ve ayrıca toksik bileşiklere duyarlılığını belirler. Porinleri kodlayan genlerin ekspresyonunun, bazı durumlarda stres ağları ile koordine edilen düzenleyici yollar tarafından iyi bir şekilde düzenlenmektedir. Bunun iyi bir örneği, *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porinlerinin düzenlenmesidir. OmpF, OmpC'den biraz daha büyük bir gözenek boyutuna sahiptir; bu nedenle, bu iki proteinin nispi oranları, hücreye girebilen çözünenlerin türü ve miktarı üzerinde çarpıcı bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, bakteriyi çevreleyen ortam düşük ozmolariteye sahip olduğunda, dış zarda besin akışını kolaylaştıran OmpF varlığında önemli bir artış olur. Buna karşılık, ozmolaritenin yüksek olduğu, örneğin *in vivo*, besin açısından zengin ortamlarda, toksik bileşiklerin hücreye girmesine izin verecek şekilde yüksek düzeyde OmpF ifade etmek zararlı olacaktır. Bu nedenle, yüksek ozmolarite koşulları altında, β -laktamlara karşı direncin artmasına yol açan OmpF'de bir aşağı regülasyon ve OmpC'de bir yukarı regülasyon vardır. Bu cevaba iki bileşenli düzenleyici OmpR-EnvZ aracılık eder (Hall & Silhavy, 1981). Yüksek sıcaklık, oksidatif stres veya salisilat gibi diğer çevresel sinyaller, OmpF translasyonunu azaltan antisens RNA micF'nin yukarı regülasyonu yoluyla porinlerin ekspresyonunu modüle eder (Barbosa & Levy, 2000; Dupont vd., 2004). Asidik pH, OmpF seviyelerini düşürürken OmpC seviyelerini artıran başka bir durumdur.

Viveiros vd. (2007), *E. coli*'nin tetrasiklin maruziyetine verdiği tepkileri analiz etti (Viveiros vd., 2007). Bu çalışma, hücrelerin başlangıçta OmpC ve OmpF ifadelerini düzenleyen küresel düzenleyiciler MarA, SoxS ve Rob'un aracılık ettiği stres tepkilerine maruz kaldığını gösterdi. Bununla birlikte, bu erken yanıtı, OmpC ve OmpF ifadesini aşağı doğru düzenlemek için MarA'nın MicF ve OmpX ile birlikte çalıştığı, ancak SoxS ve Rob ile çalışmadığı uzun vadeli bir uyarılama izler. OmpX, diğer porinlerin ifadesine göre ters ifade edilen bir dış zar proteindir (Dupont vd., 2004). Bunun nedeni, OmpX üretiminin porinlerin katlanması için gerekli şaperonları doyurması ve diğer katlanmamış porinlerin DegP proteazları tarafından parçalanmasına neden olmasıdır (Viveiros vd., 2007). OmpX'in ifadesi, florokinolonlar ve novobiyosin, salisilat, yüksek iyonik kuvvetli tampon ve şelatör dipiridil gibi antibiyotikler dahil olmak üzere farklı çevresel streslere maruz kalındığında artar (Dupont vd., 2007). Ek araştırmalar, *E. coli*'de porin ekspresyonunu düzenleyen kaskadların, dahil olan spesifik çevresel sinyale bağlı olarak çok sayıda düzenleyici protein ve sRNA'yı içererek bundan daha karmaşık olabileceğini göstermiştir (Castillo-Keller vd., 2006).

2.2.3. Porinlerin Çalışmasını Kontrol Eden Genler

Tüm canlı organizmalar, gen ekspresyonunu yeniden şekillendirerek çevredeki zararlı koşulları algılamalarına ve bu koşullara tepki vermelerine izin veren bir sisteme sahiptir. Bakteriler, olumsuz çevre koşullarına karşı toleranslarında büyük farklılıklar gösterir. Örneğin çalışmalar gram negatif bakterilerin Gram pozitiflerden daha fazla tolerans gösterdiğini desteklemiştir. Çünkü Gram negatif bakterilerin bir özelliği, antibiyotikler, ağır metaller gibi toksik kimyasalların penetrasyonunu engelleyen ek bir bariyer olan dış membranı bulundurmasıdır. Membran permeabilitesinde rolü olan porin proteinleri, ortalarında yer alan porları aracılığıyla 600 Da' dan küçük hidrofilik bileşiklerin alınımını sağlayan ve çapları 0,6-2,3 nm arasında değişen spesifik ya da spesifik olmayan geçirgenlik özelliği gösteren su dolu kanallardır. Bu nedenle, besinler ve antibakteriyel maddeler dahil olmak üzere küçük moleküllerin hücre sel alımını kontrol eden porin proteinlerinin ekspresyonunu düzenlenmesinde görev alan genleri belirlemek önemlidir.

Enterobacteriaceae'de porin gen ekspresyonunun düzenlenmesi oldukça karmaşıktır. Porin gen ekspresyonunun düzenlenmesi, çoklu düzenleyici proteinleri ve basamakları içerir.

OmpR, bir iç membran sensörü histidin kinazı olan EnvZ'yi de içeren iki bileşenli bir sistemin (TCS) sitoplazmik yanıt düzenleyicisidir. OmpR, porin genlerinin ekspresyonunu ve kemotaksis ve virülans gibi hücre sel süreçleri kontrol eden pleiotropik bir regülatördür. OmpR fosforilasyon durumu, porin gen düzenlemesi için çok önemlidir. OmpR-P, OmpR'nin aktif formudur, çünkü fosforilasyon, *ompC* ve *ompF* genlerinin promoter bölgeleri için bağlanma afinitesini artırır. İlginç bir şekilde, aktivatör rolüne ek olarak, OmpR-P, belirli genlerin bir baskılayıcısıdır.

Düşük ozmolaritede *E. coli* K-12'de, OmpR-P konsantrasyonu düşüktür, ancak *ompF* transkripsiyonunun etkinleştirilmesinden sorumlu *ompF* düzenleyici bölgedeki yüksek afinite bölgeleri (F1-F2-F3) ile etkileşime girmek için yeterlidir. Yüksek ozmolaritede, OmpR-P konsantrasyonu çok daha büyüktür ve OmpR-P, *ompC* transkripsiyonunun etkinleştirilmesinden sorumlu ve *ompF* transkripsiyonunu baskılamaktan sorumlu *ompF* (F4) bölgeleri ile etkileşir (Pratt vd., 1996). Bu nedenle, bu model, *ompF* ve *ompC*'nin düzenlenmesinin, hücredeki OmpR-P seviyesinin doğrudan bir sonucu olduğunu ve OmpR-P'nin *ompF* ve *ompC* düzenleyici bölgelerdeki alanlarla etkileşim şekline bağlı olduğunu gösterir. Bir çalışmada, *ompC* ve *ompF* düzenleyici bölgelere yeni bir OmpR-P bağlanma modu açıklanmıştır. Bu mekanizma, OmpR'nin sıkı bir hiyerarşik bağlanmasını ifade eder,

böylece ortam osmolaritesindeki değişiklikler üzerine ifadelerini en aza indiren *ompF* ve *ompC* transkripsiyonunun farklı düzenlenmesine izin verir. Ancak, bu karşılıklı ifade modeli, OmpC üretiminin konstitütif olduğu türler için geçerli olmayıp sadece EnvZ'nin varlığına bağlıdır. *Enterobacter aerogenes*'te, iki tahmini OmpR bağlama kutusu tanımlanan *ompX* için yüksek ozmolaritede sentezinin artışı gözlenmiştir. Ek olarak, *Salmonella enterica*' da OmpR, OmpS1 ve OmpS2 porinlerin üretimini düzenler. *E. coli*'de *ompS1* ve *ompS2* genlerinin homologları sırasıyla *yedS* ve *ompN*' dir. İlginç bir şekilde, OmpR, P1 promotörünü aktive ederek ve P2 promotörünü baskılayarak *ompS1* promotör kullanımını farklı şekilde düzenler. Ayrıca, OmpR-P yokluğunda P2 aktif iken, OmpR fosforilasyonu, P1'i aktive eder ve P2'yi baskılar.

Porin gen ekspresyonunun çeşitli stres şartları altında düzenlenmesinde OmpR'nin dışında farklı düzenleyicilerinde yer almaktadır. Bunlar arasında, CpxR (ekstrasitoplazmik strese cevap verir) (Batchelor vd., 2005), PhoB (fosfat eksikliği), Lrp (açlık), Rob (katyonik peptitler), MarA (zayıf asitler), SoxS (redoks sistemi), CadC, CRP (katabolit baskılama), Fnr (anaerobiyoz), ToxR (virülans), HNS, StpA, IHF, HU (nükleoid proteinler) ve LeuO (sıkı düzenleyici) gibi birkaç protein ailesi de yer almaktadır.

CpxA-CpxR, CpxA'nın transmembran sensör kinaz ve CpxR'nin cevap düzenleyici olduğu bir iki bileşenli sistemi oluşturur. CpxA, Sigma E aktivasyonu için uyarıcı olan yanlış katlanmış OMP'lerin aksine, alkali pH ile yanlış katlanmış proteinler ve membran bileşimindeki pili ve adhezinlerle ilgili olan değişiklikler gibi çeşitli uyarımlarla indüklenebilir. Ek olarak, CpxR tarafından aktive olan, CpxP, CpxA'yı degrade eden ve bu TCS'nin kontrolü için gerekli olan periplazmik bir proteazdır. CpxA'nın aktivasyonu ile oluşan fosforilenmiş CpxR (CpxR-P), OmpR-P için olanlardan hem farklı hem de üst üste gelen alanlardaki promoter bölgelerine bağlanarak *ompC*'yi pozitif, *ompF*'yi ise negatif olarak düzenler. İlginç bir şekilde, CpxR, OmpR'ye ek olarak *ompS1(yedS)*'in ekspresyonunu pozitif bir şekilde düzenler.

PhoR-PhoB, çevresel fosfat konsantrasyonunu algılayan ve dolayısıyla fosfat açlığına cevap veren bir TCS'dir. PhoR sensör kinaz, düşük bir çevresel fosfat konsantrasyonu tespit eder ve fosforilasyon (PhoB-P) ile cevap düzenleyici olan PhoB'yi etkinleştirir. Sentezinin PhoB'den düzenlendiği bildirilen ilk proteinlerden biri, fosfat eksikliğinde üretilen PhoE porinidir. PhoB-P, iki Pho kutusuna bağlanarak *phoE* geninin transkripsiyonunu doğrudan aktive eder. PhoE'ye ek olarak, PhoB, *V. cholerae*'daki OmpT, OmpU ve OmpA majör porinlerini negatif olarak düzenler.

Lrp, esas olarak amino asit metabolizmasıyla ilgili süreçleri düzenleyen global bir düzenleyicidir. Hücredeki fazlalığı, *E. coli* genlerinin %10'unun ekspresyonunu etkiler. Lrp aktivitesi, açlık ve düşük besin içeren minimal ortamda uyarılır ve zengin ortamda baskılanır. Besin açlığında, Lrp *ompC*'yi negatif ve *ompF*'yi pozitif olarak düzenler. Lrp, promoter bölgesiyle örtüşen *ompC-micF* intergenik bölgesine bağlanarak *ompC*'yi transkripsiyonel olarak baskılar ve küçük bir antisens RNA olan *micF*'yi de baskılayarak transkripsiyon sonrası seviyede *ompF*'yi pozitif olarak düzenler.

MarA, SoxS ve Rob, transkripsiyonel düzenleyicilerden AraC/XylS ailesinin üyeleridir. Bu üç protein, farklı çevresel uyarılara yanıt olarak *micF* transkripsiyonunu aktive ederek *ompF* ekspresyonunu azaltır. SoxR, oksidatif stres ile aktive olan ve SoxS regülatörünü transkripsiyonel olarak aktive eden bir sitoplazmik sensör proteindir. MarA, salisilik asit ve ariloksoalkanik asitler gibi zayıf asitlere ve bazı antibiyotiklere yanıt verir; *E. aerogenes*'te *ompX*'i pozitif olarak düzenler. Rob, aktivitesi birkaç etken ile uyarılan genel bir transkripsiyonel regülatör olabilir. Rob katyonik peptitler tarafından da uyarılabilir. Ayrıca, SoxS, *ompW* porin genini, metil viologen varlığında pozitif olarak düzenler.

CadC, *cadBA* operonunun transkripsiyonunu aktive ederek düşük pH ve lizin seviyelerine yanıt veren hem sinyal sensörü hem de transkripsiyonel regülatör olarak görev yapan bir iç membran transkripsiyon aktivatörüdür. Bir proteomik yaklaşım kullanılarak, CadC'nin asit adaptasyonu sırasında OmpC ve OmpF üretimini pozitif olarak düzenlediği belirlenmiştir. Beklenenden farklı olarak, bir *cadC* mutantında *ompR*'nin ekspresyonu artış göstermiş, bu da OmpC ve OmpF'nin CadC tarafından kontrolünün daha kapsamlı araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

CRP, bakterilerdeki çeşitli karbon metabolik genlerini kontrol eden ana küresel düzenleyicidir. *E. coli*, CRP, diğer herhangi bir düzenleyiciden daha fazla genin transkripsiyonunu etkiler. CRP, doğrudan promoter bölgesine bağlanarak *ompR-envZ* operonunun ekspresyonunu pozitif ve negatif olarak düzenler. *E. coli ompA* geninin ekspresyonu, CRP tarafından pozitif olarak düzenlenir, ancak ayrıntılı mekanizma aydınlatılmamıştır. Bir başka çalışmada ise, CRP'nin yeni bir küçük RNA (sRNA) olan CyaR aracılığıyla *ompX* ekspresyonunu negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir.

Fnr, oksijen konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ve farklı genlerin ekspresyonunu tek başına veya ArcA gibi diğer düzenleyicilerle iş birliği içinde kontrol eden DNA bağlayıcı bir proteindir. Fnr, *ompD*'nin anaerobiyoz altında ekspresyonunu, muhtemelen

mRNA stabilitesi aracılığıyla hareket eden transkripsiyon sonrası bir düzenleyici mekanizma ile pozitif olarak düzenler.

OmpR'ye homolog olan bir transmembran DNA bağlayıcı protein olan ToxR, *V. cholerae*'da virülans gen ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisidir. Başka bir zar proteini olan ToxS ile birlikte ToxR, ToxR regulon adı verilen en az 17 genin ekspresyonunu kontrol eder. ToxR, *ompU* porin geninin ekspresyonunu, doğrudan *ompU*'nun düzenleyici bölgesine bağlanarak pozitif olarak düzenler. OmpU'ya ek olarak ToxR, *ompT* porin geninin ekspresyonunu, promoter bölgesiyle örtüşerek negatif olarak düzenler. İlginç bir şekilde, artan ozmolarite OmpT üretimini artırır ve OmpU üretimini azaltır. Bu karşılıklı düzenleyici mekanizma, ToxR'nin bir fosfoaseptör alanı içermemesi dışında, *E. coli*'de *ompC* ve *ompF* üzerindeki OmpR mekanizmasına benzerdir. *ompW*, *V. cholerae*'da yüksek ozmolaritede aşağı regüle edilir, burada ToxR, glikoz varlığında *ompW*'yi negatif olarak düzenler.

Bakteriler, ökaryotik histonlara işlevsel benzerliğe sahip proteinlere sahiptir. Bu eşdeğerlik, amino asit dizisi ilişkisine değil, DNA bağlanma yeteneğine, düşük moleküler kütlelerine, kopya sayısına ve elektrostatik yüke dayanmaktadır. Bu proteinlerden birkaçı, gen ekspresyonunu, rekombinasyon ve replikasyon gibi diğer DNA bazlı fonksiyonları etkiler. Bu gruba ait olan H-NS, StpA, IHF ve HU'da birkaç porin geninin ekspresyonunu etkilemektedir. H-NS, enterobakterilerde (%5-12) genomun önemli bir kısmının transkripsiyonunu baskılayan ana global regülatördür. H-NS, ana porinler olan OmpC'yi baskılar ve MicF seviyesini düzenleyerek OmpF üretimini azaltır. İlginç bir şekilde, MicF'nin stabilitesi StpA'ya bağlıdır. StpA, bir RNA şaperonudur. Bununla birlikte, StpA'nın H-NS'nin yokluğunda görev alan yardımcı bir molekül olduğu tanımlanmıştır. H-NS ve StpA, *S. enterica*'daki *ompSI* ekspresyonunu, doğrudan bağlanarak baskılar. Benzer şekilde H-NS, *E. coli* ve *S. typhimurium*'da *ompS2* (*ompN*) ekspresyonunu negatif olarak düzenler. Öte yandan, H-NS ve StpA, maltoz regülon aktivatörü olan MalT'nin transkripsiyon sonrası kontrolü yoluyla dış membran maltoporin LamB'nin üretimini uyarır.

DNA bağlayıcı proteinlerden biri olan IHF, ilk olarak bir konakçı faktör olarak tanımlanmıştır. Ancak, IHF artık global bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir. IHF proteini, doğrudan düzenleyici bölgeye bağlanarak *ompC* ekspresyonunu negatif olarak düzenler. IHF, OmpF'nin negatif osmoregülasyonu için gereklidir. *ompC* ve *ompF*'ye ek olarak, IHF, *ompR-envZ* operonunu doğrudan ve negatif olarak düzenlemektedir. Bu nedenle IHF, *ompC* ve *ompF*'yi hem dolaylı hem de doğrudan etkilemektedir.

HU, fonksiyon olarak ökaryotik HMG proteinlerine benzer olan bir nükleoid proteindir. HU proteini, birbiriyle yakından ilişkili *hupB* geni ve *hupA* geni tarafından kodlanan iki alt birimden oluşur. Bir *E. coli hupAB* mutanı, *micF* ekspresyonunu azaltarak OmpF porin seviyelerini artırır.

LeuO, strese bakteriyel yanıtta, virülansta ve biyofilm birikiminde rol oynayan birkaç genin ekspresyonunu kontrol eden LysR tipi bir regülatördür (Lawley vd., 2006; Moorthy ve Watnick, 2005; Rodríguez- Morales vd., 2006; Tenor vd., 2004). Son zamanlarda, *Salmonella typhi*'de birkaç genin LeuO tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Hernández-Lucas vd., 2008). LeuO, bir H-NS antagonisti olarak hareket eder, dolayısıyla *ompS1* ve *ompS2* ekspresyonunu azaltır (De la Cruz vd., 2007; Fernández-Mora vd., 2004). LeuO'nun etkisi konsantrasyona bağlı şekilde değişir. Düşük seviyelerde LeuO, *ompS1*'i baskımlarken *ompS2*'yi ifadesini aktifleştirir. Yüksek düzeyde LeuO ise, tam tersi şeklinde hareket eder (De la Cruz vd., 2007). *ompS1* ve *ompS2*'deki LeuO bağlanma bölgeleri yukarı kısımda bulunur ve bu bölgeler birbiri ile çakışmamaktadır. LeuO'nun baskılanması üzerine *ompS1* ve *ompS2*, *E. coli ompC* genine benzer şekilde yüksek ozmolaritede pozitif olarak düzenlenir (De la Cruz vd., ; Fernández-Mora vd., 2004). LeuO, gen aktivatörü rolüne ek olarak, *S. typhi*'deki *ompX* porin geninin, transkripsiyonu da baskılayabilir. (Hernández-Lucas vd., 2008). Böylece LeuO, porinleri hem pozitif hem de negatif olarak düzenleyebilir.

Genellikle kodlamayan RNA'lar olarak adlandırılan küçük düzenleyici RNA'lar, yaşamın tüm formlarında bulunur (Argaman vd., 2001). Ayrıca, bu tür özelliklerle tanımlanan ilk RNA, porin regülasyonunda yer alan MicF'dir (Andersen vd., 1987; Mizuno vd, 1984). Genel olarak, doğrudan RNA-RNA etkileşimi ile transkriptlerin translasyonunu inhibe ederler. sRNA'lar strese cevapta, metabolizmanın düzenlenmesinde, bakteriyel zarf bileşiminin kontrolünde ve bakteriyel virülansta çeşitli fizyolojik roller oynarlar (Majdalani vd., 2005; Romby vd., 2006; Storz vd., 2005; Vogel ve Papenfort, 2006). Yapılan araştırmalar, enterobakterilerin, transkripsiyon sonrası dış zar bileşiminin düzenlenmesinde görevli birçok sRNA kullandığını göstermektedir (Vogel ve Papenfort, 2006).

E. coli MicF, karakterize edilen ilk sRNA idi (Mizuno vd., 1984). *micF* geni, çoklu kopyalarda bulunduğu OmpF üretimini baskılamaktadır. 93-nt (nükleotid) MicF, *ompF* mRNA'nın (Schmidt ve diğerleri, 1995) translasyon-başlama bölgesi ile bir RNA çift ipliği oluşturarak üretimini baskılar. Oksidatif bileşikler, toksik bileşikler ve besinler gibi çevresel faktörler, *micF* ifadesini aktive ederek *ompF* seviyelerini düşürür (Delias ve Forst, 2001). MicF seviyeleri, büyüme ortamındaki besinlerin konsantrasyonuna göre ters olarak değişir,

yani MicF, minimal ortamda düşük ancak zengin ortamda yüksektir (Coyer vd., 1990). *micF* transkripsiyonunun aktivasyonu, bir sıcaklık veya ozmolarite artışı üzerine veya katyonik peptitlere maruz kalma üzerine gerçekleşir. (Oh ve diğerleri, 2000). *micF* ekspresyonu, OmpR, Lrp, SoxS, Rob, MarA ve H-NS dahil olmak üzere, transkripsiyonel regülatörler için bağlanma bölgeleri açısından zengin olan karmaşık bir promoter bölgesi aracılığıyla düzenlenir (Delihhas ve Forst, 2001).

MicC, *ompN (ompS2)*- *ydbK* intergenik bölgesinde kodlanmış 109 nt'lik bir sRNA'dır. (Chen vd., 2002). MicC, *ompC* mRNA ile baz eşleştirmesi yaparak *ompC* ekspresyonunu negatif olarak düzenler. MicC, OmpC seviyelerinin MicC düzenlemesi için gerekli olan Hfq RNA şaperonu ile de bağlanır. (Chen vd., 2004). Bu nedenle Hfq, birçok strese yanıt olarak sRNA'ları tarafından transkripsiyon sonrası düzenlemede yer alan, yüksek düzeyde korunmuş, pleiotropik olarak etkili bir RNA bağlayıcı proteindir. Dolayısıyla, MicC üretimindeki bir artış, MicF üretimindeki bir düşüşle ilişkilidir. Örneğin, düşük sıcaklıkta ve besin kısıtlanmasında MicC seviyeleri yükselir. OmpR, *micC*'yi doğrudan veya dolaylı olarak baskılayıcı gibi görünmektedir. (Chen vd., 2004).

MicA, besince zengin ortamda durağan fazda bol miktarda bulunur. MicA'nın *ompA* ekspresyonunu düzenlediği, MicA ve *ompA* mRNA'nın 5' sekansı arasındaki tamamlayıcı olmasının ve ayrıca MicA'nın aşırı üretiminin OmpA protein seviyelerinin azalmasına neden olması sonucunda önerilmiştir (Rasmussen vd., 2005; Udekwu vd., 2005). Bu kontrol, Hfq gerektirir. Ayrıca, MicA, in vivo durağan fazda *ompA* transkriptinin dengesizleşmesinden sorumludur; bu koşullar altında, OmpA seviyeleri, MicA içermeyen bir suşta önemli ölçüde yükselir. Ayrıca MicA, *S. typhimurium*'daki LamB maltodekstrin porin genini aşağı doğru düzenler. SigmaE'yi aşırı ifade eden suşlarda, MicA birikimi, *lamB* mRNA seviyelerinde önemli bir düşüşe yol açar. Bu durum OmpA'da olduğu gibi, fonksiyonel bir Hfq proteini gerektirir. (Bossi ve Figueroa-Bossi, 2007).

RybB, sigmaE tarafından düzenlenen 80 nt'lik bir sRNA'dır. (Vogel vd., 2003; Wassarman vd., 2001). *rybB*, *ompA*, *ompC*, *ompD*, *ompF*, *ompN (ompS2)*, *ompS1*, *ompW* ve *ompX* dahil olmak üzere geniş bir porin mRNA setini hedefler. RybB, zarf stresi yanıtının bir parçası olarak Hfq'ye bağlı bir şekilde omp mRNA'ların bozulmasını kolaylaştırır (Papenfert vd., 2006).

CyaR, *ompX* mRNA'nın Shine-Dalgarno sekansını ayırarak ve translasyoneli inhibe ederek bir *ompX* baskılayıcı görevi gören yeni bir Hfq bağımlı sRNA'dır. CyaR'nin

ekspresyonu, siklik AMP reseptör proteini CRP tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu, porin geni baskılanması ile enterobakteriler arasında büyük ölçüde korunması muhtemel olan besin varlığı arasında yeni bir bağlantıyı temsil eder (Papenfort vd., 2008).

2.3. Metal Stresi

Metaller, birer iz element olarak biyokimyasal reaksiyonlarda önemli rol oynarlar. 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 mikro besin 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, bu ağır metallerin mikroorganizmalara son derece toksik etkileri bulunmaktadır (Kılınç ve Dönmez, 2008).

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 konsantrasyonlara ulaşabilmektedir (Srivastava vd., 2017).

Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarı hasarına yol açabilir, enzim spesifikliğini değiştirebilir, hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulması için oldukça önemlidir (Bruins vd., 2000).

Metal stresi doğada bakterilerin en sık karşılaştıkları stres faktörlerinden birisidir. Bakterilerle mücadelede metallerinde sıklıkla kullanılması, bakterilerin metallere karşı birçok korunma mekanizması geliştirmesine neden olmuştur. Bu mekanizmaların temelinde ya metalin hücre içine alınmasının engellenmesi ya hücre dışına atılmasının artırılması ya da çeşitli yollarla detoksifiye edilmesinin sağlanması yer almaktadır. Bakteriler bu yollardan bazılarını kullanarak metallere karşı direnç geliştirmektedir.

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 (Franke vd., 2003). *E. coli*, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır

toksitesinden korunmak için Cu homeostazında görevli birden fazla regülatör sistem bulunmaktadır. Bu sistemler arasında en fazla sorumlu olan 2 tane önemli sistem vardır. Birincisi olan CueR, sitoplazmik Cu algılamada görevli çoklu bakır oksidazdır. Sitoplazma içerisinde Cu varlığında bu gen CopA ve CueO homeostatik mekanizmasını düzenleyerek sitoplazmadan Cu detoksifikasyonunu sağlar (Stoyanov vd., 2001). Aynı şekilde, hücre zarf stresi algılamada görevli iki bileşik fosforlama sisteminin regülatörü olan CpxR, CopA düzenlenmesine etki göstererek yine sitoplazmadan bakırın uzaklaştırılmasında görev alır (Kershaw vd., 2005). Hücre içerisinde periplazmik bölgede Cu stresini algılamada görevli ikinci sistemde CusS/CusR iki bileşenli sistemdir. Bu sistem periplazmadaki Cu'yu algılar ve CusCFBA mekanizmasını devreye sokarak periplazmadan bakır uzaklaşmasını sağlar. CusA bakır toleransı için gerekli olan bir bakır-bağlayıcı proteindir. CusB ve CusC *E. coli* içinde, bakır iyonlarının detoksifikasyonuna katılan membran füzyon proteindir. CusF ise *E. coli* içinde, bakır iyonlarının detoksifikasyonuna katılan periplazmik bir bağlama proteindir (Franke vd., 2003). Yine Pco proteini, periplazmadan Cu detoksifikasyonu sağlayan genleri kodlar (Rensing & Grass, 2003). Bakır homeostazında görev yapan genler ve sitoplazmik Cu (I) 'e cevap veren ya da periplazmik Cu (I) algılamada görevli iki bileşenli sistemler, MerR benzeri aktivatörler tarafından düzenlenir. Ayrıca CusSR iki bileşenli sistemi çapraz düzenleme reaksiyonları göstererek Cu stresi altında YedVW sistemini de aktifleştirmektedir (Yamamoto & Ishihama, 2005). *E. coli*'de Cu algılamada çok karmaşık bir mekanizma söz konusudur (Rensing & Grass, 2003).

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 toksitesini tolere edebileceği bir mekanizmaya ihtiyaçları vardır. *E. coli*, periplazmadan sitoplazmaya Zn taşınımından sorumlu olan ZnuABC taşıma sistemine sahiptir (Binet & Poole, 2000). Ayrıca çinko, sitoplazmada bulunan Zur proteinine bağlanabilir ve hücre içerisinde de bulunmaya devam edebilir (Rensing & Mitra, 2007). ZntA, ATPaz aktivitesiyle uyarılan çinkoyle ilişkili bir proteindir. Hücre içerisinde Zn konsantrasyonu yüksek olduğu zaman, transkripsiyon faktörü olan ZntR uyarılır ve dışa atım sistemi olan ZntA'yı düzenleyerek sitoplazmadan periplazmaya Zn taşınımını sağlar (Binet & Poole, 2000).

ZntA proteini Cd'nin taşınımına katılan bir P-tipi ATPaz'dır (Rensing & Mitra, 2007). Hücre içi oksidasyon durumlarında kadmiyum, çinkoyle birlikte etkinlik gösteren bir metaldir. Çinko metalinin hücre içerisine alınması, depolanması ve hücre içerisinde

taşınmalarında, kadmiyum ve demir duyarlı düzenleyici proteinler, demire duyarlı Fur benzeri Zur proteini, ArsR/SMTB ailesinin bir üyesi olan represör CadC ve Mer tipi aktivatör ailesinden ZntR proteinleri görev almaktadırlar.

Nikel *E. coli*'nin büyümesi üzerinde antagonistik bir etkiye sahiptir (Wu vd., 1994). Nikel, üç Ni-Fe-hidrojenaz izoenziminin aktiviteleri ve bakterinin fermentatif büyümesi için gereklidir. Bu nikel içeren enzimlerin başarılı bir şekilde üretilmesi, NikABCDE operonu tarafından kodlanan, nikel spesifik ABC sistemi vasıtasıyla nikelin etkili bir şekilde alınmasına dayanır (Navarro vd., 1993). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda (zengin ortamda 0.3 mM'den) mevcut olduğunda, nikel büyümeyi engeller ve böylelikle toksik etki gösterir (Navarro vd., 1993; Wu vd., 1994). *E. coli*, toksik nikel konsantrasyonuna karşılık iki strateji kullanır. Birincisi, bir kemoreseptör olan Tar' a ve NikA'ya bağlı negatif kemotaksiyi aktive eder ve böylece toksik nikelden uzaklaşır (Pina vd., 1995). İkincisi, yüksek afiniteli nikel atım sistemi yoluyla nikel girişini engeller. Bu, NikABCDE operonun ifadesinin baskılanmasıyla elde edilir. Bu operonun ise regülatörü, özellikle nikel ile uyarılan bir metal düzenleyici protein olan NikR'dir.

Kobalt (Co), corrin halkaları olarak bilinen siklik tetrapirrol merkezinde koordine iyonu olarak önemli bir rol oynadığı için, birçok canlı organizmanın temel bir elementidir (Escalante-Semerena, 2007; Yang vd., 2010). Koenzim vitamin B12 (adenosilkobalamin (AdoCbl)) ve kobalamin (Cbl) türevleri de dahil olmak üzere, corrinoidler, birçok merkezi metabolik reaksiyonda koenzim olarak görev alır. Kobalt, direkt olarak kobalt bağımlı enzimlerle (nonkorrin enzimler) ilişkilendirilebilir (Kobayashi & Shimizu, 1999). Bakteriler, çoğunlukla ortamda eser miktarda bulunan Co^{2+} 'yi almak için, yüksek afiniteli alım sistemlerine sahiptir (Eitinger vd., 2005; Vitreschak vd., 2003; Y. Zhang vd., 2009). Dış metal konsantrasyonları çok yüksek olduğunda, Co^{2+} birikimi toksik hale gelebilir ve aşırı Co^{2+} , dışa atım sistemleri ile hücrelerden atılabilir (Koch vd., 2007a). Prokaryotlarda çeşitli kobalt (Co) taşıma mekanizmaları tespit edilmiştir. Birçok iyon taşıyıcısı Co'nun taşınmasında görev yapmaktadır. Bunlar; Zn taşıyıcısı ZupT, Mg taşıyıcısı CorA, Mn taşıyıcısı MntH ve Ni taşıyıcılarıdır. Kobaltın affinitesi bilinmemektedir ve diğer genlerle olan rekabetine bağlı olarak değişmektedir. Ancak bunların Co^{2+} için zayıf afinitesi nedeniyle fizyolojik açıdan anlamlı olduğu düşünülmemektedir.

Kobalt ve nikel regülatör proteini olan RcnR, bir dışa atım protein olan RcnA' nın transkripsiyonel ekspresyonunu düzenleyen, *E. coli*'nin transkripsiyonel metal-düzenleyici proteinlerinden (Temel olanlar; Fur, CueR, CusR, MntR, Zur, ZntR ve NikR) biridir.

Hücredeki farklı metallerin homeostazı sürekli olarak kontrol edilir ve metallerin hücre içi konsantrasyonlarını normal seviyelerde tutmak için gerekli yollar aktive edilir veya baskılanır.

Porin ekspresyonu genetik düzenlenmesi açıkça karmaşık transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası olayları gerektirir. Bu bağlamda, tam olarak aydınlatılması için transkripsiyonel düzenleyicilerin aktivitesini ve mekanik detayları etkileyen çevresel belirleyicilerin kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Porinler ile ilişkili olarak yukarıda da açıklandığı gibi, birçok çalışmada farklı stres şartları (özellikle antibiyotik) uygulanarak porin proteinlerinin rolleri belirlenmiştir. Son dönemlerde, ciddi çevre kirliliğine sebep olan metaller, bakterilerin en sık karşılaştığı stres faktörü haline gelmiştir. Bu nedenle, bakterilerin bu stres ile başa çıkmak için geliştirdikleri direnç mekanizmaları önem arz etmektedir. Ancak, bakterilerin ağır metallere karşı hücreyi korumasında porin proteinlerinin rolleri hakkında detaylı bir çalışmaya şimdiye kadar rastlanılmamıştır.

2.4. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Dünyada endüstrinin ilerlemesi ile birlikte toksik ağır metaller çevre kirliliğine neden olmaktadır. Proteinlerin ve metabolik süreçlerin engellenmesinin başlıca sebebi ağır metallerin toksik etkileridir. Topraklarda biriken bakır, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, civa ve krom gibi ağır metaller, mikroorganizma, bitki, hayvan ve insan yaşamı için toksik konsantrasyonlarda olabilir (Flora vd., 2013). Ancak bazı bakteriler, atık maddelerin içindeki metilen klorit ve kükürt gibi toksik maddelerle beslenir. Çevre mühendisleri, bu tür bakterilerle biyoremediasyon adlı yöntemi iki şekilde uygularlar. Bunlardan ilkinde; atıkların döküldüğü bölgeye besin aktarımı yapılarak, toprağın bakteri kompozisyonuna göre, hâlihazırda toprakta bulunan bakteriler etkin duruma geçirilir ya da toprağa yeni bakteriler aktarılarak, zararlı atıklar, zararsız yan ürünlere dönüştürülür. Daha sonra toprakta etkin durumdaki bakteriler ya ölürler ya da sayıları normal popülasyon düzeyine gelir. Böylece ekolojik denge de korunmaktadır (Russell, 1999).

Bakterilerin doğada en sık karşılaştıkları stres faktörlerinden birisi metal stresi olduğundan metallere karşı direnç mekanizmaları önem arz etmektedir. Bakterilerin 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. Bakteriler bu yollardan bazılarını kullanarak farklı metallere karşı direnç geliştirmektedirler. Bu direnci geliştirmede *E. coli*'de dış membranda bulunan kanal proteinlerinin bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle de çalışmada, *E. coli*'nin dış membran kanal proteinlerinden *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE* porin genlerinin bakır, çinko ve nikel metallere karşı rollerinin olup olmadığı araştırılacaktır. Metal homeostazında doğrudan ilişkili olan genlerin (*cueR*, *rcnR*, *nikR*, *zur*, *cusS*, *cusR*, *cpxR* ve *cpxA*) rolü olduğu belirlenen porin genlerinin sentezini kontrol edip etmediği araştırılacaktır.

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

3.1.1. Nutrient agar besiyeri

20 g Nutrient agar (Merck) 1 L distile suda çözdürüldü ve 121 °C'de 15 dk otoklavda (Nüve) steril edildi.

3.1.2. Nutrient brot besiyeri

8 g Nutrient brot (Merck) 1 L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.1.3. Luria Bertani (LB) agar besiyeri

25 g LB (Sigma) ve 15 g agar (Merck) tartılarak 1 L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.1.4. Luria Bertani (LB) brot besiyeri

25 g LB (Sigma) tartılarak 1 L distile suda eritildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.1.5. Soft agar

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 (Merck) solüsyonu ve 0,2 ml 1 M CaCl₂ () eklendi.

3.1.6. 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 kadar soğutulup, besiyerine 0,4 ml 1M MgSO₄ (Merck), 0.8 ml %50'lik glukoz solüsyonu, 2 ml 10 mM FeSO₄ (Merck), 0,2 ml 20 mg/ml tiamin (Sigma) ve uygun antibiyotikten belirlenen konsantrasyonlarda eklendi. Hazırlanan besiyeri donmadan petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.7.SOB medium

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

3.1.8.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 solüsyonu eklenerek hazırlandı.

3.2. Kullanılan antibiyotiklerin hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan 25 mg/ml kanamisin (Km) (Sigma) antibiyotiği stoğunu hazırlamak için 0,25 g Km antibiyotiği 10 ml saf suda çözüldü. 20 mg/ml Kloramfenikol (Cm) (Carlo Erba) antibiyotiği stoğu için 0,2 g Kloramfenikol (Cm) antibiyotiği 10 ml %99,6 etanolde çözüldü. 100 mg/ml ampisilin (Amp) (Sigma) antibiyotiği stoğu için 1 g ampisilin (Amp) antibiyotiği 10 ml saf suda çözdürüldü ve tüm antibiyotikler filtre ile steril edildi. -20 °C'de saklandı.

3.3. Kullanılan metallerin hazırlanması

Çalışmada CdSO₄.5 H₂O (Merck), CoCl₂.6H₂O (Merck), CuSO₄ .5 H₂O (Mediko Kimya), NiCl₂.6 H₂O (Fisher) ve ZnSO₄.7 H₂O (Sigma), metalleri kullanıldı. Her metalden 0,2 M olacak şekilde çalışma solüsyonları saf su ile hazırlandı ve 0,22 µm'lik filtre yardımı ile steril edildi. Tek kullanımlık olmak üzere küçük ependorflara paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.

3.4. Kullanılan diğer solüsyonların hazırlanması

3.4.1.PBS (Phosphate Buffered Saline)

200 ml saf suda 1 adet PBS (Sigma) tableti eritildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.4.2.Ringer solüsyonu

Ticari olarak satılan Ringer (Merck) tabletlerinden 1 tablet 500 ml saf suda çözdürülerek hazırlandı. 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.4.3. TBE hazırlama

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

3.4.4. TE hazırlama

1 M Tris-HCl (Applichem)'den final konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde 2ml, 0,5 M EDTA'dan final konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde 400 µl eklendi. Oluşan solüsyonun pH'ı HCl (Carlo Erba) ya da NaOH ile ayarlandı ve saf su ile son hacim 200 ml'ye tamamlandı.

3.4.5.1 M Tris-HCl (pH 8) hazırlama

15,76 g/mol Tris-HCl tartılıp üzeri 60 ml distile su ile tamamlandı. pH'ı HCl ya da NaOH ile ayarlandı ve saf su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.4.6. EDTA (0,5 M, pH 8) hazırlama

Hazırlamak için; 9,306 g EDTA tartılır ve üzerine 30 ml saf su ilave edilir. EDTA, suda pH 8'de çözündüğü için pH'ı HCl ya da NaOH ile ayarlandı. pH'ı ayarlanan EDTA solüsyonunun hacmi 50 ml'ye distile su ile tamamlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

3.4.7.1 M L-arabinoz

1 M Arabinoz (Merck) hazırlamak için, 15 g L-arabinoz 10 ml saf suda çözdürüldü ve filtreden geçirilip, steril edilerek kullanıldı.

3.4.8. Mg⁺² (2 M)

50 ml 2 M Mg⁺² hazırlamak için 1 M MgCl₂ (Merck) ve 1 M MgSO₄ (Fisher) solüsyonlarından eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı. Bunun için 5,08 g MgCl₂ ve 6,162 g MgSO₄ tartılıp ayrı ayrı 25 ml saf suda çözdürüldükten sonra karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edilerek kullanıldı.

3.4.9. Tris-EDTA (1 M) ile doyurulmuş fenol

20 g kristal fenol (Sigma) 68 °C'de eritildi. Üzerine hacminin ½ oranında 1M Tris-HCl (pH 8) ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. İki faz şeklinde oluşan solüsyonun üst fazı atıldı ve geriye kalan organik faza hacminin ¼ oranında 1M Tris-HCl (pH 8) ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Oluşan üst faz atılarak tekrar kalan

organik faza hacminin 1/6 oranında 1M Tris-HCl (pH 8) ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Daha sonra oluşan üst faz atıldı ve organik faza (pH>7,8) eşit hacimde TE (pH 8) ilave edildi ve 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Hazırlanan solüsyonun üst fazı atıldı ve organik fazı Tris-EDTA ile doyurulmuş Fenol olarak kullanıma hazır hale getirildi. Solüsyon pembeleşinceye kadar 4 °C'de saklandı.

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

X-gal (Sigma), 20 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. 100 mg X-gal 5 ml DMF (dimetilformamit)'de çözdürüldü. 1,5 ml'lik ependorflara 1'er ml konularak etrafı alüminyum folyo ile kaplandı ve daha sonra -20 °C'de saklandı.

3.4.11. 0,1 IPTG hazırlama (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranosid)

IPTG (Carlo Erba) 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 alüminyum folyo ile kaplandı ve -20 °C'de saklandı.

3.4.12. Primerlerin sulandırılması ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

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

3.5. Kullanılan *E. coli* Suşları

Çalışmada kullanılan *E. coli* yabani tip W3110 ve bazı mutant suşlar, Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio koleksiyonundan alınmıştır. Bu koleksiyon, *E. coli* BW25113 suşunun tek tek tüm genlerinin nakavt edilmiş suşlarını içermektedir. Bu çalışmalarda kullanılan ve Tablo 3.1'de belirtilen yabani tipi *E. coli* W3110 ve mutant hücreler %20 gliserol (Merck) içeren Luria-Bertani (LB) brothda (Sigma) stoklanarak -80 °C derin dondurucuda (Panasonic) saklanmaktadır.

3.6. *E. coli* W3110 Mutantlarının Eldesi

Tablo 3.1'de belirtilen *E. coli* BW25113 mutant suşlar, P1 transdüksiyon yöntemi ile *E. coli* W3110'a aktarılarak çalışmalarda kullanıldı (Sato vd. 2000; Miller, 1992).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar

Lab. Stok Numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Yabani tip	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW0940	BW25113 <i>ompA</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW2203	BW25113 <i>ompC</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW0912	BW25113 <i>ompF</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW1312	BW25113 <i>ompG</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW0554	BW25113 <i>ompT</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW3996	BW25113 <i>lamB</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW0231	BW25113 <i>phoE</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW3882	BW25113 <i>cpxA</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW3883	BW25113 <i>cpXR</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW5082	BW25113 <i>cusS</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
JW0560	BW25113 <i>cusR</i> ::km	Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio Koleksiyonu
CD1	W3110 <i>ompA</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD2	W3110 <i>ompC</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD3	W3110 <i>ompF</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD4	W3110 <i>ompG</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD5	W3110 <i>ompT</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD6	W3110 <i>lamB</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD7	W3110 <i>phoE</i> ::km	2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD100	W3110 <i>cpxA</i> ::km	201202. BİL.0401 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
CD101	W3110 <i>cpXR</i> ::km	201202. BİL.0401 nolu BAP projesinde yapılmıştır.
OK102	W3110 <i>cusS</i> ::km	TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 projesinde yapılmıştır.
OK106	W3110 <i>cusR</i> ::km	TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 projesinde yapılmıştır.
GCK1	BW25113 <i>cueR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK2	BW25113 <i>rcnR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK3	BW25113 <i>nikR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK4	BW25113 <i>zur</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK5	W3110 <i>cueR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK6	W3110 <i>rcnR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK7	W3110 <i>nikR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.
GCK8	W3110 <i>zurR</i> ::km	Bu çalışmada elde edildi.

3.6.1. Transdüksiyon ile mutant eldesi

Derin dondurucuda saklanan yabancı tip *E. coli* W3110 ve mutant suşlar kanamisin antibiyotiği içeren taze LB agarda (Sigma) 37 °C'de 16 saat inkübatörde canlandırıldı. Elde edilen saf kültürden 4 ml LB brot içerisine ekim yapıldı.

Daha sonra besiyerine 1 M CaCl₂'den 10 µl ve 25 mg/ml olarak hazırlanmış kanamisin (Sigma) antibiyotiğinden 4 µl eklendi. Örnekler, 37 °C'de 160 rpm çalkalamalı inkübatörde (Nüve) O.D₆₀₀ değeri 0,4-0,45 absorbansa ulaşınca kadar büyütüldü. İstenilen absorbansa gelen hücrelerden tüp içerisine 200 µl alınıp üzerine 10 µl P1kc fajından ilave edilerek 37 °C'de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüp içerisine yaklaşık 50 °C olan soft agardan 2,5 ml ve %50'lik glukozdan 25 µl eklenerek homojen karışım sağlandı. Karışım daha sonra LB agar üzerine dökülerek petrinin yüzeyine yayıldı. Kuruyan petriler ters çevrilerek 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün petrinin iç yüzeyine 2 ml LB brot ve 2-3 damla kloroform (Merck) eklendi. Pipet yardımı ile karışım petrinin tüm yüzeyine yaydırıldı. 2 saat boyunca ara sıra çalkalanarak, 4 °C'de bekletildi. Bekleme süresi sonunda 1,5 ml'lik ependorflara petrideki sıvı bakteri kültüründen 1 ml alındı. Alınan örnek üzerine 50 µl kloroform eklenerek 12.000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant (P1kc) başka bir ependorfa aktarılarak transdüksiyonda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

Transdüksiyon için ilk olarak alıcı hücre hazırlandı. Alıcı hücre yabancı tip *E. coli* W3110 suşundan 5 ml LB brot içerisine tek koloniden ekim yapıldı. OD₆₀₀ değeri 0,3'e gelene kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1,5 ml'lik ependorflara 1 ml aktarıldı ve 10.000 rpm'de 10 dk 0 °C'de santrifüj (Termal) edildi. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 1 ml yıkama tamponu (LB Broth'dan 9,88 ml, %50 Glikozdan 0,1 ml ve 1 M CaCl₂ 20 µl eklenmesi ile steril şekilde hazırlanır) eklendi ve tekrar 10.000 rpm'de 10 dk 0 °C'de santrifüj edildi. Yine süpernatant atıldı ve pelet üzerine 1 ml yıkama tamponu eklendi.

Alıcı hücre yabancı tip *E. coli* W3110 içerisine, farklı oranlarda (10-50 µl) elde edilen P1kc fajı eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakikadan fazla bekletildi. Vorteks (Wisemix) yapılarak 12.000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üzerine 0,1 ml yıkama tamponu eklendi. Km'li DM agar üzerine hücreler aktarıldı. DM agar sıvıyı çekene kadar oda sıcaklığında bekletildi ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üreyen bakteri kolonileri DM agardan Km'li LB agara seçilerek aktarıldı ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Km'li LB agarda üreyen bakteriler tekrar km-X gal-IPTG içeren

LB agara ekildi ve 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mavi renk veren koloniler seçildi ve koloni polimeraz zincir reaksiyonu (koloni PZR) ile doğrulandı.

3.6.2. Koloni polimeraz zincir reaksiyonu (Koloni PZR)

Elde edilen mutant bakterilerin antibiyotik direnç kasetlerinin varlığının ve konumunun kontrolü, ilgili gene spesifik ileri ve geri primerleri, Evrensel K1 geri primeri ve gen spesifik ileri primerleri (Tablo 3.3’de listelendi) kullanılarak yapılan koloni polimeraz zincir reaksiyonu (koloni PZR) ile sağlandı. Elde edilen mutantların kolonisi 20 µl distile su içinde süspansiyon edildi ve 1 µl’si PZR’de kalıp olarak kullanıldı. PZR için hazırlanan reaksiyon içeriği Tablo 3.2’de ve PZR çalışma koşulları ise Tablo 3.4’de gösterildi.

3.6.3. Tek gen delesyonu ile mutant elde edilmesi

Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio koleksiyonundan satın alınmayan ve Tablo 3.1’de belirtilen mutant suşların elde edilmesi, Datsenko ve Wanner (2000) tarafından belirlenen tek gen nakavt metoduna göre yapıldı. Öncelikli olarak 30 °C ısıya duyarlı pKD3 plazmiti içeren *E. coli* BW25113 suşundan plazmit izolasyonu yapıldı. pKD3 plazmiti içeren *E. coli* BW25113 suşu, 5 ml’lik LB broth içerisine tek koloni ekimi yapıldı ve 37 °C’de bir gece çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında elde edilen bakteri kültürleri 1,5 ml’lik ependorf içerisinde 10.000 g’de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Plazmit izolasyonu, ticari olarak elde edilen Purelink Quick Mini Prep (İnvitroGen) plazmit izolasyonu kitinin prosedürü kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidin bir kısmı miktar tayini için kullanıldı ve elde edilen plazmitler -20 °C’de saklandı.

Tablo 3.2. Koloni PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktarları	Final konsantrasyonu
10x Thermo Pol Reaksiyon Buffer (MgCl ₂ olmayan)	1,0 µl	1x
50mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂	0,4 µl	2mM
10mM dNTP Mix	0,2 µl	200 µM
10 µM ileri primer	0,5 µl	5 µM
10 µM geri primer	0,5 µl	5 µM
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,05 µl	0,25U
Kalıp (genomik)	1,0 µl	1 ng–1 µg
dH ₂ O	6,35 µl	
Toplam	10,0 µl	

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan gen primerleri

Primerler	Dizisi (5'3')
Evrensel K1 geri primeri	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
W3110:: <i>ompA</i> ileri primeri	TATGCCTGACGGAGTTCACA
W3110:: <i>ompA</i> geri primeri	GGCATTGCTGGGTAAGGAAT
W3110:: <i>ompC</i> ileri primeri	TTTGGGGAGAATGGACTTGC
W3110:: <i>ompC</i> geri primeri	CGCAACCAACAAAGAAGAGC
W3110:: <i>ompF</i> ileri primeri	TGTAGCACTTTCACGGTA
W3110:: <i>ompF</i> geri primeri	ATGACGAGGTTCCATTAT
W3110:: <i>ompG</i> ileri primeri	TATGCTCTACACCACGGTTG
W3110:: <i>ompG</i> geri primeri	ACGCAGGAGTTAGGTCAACA
W3110:: <i>ompT</i> ileri primeri	TATGCCTCTAAAGGCATGGC
W3110:: <i>ompT</i> geri primeri	TGTAATTGGGTTGCTGTCGC
W3110:: <i>lamB</i> ileri primeri	ATGTCGTCGACTGCATAAGG
W3110:: <i>lamB</i> geri primeri	AGCCGTTGTAGGCCTGATAA
W3110:: <i>phoE</i> ileri primeri	AAGCATGGCGTTTTGTTGCG
W3110:: <i>phoE</i> geri primeri	TTTCACGAGAAGCTGCGTGA
W3110:: <i>cpxA</i> ileri primeri	TTCCAACCTGCGTCGTAAAC
W3110:: <i>cpxA</i> geri primeri	GTTGTGGGGAAAATAACCCC
W3110:: <i>cpxR</i> ileri primeri	CCCAAAATCTTTCTGTCGCG
W3110:: <i>cpxR</i> geri primeri	ATGCTGCTCAATCATCAGCC
W3110:: <i>cusS</i> ileri primeri	AGTTCTTCCTTCGCCATCAG
W3110:: <i>cusS</i> geri primeri	CAAGAAGCCAGTCCACACAA
W3110:: <i>cusR</i> ileri primeri	TTTACTCGCCAGGCTCTGAT
W3110:: <i>cusR</i> geri primeri	GAGTGGATCATGATCCATGC
W3110:: <i>cueR</i> ileri primeri	TGGTCATGAAGCGCAATAAA
W3110:: <i>cueR</i> geri primeri	TAACCCTACATATCCGAGCC
W3110:: <i>rcnR</i> ileri primeri	TCACCCTTGTTTAATGGTG
W3110:: <i>rcnR</i> geri primeri	CGGCAGTTTTACAATCGCGT
W3110:: <i>nikR</i> ileri primeri	TGGTTATGGACAACGGACAA
W3110:: <i>nikR</i> geri primeri	TCGTTACCAAAGGACCCAA
W3110:: <i>zur</i> ileri primeri	CGACAAGGCAACATAACACC
W3110:: <i>zur</i> geri primeri	GACGTGTACAAGGATGTACG

Tablo 3.4. Koloni PZR koşulları

Adım	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön denatürasyon	95 °C	2 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	30
Bağlanma	45-68 °C (Genellikle 58 °C)	30 sn	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1

3.6.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Elde edilen pkD3 plazmiti kalıp olarak kullanılarak Tablo 3.5’de verilen 60 bazlık primerler ile PZR yapıldı. Bu 60 bazlık ileri ve geri primerlerin, 40 nükleotitlik kısmı oluşturulacak olan mutant gene spesifik iken 20 nükleotitlik kısmı ise kloramfenikol genine spesifik olacak şekilde tasarlandı. Mutant eldesi için gen yerine yerleştirilecek olan kloramfenikol geni çoğaltıldı. PZR’de kullanılan reaksiyon içeriği Tablo 3.6’da ve çalışma koşulları ise Tablo 3.7’de gösterildi.

Tablo 3.5 Tek gen delesyon metodunda kullanılan gene primerleri

Primerler	Dizisi (5’.....3’)
Evrensel C1 geri primeri	CGCCTGATGAATGCTCATCCG
<i>cueR</i> H1 ileri primeri	AACCCTTTAACAAAGCACAGGAGGCGTTGCGCGAACGAT GGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>cueR</i> H2 geri primeri	AAGGGATAACCCTACATATCCGAGCCGCTCGTCTTAATC CATATGAATATCCTCCTTAGT
<i>rcnR</i> H1 ileri primeri	CTATGATTTTTCATATTCCTTGTTAACCAGGTGTTGCCATGG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>rcnR</i> H2 geri primeri	CGAGGAAAAACGGCAGTTTTACAATCGCGTTAATAAATTA CATATGAATATCCTCCTTAGT
<i>nikR</i> H1 ileri primeri	CCGTGCGCCGTCGCACCACAGAAAAGGTTTAACGCAAAT GGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>nikR</i> H2 geri primeri	CCTTTGTTGATCGTTCACCAAAGGACCCAATAATAGACTC CATATGAATATCCTCCTTAGT
<i>zur</i> H1 ileri primeri	AGTAAGGACATTCTTAACCCCACTTTGAGGTGCCCGATG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>zur</i> H2 geri primeri	TCCCTCCTGCCCCGACGTGTACAAGGATGTACGCCCTCTTA CATATGAATATCCTCCTTAGT

Tablo 3.6. PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktarları	Final konsantrasyonu
10x Thermo Pol Reaksiyon Buffer (MgCl ₂ olmayan)	10,0 µl	1x
50mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂	4 µl	2mM
10mM dNTP Mix	2 µl	200 µM
10 µM ileri primer	2 µl	5 µM
10 µM geri primer	2 µl	5 µM
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,5 µl	0,25U
Kalıp (plazmit)	1,0 µl	1 pg–10 ng
dH ₂ O	78,5 µl	
Toplam	100,0 µl	

Tablo 3.7. PZR koşulları

Adım	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön denatürasyon	95 °C	2 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	30
Bağlanma	45-68 °C (Genellikle 58 °C)	30 sn	
Uzama	68 °C	1 dk	
Son Uzama	68 °C	5 dk	1

3.6.3.2. Agaroz jel elektroforezi

%0,8'lik agaroz hazırlamak için 100 ml 1X TBE'de 0,8 g agaroz (Sigma) karıştırıldı ve mikrodalgada ısıtılarak çözüldü. Eli yakmayacak şekilde soğutulduktan sonra 1 µl etidyum bromür (stok 10 mg/ml, Sigma) ilave edildi. Elektroforez tankına dökülen agaroz solüsyonu donduktan sonra 5 µl PZR örnekleri 1 µl 6X yükleme boyası (Sigma) ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez, oda sıcaklığında 120 voltta 40 dk kadar gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin hem kantitatif olarak nanodrop (BioSpec-nano- Shimadzu) cihazında hem de semi kantitatif olarak agaroz jel elektroforezinde saflıkları ve miktarları kontrol edildi. Gerekli görülmesi halinde, PZR ürünleri ya TE ile doyurulmuş fenol kullanılarak manuel olarak ya da DpnI enzimi (Thermo Scientific™, Kotolog No ER1701) kullanılarak saflaştırıldı.

3.6.3.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması

TE ile doyurulmuş fenol ile saflaştırma: 100 µl PZR ürünü, hacminin ½ oranında TE ile doyurulmuş fenol ve ½ oranında kloroform: izoamil alkol (24:1) karışımı vorteks (Wisemix) yardımıyla karıştırıldı. Karışım, oda sıcaklığında 12.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Oluşan üst faz farklı bir ependorfa alındı ve üzerine aynı hacimde kloroform: izoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek vortekslendi. Tekrar oda sıcaklığında 12.000 rpm’de 2 dk santrifüjlenen örneğin üst fazı farklı bir ependorfa alındı. Karışım üzerine, hacminin 1/25 oranında 5 M NaCl ve 2 katı oranında %100 etanol ilave edildi. Örnek, -80 °C’de 30 dk’dan fazla (ya da -20 °C’de 2 saatten fazla) bekletildi. Dondurucudan çıkan örnekler, 0 °C sıcaklığında 12.000 rpm’de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısmı atılan örneğin peleti eşit hacimde %70 etanol ile yıkandı. Yıkama sonucunda 0 °C sıcaklığında 12.000 rpm de 5 dk santrifüjlenen örneklerin süpernatant kısmı atıldı ve alkolü uçurulduktan sonra pelet 10-100 µl TE (pH 7,5) içerisinde çözüldü.

DpnI enzimi (Thermo Scientific™, Kotolog No ER1701) ile saflaştırma: Ticari olarak elde edilen enzimin Tablo 3.8’de gösterilen reaksiyon karışımı ve koşullarına göre kesim işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.8. DpnI enzimi reaksiyon karışımı ve koşulları

Bileşenler	Miktar	İşlem
DNA (PZR ürünü)	0,5-1 µg / µl	Karıştırıldı ve birkaç sn spin atıldı.
10X Tango buffer	1 µL	
DNase I, RNase-free	0,5-2 µL (1 U)	
dH ₂ O	16 µl	
		37 °C 1-16 saat inkübe edildi.
Enzimin inaktivasyonu için		80 °C 20 dk inkübe edildi.

3.6.3.4. Transformasyon

2 ml LB brot içerisine 100 mg/ml amp’den son konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde eklendi. BW25113 pKD46 ya da pKD20 plazmiti içeren hücreler inoküle edildi ve 30 °C’de 1 gece inkübe edildi. Oluşan ön kültürden 50 µl alınarak, içerisinde 100 µl Mg⁺²(2 M), 10 µl arabinoz (1 M) ve 10 µl 100 mg/ml amp içeren steril 9,9 ml SOB medyum içerisine eklendi. Hücreler, erlen içerisinde hücrelerin yoğunluğu OD₆₀₀’de absorbansı ~0,3’e ulaşıncaya kadar (~ 2-2,5 saat) 30 °C’de 160 rpm’de çalkalandı. Elde edilen hücreler 5 dk buz üzerinde soğutuldu ve 5 ml’si bir ependorfda, diğer 5 ml’si başka bir ependorfda olacak şekilde 4 °C sıcaklığında 12.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Oluşan peletlerin her biri 1 ml

soğuk 0,1 M CaCl₂ ile süspansiyon edildi ve 10 dk buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 4 °C sıcaklığında 12.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısmı atıldı ve pelletlerin her biri 200 µl soğuk 0,1 M CaCl₂ ile yeniden süspansiyon edildi. Hücreler 30 dk buzda inkübe edildi. Böylelikle transformasyonun gerçekleşmesi için iki alıcı (kompetant) hücre elde edildi. Elde edilen 200 µl komponent hücrelere iki ayrı konsantrasyonda (10-100 ng arasında) saflaştırılmış PZR ürünü ilave edildi. 30 dakikadan fazla buzda bekletildi. Oluşan hücre süspansiyonu 42 °C'de 90-120 sn arasında blok ısıtıcıda (Daihan) ısı şoku yapıldıktan sonra 1-2 dk buz üzerinde soğutuldu. Soğutulan hücrelere 800 µl SOC medyumdan ilave edildi ve 37 °C'de 60 dk 160 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerin yarısı 5.000 rpm'de 1 dk 4 °C'de santrifüjlenirken diğer yarısı oda sıcaklığında 1 gece bekletildi. Santrifüj sonunda oluşan pellet 100-150 µl SOC medyumda süspansiyon edilerek 10 µg/ml cm içeren LB petrilere yayıldı ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Transformasyon sonucunda oluşan kolonilerin doğruluğu, Tablo 3.9'da belirtilen gene ve antibiyotik kasetine spesifik primerler kullanılarak koloni PZR ile belirlendi. Gerçekleştirilen koloni PZR'nin reaksiyon karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3.6 ve 3.7'de belirtildi. Bu sayede, doğruluğu kontrol edilen hücreler, *E. coli* BW25113 mutant suşlarıdır. Elde edilen bu *E. coli* BW25113 mutant suşlarından ilgili gen bölgeleri, yukarıda belirtildiği şekilde P1 transdüksiyon yöntemi ile *E. coli* W3110'a aktarıldı ve bu hücreler çalışmalarda kullanıldı (Sato vd. 2000; Miller, 1992).

3.6.4. Tamamlanmış (komplementer) hücrelerin eldesi

Çalışmaların sonunda, istatistiksel analizlere göre, önemli rolü olduğu belirlenen genlerin rollerinin doğrulanması için, ana kromozomda mutant olan hücrelere gen bölgelerini taşıyan plazmitler transforme edildi. Elde edilen komplementer hücreler ile deneyler tekrar edildi. Bunun yanı sıra, yabancı tip *E. coli* W3110 hücresine boş vektör de transforme edildi ve çalışmalarda kontrol olarak kullanıldı.

3.6.4.1. Mutant genlerin PZR ile çoğaltılması, pLATE51 vektörüne ligasyonu

Komplementer hücrelerin elde edilmesi için yabancı tip *E. coli* W3110 hücresinden gen spesifik primerler (Tablo 3.5) yardımıyla, gen bölgeleri koloni PZR'nin reaksiyon karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3.6 ve 3.7'de belirtildi. Tablo 3.9'da listelenen primerler pLATE51 vektörüne spesifik uçlar içerecek şekilde oluşturuldu ve PZR da kullanıldı. Bu PZR ürünleri, ana kromozomda mutant olan hücrelere, ALICator LIC klonlama ve ekspresyon Kit 2

(Thermo Fisher Scientific) kullanılarak, kit prosedürüne uygun olarak pLATE51 vektörüyle aktarıldı. LIC yönteminin koşulları Tablo 3.10’da gösterildi.

Tablo 3.9. Komplementer hücrelerin elde edilmesinde kullanılan primerler

Primerler	Dizisi (5'.....3')
LIC - <i>ompA</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGATGACAAGATGAAAAAGACAGCTATCGCG
LIC - <i>ompA</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAAGCAGCGGGGTTTTCTAC
LIC - <i>ompC</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCC
LIC - <i>ompC</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAGAACTGGTAAACCAGACCCAGA
LIC - <i>ompF</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGATGAAGCGCAATATTCTGG
LIC - <i>ompF</i> - geri primeri	GGAGTGGGAAGTCATTAGAACTGGTAACGATACCCACAG
LIC - <i>ompG</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGTTATTTACCCTGTACCGC
LIC - <i>ompG</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTACGCATCTTATCCGGCCTACA
LIC - <i>ompT</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGAAAAGATGCGGGCGAAACTTCTGGG
LIC - <i>ompT</i> - geri primeri	GGAGATGGGAGTCATTAATGGCTAGTTATCCCCGGG
LIC - <i>lamB</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGATGATTACTCGAAACTTCC
LIC - <i>lamB</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTACCACCAGATTTCTCTGGGCAC
LIC - <i>phoE</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGAGCACTCTGGC
LIC - <i>phoE</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAGGTGAAGTTAACGGCGGCGTGAG
LIC - <i>cpxA</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGATAGGCAGCTTAACCGCG
LIC - <i>cpxA</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAATCAGGCATCCTGCTCAAAT
LIC - <i>cpxR</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGAATAAAATCCTGTTAGTTGATGATGACCG
LIC - <i>cpxR</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAAGCCAGAAGATGGCGAAGAT
LIC - <i>cusS</i> ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGGTCAGTAAGCCATTTACGCG
LIC - <i>cusS</i> geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAAGGTATGACTATTGCGGCAC
LIC - <i>cusR</i> ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGAACTGTTGATTGTCGAAG
LIC - <i>cusR</i> geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAGCGCTGAAATGGCTTACTGA
LIC - <i>cueR</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGAACATCAGCGATGTAGC
LIC - <i>cueR</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTATAACCCTACATATCCGAGCC
LIC - <i>rcnR</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGTCTCATACAATCCGTGA
LIC - <i>rcnR</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTACGGCAGTTTTACAATCGCGT
LIC - <i>nikR</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGCAACGAGTCACCATCAC
LIC - <i>nikR</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTATCGTTCACCAAAGGACCCAA
LIC - <i>zur</i> - ileri primeri	GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGACCACAACGCAGG
LIC - <i>zur</i> - geri primeri	GGAGATGGGAAGTCATTAGACGTGTACAAGGATGTACG
LIC - ileri primeri	TAATACGACTCACTATAGGG
LIC - geri primeri	GAGCGGATAACAATTTACACAGG

Tablo 3.10. LIC yönteminde ligasyon reaksiyon karışımı ve koşulları

Bileşenler	Miktar	İşlem
5X LIC tamponu	4 µl	
PZR ürünü	10-100 ng	
T4 DNA polimeraz	1 µl	
dH ₂ O	Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanır.	
		Karıştır ve oda sıcaklığında 5 dk. İnkübasyon
0,5 M EDTA	0,6 µl	
pLATE 51 vektörü	1 µl	
		Karıştır oda sıcaklığında 15 dk. İnkübasyon

pLATE51 vektörüne ligasyonu gerçekleştirilen her bir gen bölgesi, ilgili mutant hücrelere 3.6.2.4'de belirtildiği şekilde transforme edildi. Böylece elde edilen tamamlanmış hücrelerin 3.6.1.1'de belirtildiği şekilde koloni PZR ile doğrulaması yapıldıktan sonra stoklanarak çalışmalarda kullanıldı.

3.7. Metallerin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerlerinin belirlenmesi

Büyümede kullanılan CoCl₂, CuSO₄, NiCl₂ ve ZnSO₄ metallerin stok solüsyonu 0,2 M ve CdSO₄ metalinin stok solüsyonu ise 0,02 M olacak şekilde hazırlanarak çalışmalarda kullanıldı. Metallerin MİK değerlerinin belirlenmesi için tek bir bakteri kolonisi 5 ml LB broth besiyerinde 37°C'de 18 saat çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bakterilerin absorbansı OD₆₀₀ nm dalga boyunda 0,1'e ayarlandı. Daha sonra steril 60 ml LB besiyerinde 400 µl ön bakteri kültürü olacak şekilde çalışma kültürü hazırlandı. Bu kültürden 96 kuyucuklu mikro plakaya ilk kuyucuk 180 µl diğer kuyucuklar 100 µl olacak şekilde kültür eklendi. 180 µl'lik kuyucuğa metal stoklarından 20 µl eklenerek ½ seri sulandırma yapıldı. Plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi ve üremenin görülmediği en küçük konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlendi. Üreme görülmeyen kuyulardan 10 µl alınarak LB agar içeren petrilere damlatıldı. Ertesi gün üreme görülmeyen en küçük konsantrasyon MSK değeri olarak belirlendi. Bu değerler çalışmada kullanılan her bir mutant hücre için ayrı ayrı belirlendi.

3.8. Porin mutantlarının yaşamı üzerine metallerin etkisi

3.8.1. Büyüme deneyleri

Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların her birinin kültürleri 5 ml'lik Luria-Bertani (LB) brot içeren deney tüplerinde 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Elde edilen ön kültürler kullanılarak bakterilerin yoğunluğu 15 ml LB içeren erlenlerde OD₆₀₀'de 0,005 absorbansa ayarlandı. Hücrelerin bir setine kontrol için metal ilave edilmez iken diğer setine yabani tip *E. coli* W3110'a göre belirlenen MİK değerinin ¾ katı konsantrasyonda metal ilave edildi. Hücreler 37°C'de 160 rpm'de 8 saat boyunca büyütüldü ve büyümeleri sırasında her iki saatte bir örnek alınarak OD₆₀₀'de elde edilen veriler ile hücrelerin büyüme grafikleri çizildi.

3.8.2. Petri damlatma deneyleri

Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların her biri 10 ml LB brot besiyerine ekildi ve 37 °C'de 160 rpm çalkalamalı inkübatörde 18 saat büyütülerek ön kültürleri hazırlandı. Daha sonra bakterilerin ön kültürleri OD₆₀₀'de 1,0 absorbansa ayarlandı. Ayarlanan bakteriler ringer solüsyonu ile yıkandıktan sonra 10⁻¹-10⁻⁷ oranlarında dilüsyonları yapıldı. Yabani tipin MİK değeri dikkate alınarak 3 farklı konsantrasyon belirlendi ve bu miktarlarda metal içeren LB agarlar petrilere döküldü. Daha sonra bu petrilere bakterilerin 10⁻³-10⁻⁷ dilüsyonlarından 10 µl alınarak damlatma yöntemi ile ekim yapıldı. Petriler, 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Son olarak, metal direncinde rolü olduğu belirlenen mutantların tamamlanmış hücreleri ile deneyler tekrarlanarak doğrulaması yapıldı.

3.9. Porin mutantlarında metallerin meydana getirdiği biyomoleküler değişimler

3.9.1. Hücrelerin büyütülmesi ve toplanması

3.4.1 Büyüme deneylerinde belirttiği gibi hücreler büyütüldü. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların metalli ve metalsiz ortamda 37 °C'de 160 rpm'de 8 saat büyütüldükten sonra, hücrelerden 1 ml alınarak ependorflarda toplandı. Toplanan hücreler oda sıcaklığında 10.000 g'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısmı atılarak peletler 1 ml 1X PBS ile iki kere yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında ortamdan PBS tamamen uzaklaştırıldı ve kullanılabilecek kadar peletler -80 °C'de saklandı.

3.9.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) deneyleri ve analizi

Bakterilerin IR spektrumları, evrensel bir ATR Miracle aksesuarıyla donatılmış Frontier FTIR Spektrometresi (PerkinElmer, ABD) kullanılarak elde edildi. Büyütülen hücre

peletleri, 100 µl saf su içinde yeniden süspansiyon edildi. Hava spektrumu, referans olarak kullanılmıştır. 10 µL numune bir elmas/ZnSe kristal plakaya (PerkinElmer, ABD) yerleştirildi ve okumaları kaydedildi. Kontrol hücreleri ve metale maruz kalan hücreler, 4000 ila 650 cm⁻¹ spektral aralığında, oda sıcaklığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte ve 32 tarama gerçekleştirilerek incelendi. Tüm spektral analizlerde ikinci türev IR spektrumları kullanıldı.

3.10. Metaller ile ilişkili CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxA, CpxR, CusS ve CusR proteinlerinin porin genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi

3.10.1. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarının metal varlığında büyütülmesi ve örneklerin toplanması

Yabani tip *E. coli* W3110 ve metaller ile ilişkili genlerin mutant hücrelerinin (*cpxA*, *cpxR*, *cusS*, *cusR*, *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur*) her birinin kültürleri 5 ml'lik Luria-Bertani (LB) brot içeren deney tüplerinde 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Elde edilen ön kültürler kullanılarak bakterilerin yoğunluğu 15 ml LB içeren erlenlerde OD₆₀₀'de 0,005 absorbansa ayarlandı. İki set olacak şekilde hücreler OD₆₀₀'de 0,2-0,3 absorbansa (erken logaritmik evresi) ulaşmaya kadar 160 rpm'de 37 °C çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Büyümeye bırakılan hücreler istenilen absorbansa geldiğinde (OD₆₀₀'de 0,2-0,3) bir setine metal ilave edilmezken, diğer setine yabani tip *E. coli* W3110'a göre belirlenen metal MİK değerinin ¾ katı konsantrasyonda metal ilave edildi. 2 saat inkübasyona bırakıldı. İki saat sonunda büyütülen hücrelerden 1 ml olacak şekilde örnek alındı. Alınan örnekler 1 ml 1X PBS ile iki kere yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında ortamdan PBS tamamen uzaklaştırıldı ve RNA izolasyonu yapılana kadar peletler -80 °C'de saklandı. Ayrıca, yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların metalli ve metallsiz ortamda 6 saatlik büyüme grafikleri de elde edildi.

3.10.2. Total RNA izolasyonu ve cDNA eldesi

Büyüme sonucunda toplanan her bir örnekten ayrı ayrı RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonları, ticari firmalardan temin edilen NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) Kiti kullanılarak elde edildi. Ardından RNA örnek kalitesini iyileştirmek için DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific Inc.) ile Tablo 3.11'de belirtildiği şekilde muamele edildi. RNA örneklerinin kalitesi ve miktarı agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi. En az 3 bağımsız tekrarlı olacak şekilde deneyler gerçekleştirildi.

Tablo 3.11. DNase I reaksiyon karışımı ve koşulları

Bileşenler	Miktar	İşlem
RNA	1 µg	
10X reaksiyon tamponu (MgCl ₂ içeren)	1 µL	
DNase I, RNase-free	1 µL (1 U)	
dH ₂ O	Toplam hacim 10 µl'ye tamamlanır.	
		37 °C 30 dk. inkübasyon
50 mM EDTA	1 µL	
		65 °C 30 dk. inkübasyon

Porin proteinlerinin ekspresyon seviyelerini transkripsiyonel seviyede görmek için metalli ve metallsiz ortamlarda büyütülen yabancı tip *E. coli* (W3110) ve mutantlardan elde edilen RNA örneklerinden RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific Scientific Inc.) kiti kullanılarak ters transkripsiyon (RT-PZR) ile cDNA'lar elde edildi. cDNA sentezi reaksiyon karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3.12 ve 3.13'de verildi. Elde edilen cDNA'lar kullanılana kadar -20°C derin dondurucuda saklandı. Elde edilen cDNA'lar Gerçek zamanlı PZR (qPZR) için kalıp olarak kullanıldı.

Tablo 3.12. cDNA sentezi reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar
10X RT Buffer	2,0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
10X RT Random Primers	2,0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µL
dH ₂ O	4,2 µL
RNA	10,0 µL
Toplam	20 µL

Tablo 3.13. cDNA sentezi reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Zaman
1. Adım	25 °C	10 dk
2. Adım	37 °C	120 dk
3. Adım	85 °C	5 dk
4. Adım	4 °C	1 dk

3.10.3. Gerçek zamanlı PZR (qPZR)

Gerçek zamanlı PZR çalışmaları RealQ Plus 2X Master Mix Green (Ampliçon) kiti kullanılarak Agilent marka AriaMx Real-time PZR ile gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışımı ve koşulları sırasıyla, Tablo 3.14 ve 3.15’de verildi. qPZR’da, *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE* porin genlerine ve housekeeping gen olarak Beta-glukuronidaz (*uidA*) gen bölgesine spesifik olan primerler kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi Tablo 3.16’da gösterildi. qPZR, 95 ° C’de 15 saniye süreyle, ardından 60 ° C’de 1 dk süreyle inkübe edilerek 40 döngü şeklinde gerçekleştirildi. mRNA seviyeleri, housekeeping gen olan Beta-glukuronidaz (*uidA*) (Piednoir, vd.,2018) transkriptinin mRNA seviyelerine normalize edildi. Agilent Aria Software v1.5 yazılımı kullanılarak son hesaplamalar Livak metoduna (Delta delta Ct) göre Excel’de yapıldı. En az 3 bağımsız tekrarlı olacak şekilde deneyler gerçekleştirildi.

Tablo 3.14. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar
RealQ Plus 2x Master Mix	7,5 µL
10 µM ileri primer	0,5 µl (0,25 – 2 µl)
10 µM geri primer	0,5 µl (0,25 – 2 µl)
dH ₂ O	5,5 µL
cDNA	1,0 µL ((~5 ng (1 – 10 ng)))
Toplam	15 µL

Tablo 3.15. Gerçek zamanlı PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
1. Adım	95 °C	15 dk
2. Adım	95 °C	30 sn
3. Adım	60 °C	1 dk

Tablo 3.16. Gerçek zamanlı PZR’da kullanılan primerler

Primerler	Dizisi (5’.....3’)
<i>ompA</i> RT ileri primeri	GCGTGCAGACACTAAATCCA
<i>ompA</i> RT geri primeri	GACCGAAACGGTAGGAAACA
<i>ompC</i> RT ileri primeri	CTACATGCGTCTTGGCTTCA
<i>ompC</i> RT geri primeri	AATTCAGACCTGCGAATGC
<i>ompF</i> RT ileri primeri	GACATGACCTATGCCCGTCT
<i>ompF</i> RT geri primeri	TATTTAAGACCCGCGAATGC
<i>ompG</i> RT ileri primeri	CGAGGGTTATGGCGAAGATA
<i>ompG</i> RT geri primeri	CAGGCCGAAACTGAAATCAT
<i>ompT</i> RT ileri primeri	CGATCAGGACTGGATGGATT
<i>ompT</i> RT geri primeri	GGAACCACCTCTGGCTGTAA
<i>lamB</i> RT ileri primeri	TGAAGCTGGTGGTTCTTCT
<i>lamB</i> RT geri primeri	AGCCCTTCAGGACACTCTGA
<i>phoE</i> RT ileri primeri	CGATATGTTCCCGGAATTTG
<i>phoE</i> RT geri primeri	TTTTTAACGTCGCGGTTTC
<i>uidA</i> RT ileri primeri	CGGAAGCAACGCGTAAACTC
<i>uidA</i> RT geri primeri	TGATGGTATCGGTGTGAGCG

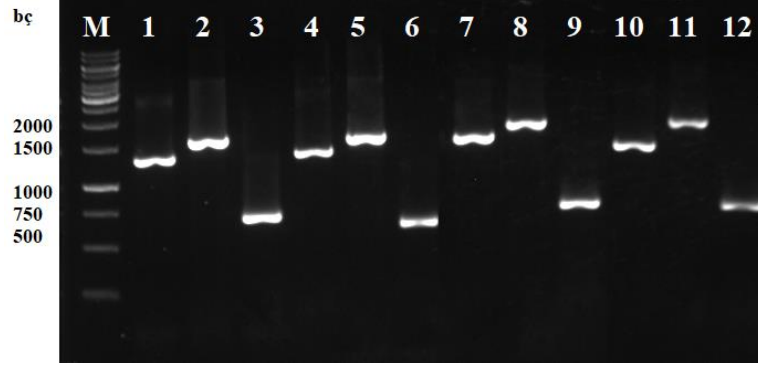
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç

4.1.1.Çalışmada kullanılan mutantların ve komplementer hücrelerin elde edilmesi

Çalışmamızda kullanılan ana suşlar, Japonya Genetik Ulusal Enstitüsü Keio koleksiyonundan alınmıştır. Bu koleksiyon, *E. coli* BW25113 tüm genlerinin nakavt (delesyon) edilmiş suşlarını içermektedir. Keio koleksiyonundan elde edilen *E. coli* BW25113'dan P1 transdüksiyon yöntemi ile *E. coli* W3110'a aktararak çalışmalarda kullanılmıştır (Sato vd. 2000; Miller, 1992). Bu çalışmada kullanılan *E. coli* W3110 porin mutantları (*ompA ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE*) 2015-01.BŞEÜ.04-02 nolu, W3110 *cpxA* ve W3110 *cpxR* mutant hücreleri 2012-02.BİL.04-01 nolu ve W3110 *cusS* ve W3110 *cusR* mutant hücreleri TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 nolu projelerimizde elde edilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan ve Tablo 3.1'de belirtilen yabancı tipi *E. coli* W3110 ve mutant hücreler şu an da bölümümüzün mikroorganizma koleksiyonunda %20 gliserol (Merck) içeren Luria-Bertani (LB) brothda (Merck) stoklanarak -80 °C derin dondurucuda saklanmaktadır.

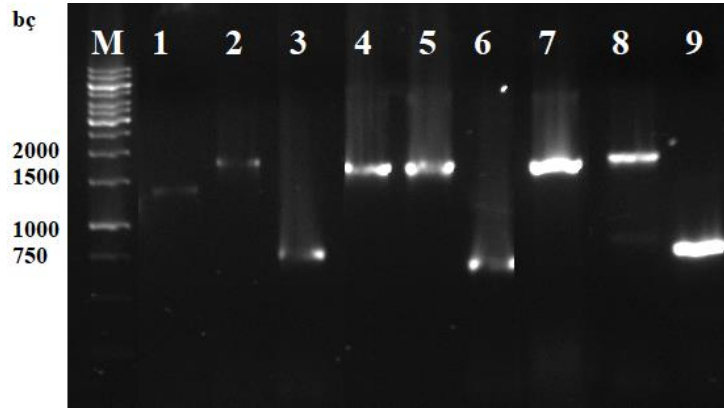
Çalışmada kullanılan *E. coli* W3110 ve mutant suşlar -80 °C derin dondurucudan alınarak taze besiyerinde canlandırıldı. Daha sonra bu bakterilerin antibiyotik direnç kasetlerinin kontrolü, ilgili gene spesifik ileri ve geri primerleri, Evrensel K1 geri primeri ve gen spesifik ileri primerleri kullanılarak yapılan koloni polimeraz zincir reaksiyonu (koloni PZR) ile sağlanmıştır (Şekil 4.1-4.5). Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, *ompA* nakavt mutantının kontrolü için f-r primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucu 1-2 nolu kuyucuklarda ve f-k1 primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucu 3 nolu kuyucukta verilmiş olup belirlenen büyüklükler *E. coli* W3110 f-r (1) için 1328 bç, *ompA*'nın f-r (2) için 1501 bç iken f-k1 (3) için 689 bç büyüklüğündedir. Aynı şekilde *ompC*'nin kontrolü için yapılan PZR sonucu *E. coli* W3110 f-r (4) için 1373 bç, *ompC*'nin f-r (5) için 1483 bç iken f-k1 (6) için 597 bç'dir. *ompF*'nin kontrolü için yapılan PZR sonucu *E. coli* W3110 f-r (7) için 1436 bç, *ompF*'nin f-r (8) için 1561 bç iken f-k1 (9) için 661 bç'dir. *ompG*'nin kontrolü için yapılan PZR sonucu *E. coli* W3110 f-r (10) için 1312 bç, *ompG*'nin f-r (11) için 1620 bç iken f-k1 (12) için 691 bç'dir.



Şekil 4.1. Yabani tip *E. coli* ve *ompA*, *ompC*, *ompF* ve *ompG* mutantlarının ileri (F)-geri (R) ve F-Kanamisin geri (K1) primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.

M: Marker, 1: W3110-(*ompA*/F-R), 2: *ompA*::km-(*ompA*/F-R), 3: *ompA*::km-(*ompA*/F-K1), 4: W3110-(*ompC*/F-R), 5: *ompC*::km-(*ompC*/F-R), 6: *ompC*::km-(*ompC*/F-K1), 7: W3110-(*ompF*/F-R), 8: *ompF*::km-(*ompF*/F-R), 9: *ompF*::km-(*ompF*/F-K1), 10: W3110-(*ompG*/F-R), 11: *ompG*::km-(*ompG*/F-R), 12: *ompG*::km-(*ompG*/F-K1)

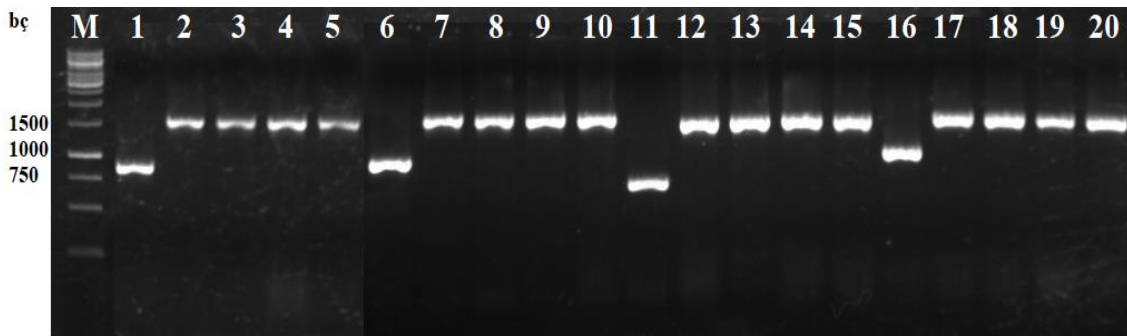
Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, *ompT*’nin kontrolü için yapılan PZR sonucu *E. coli* W3110 f-r (1) için 1360 bç, *ompT*’nin f-r (2) için 1620 bç iken f-k1 (3) için 740 bç’dir. *lamB*’nin kontrolü için yapılan PZR sonucu *E. coli* W3110 f-r (4) için 1539 bç, *lamB*’nin f-r (5) için 1412 bç iken f-k1 (6) için 605 bç’dir. Son olarak, *phoE* nakavt mutantının kontrolü için yapılan PZR sonucu *E. coli* W3110 f-r (7) için 1393 bç, *phoE*’nin f-r (8) için 1551 bç iken f-k1 (9) için 701 bç’dir.



Şekil 4.2. Yabani tip *E. coli* ve *ompT*, *lamB* ve *phoE* mutantlarının F-R ve F-K1 primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.

M: Marker, 1: W3110-(*ompT*/F-R), 2: *ompT*::km-(*ompT*/F-R), 3: *ompT*::km-(*ompT*/F-K), 4: W3110-(*lamB*/F-R), 5: *lamB*::km-(*lamB*/F-R), 6: *lamB*::km-(*lamB*/F-K), 7: W3110-(*phoE*/F-R), 8: *phoE*::km-(*phoE*/F-R), 9: *phoE*::km-(*phoE*/F-K)

Çalışmada kullanılmak üzere, tek gen delesyon yöntemiyle elde edilen *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* genlerinin nakavt edilmesi sonucunda oluşan hücrelerin doğrulaması, koloni PZR yöntemi ile yapıldı. Gen spesifik geri (r) ve gen spesifik ileri (f) primerleri kullanılarak yapılan koloni PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3'de gösterildi. *cueR::cm* için elde edilen PZR ürünlerinden 1. kuyucukta W3110'dan *cueR*(f-r) primerleri kullanılarak yapılan PZR ürünü 2-5'e kadar olan kuyucuklarda ise elde edilen farklı *cueR* nakavt hücrelerin PZR ürünleri yer almaktadır. Diğer genler için de benzer sıralama yapılmıştır. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, W3110'nun *cueR*(f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 825 bç (1), farklı *cueR::cm* mutantların *cueR*(f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 1524 bç (2-5), W3110'nun *nikR*(f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 830 bç (6), farklı *nikR::cm* mutantların *nikR* (f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 1580 bç (7-10), W3110'nun *rcnR*(f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 698 bç (11), farklı *rcnR::cm* mutantların *rcnR* (f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 1452 bç (12-15), W3110'nun *zur*(f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 1008 bç (16), farklı *zur::cm* mutantların *zur* (f-r) primerleri kullanılarak PZR ürününün büyüklüğü 1571 bç (17-20)'dir. Çalışma sırasında birden fazla mutant elde edilmiş olup, bunların en verimli şekilde çoğalanlarından biri seçilerek çalışmalarda kullanıldı. Jellerde elde edilen bantlar beklenen büyüklüklerde olduğu için mutantların doğru ve çalışır durumda olduğu tespit edildi.

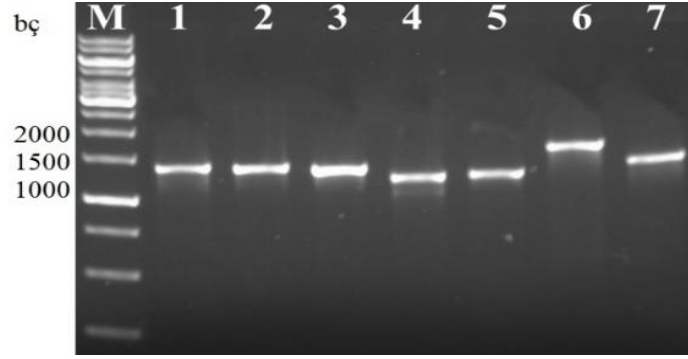


Şekil 4.3. Yabani tip *E. coli* ve mutantlarının F-R primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.

M: Marker, 1: W3110-(*cueR*/F-R), 2-5: *cueR::cm*-(*cueR* /F-R), 6: W3110-(*rcnR*/F-R), 7-10: *rcnR::cm*-(*rcnR*/F-R), 11: W3110-(*nikR*/F-R), 12-15: *nikR::cm*-(*nikR*/F-R), 16: W3110-(*zur*/F-R), 17-20: *zur::cm*-(*zur*/F-R)

Tamamlama testlerinde elde ettiğimiz mutantların, her birine ayrı ayrı ilgili genleri içeren pLATE51 vektörü transforme edilerek komplement hücreleri elde edildi. Transformasyon sonrasında oluşan komplement hücrelerin uygun antibiyotik kontrolünün

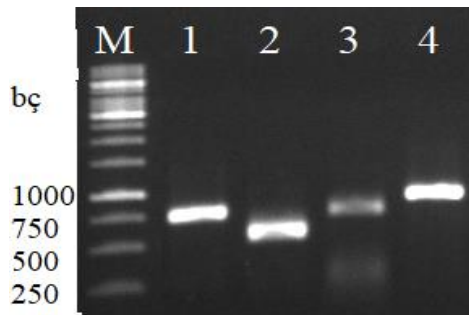
ardından, pLATE51 vektörüne spesifik ileri (LIC-F) ve geri (LIC-R) primerleri kullanılarak koloni polimeraz zincir reaksiyonu (koloni PZR) ile doğrulaması yapıldı. Şekil 4.4’de görüldüğü gibi, *ompA* komplement hücrelerinden elde edilen PZR ürünlerinin büyüklüğü 1307 bç, *ompC* için 1370 bç, *ompF* için 1355 bç, *ompG* için 1172 bç, *ompT* için 1220 bç, *lamB* için 1607bç ve *phoE* için ise 1322 bç’dir.



Şekil 4.4. Elde edilen porin mutantlarının komplement hücrelerin pLATE51 plazmitine özgü primerler Ligasyon ileri (LIC F)- ligasyon geri (LIC R) ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü.

M: Marker, 1: *ompA*::km pLATE51::*ompA*, 2: *ompC*::km pLATE51::*ompC* 3: *ompF*::km pLATE51::*ompF* 4: *ompG*::km pLATE51::*ompG* 5: *ompT*::km pLATE51::*ompT*, 6: *lamB*::km pLATE51::*lamB*, 7: *phoE*::km pLATE51::*phoE*

Yukarıda elde edilen *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* genleri nakavt olan hücrelerin komplementlerinin doğrulanması koloni PZR ile pLATE51 vektörüne spesifik ileri (LIC-F) ve geri (LIC-R) primerleri kullanılarak yapıldı. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi, *cueR* komplement hücrelerinden elde edilen PZR ürünlerinin büyüklüğü 752 bç, *rcnR* için 564 bç, *nikR* için 754 bç, ve *zur* için ise 965 bç’dir. Sonuç olarak, jeldeki bant büyüklüğüne göre, hücrelere transformasyon ile plazmitlerin aktarılabildiği ve komplement hücrelerin uygun şekilde elde edildiği doğrulandı.

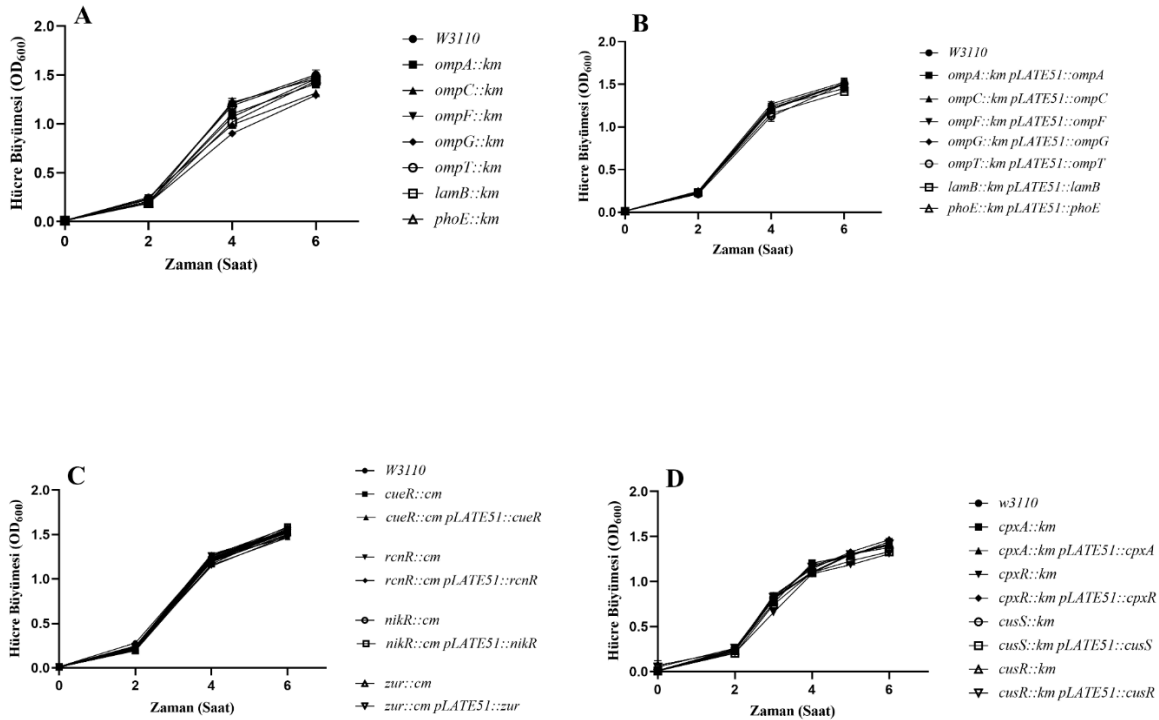


Şekil 4.5. Elde edilen *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarının komplement hücrelerin pLATE51 plazmitine özgü primerler (LIC F-R) ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü

M: Marker, 1: *cueR*::cm pLATE51::*cueR*, 2: *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* 3: *nikR*::cm pLATE51::*nikR* 4: *zur*::cm pLATE51::*zur*

4.1.2.Çalışmada kullanılan yabancı tip *E. coli* W3110 ve mutantların büyüme grafiği

Çalışmada kullanmak için elde edilen porin mutant hücrelerinin optimum koşullar altında (metalsiz, 37°C ve 160 rpm’de çalkalama) 6 saatlik büyümeleri izlendi. Şekil 4.6’da da görüldüğü üzere, elde edilen mutantların büyümelerinin yabancı tip *E. coli* W3110’dan farklı olmadığı belirlendi.



Şekil 4.6. Yabancı tip *E. coli* W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin metalsiz ortamdaki büyüme grafiği

4.1.3.Kadmiyum (Cd) stresi

4.1.3.1. Cd metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri

Büyüme deneylerinde kullanılacak olan metal miktarının belirlenebilmesi için, yabancı tip ve porin mutantlarının üzerine metallerin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri belirlendi. Elde edilen MİK ve MSK değerleri Tablo 4.1’de gösterildi. Yabancı tip *E. coli* W3110’a (288,57 µg/ml) göre, mutant suşların kadmiyum metalinin MİK değerleri arasında *ompC* mutanıtı hariç diğer mutanıtarda bir dirençlilik görülürken (384,76 µg/ml) MSK değerlerine göre *ompA* ve *ompC* mutanıtaları (sırasıyla 577,13 ve 384,76 µg/ml) duyarlılık kazanmıştır. Deneyler benzer şekilde mutanıtaların komplement hücreleriyle de gerçekleştirildi. Sonuçlar ise yabancı tip *E. coli*

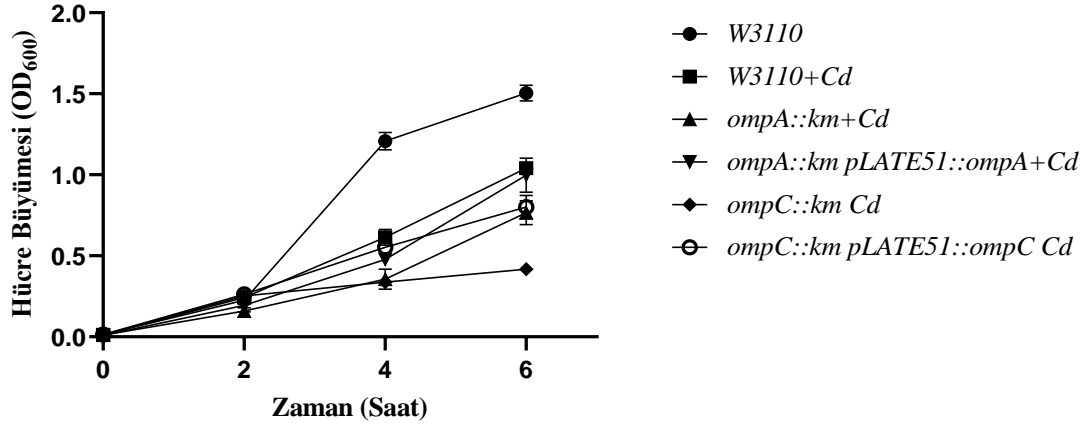
W3110 ile benzerlik gösterdi. Çalışmada yapılan bütün deneyler en az üç tekrar olacak şekilde yapıldı ve ortalamaları alınarak değerler belirlendi.

Tablo 4.1. *E. coli* W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine kadmiyum metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri

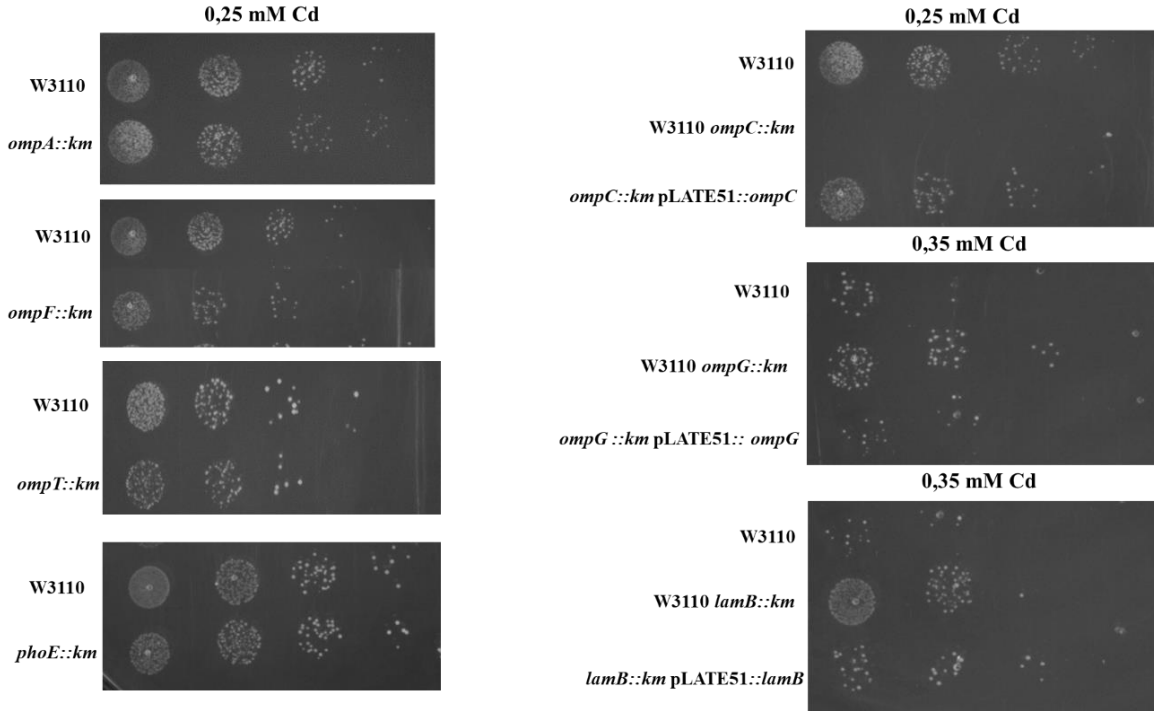
CdSO₄*8H₂O	Suşlar	MİK (µg/ml)	MSK(µg/ml)
	W3110	288,57	769,51
	<i>ompA::km</i>	384,76	577,13
	<i>ompA::km</i> pLATE51:: <i>ompA</i>	288,57	769,51
	<i>ompC::km</i>	288,57	384,76
	<i>ompC::km</i> pLATE51:: <i>ompC</i>	288,57	769,51
	<i>ompF::km</i>	384,76	769,51
	<i>ompF::km</i> pLATE51:: <i>ompF</i>	288,57	769,51
	<i>ompG::km</i>	384,76	769,51
	<i>ompG::km</i> pLATE51:: <i>ompG</i>	288,57	769,51
	<i>ompT::km</i>	384,76	769,51
	<i>ompT::km</i> pLATE51:: <i>ompT</i>	288,57	769,51
	<i>lamB::km</i>	384,76	769,51
	<i>lamB::km</i> pLATE51:: <i>lamB</i>	288,57	769,51
	<i>phoE::km</i>	384,76	769,51
<i>phoE::km</i> pLATE51:: <i>phoE</i>	288,57	769,51	

4.1.3.2. Cd metalinin büyüme üzerine etkisi

Kadmiyum metali varlığında porin genlerinin rolünün belirlenmesi için ilk olarak büyüme deneyi gerçekleştirildi. Bu deneyler sonucunda, yabancı tip *E. coli* W3110'a göre *ompA* ve *ompC* mutantları kadmiyum metaline karşı duyarlılık gösterdi (Şekil 4.7). Kadmiyum metalinin büyüme üzerine etkisi, yabancı tip *E. coli* W3110'un kadmiyum MİK değeri dikkate alınarak belirlenen, farklı konsantrasyonlarda kadmiyum içeren petrilere yapılan yaşam deneyi ile belirlendi. Bu sonuçlara göre, *ompC* mutantı kadmiyum metaline karşı duyarlı iken *ompG* ve *lamB* mutantları yabancı tip *E. coli* W3110'a göre daha dirençlidir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Yabani tip *E. coli* W3110, *ompA* ve *ompC* mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cd metali varlığında büyüme grafiği.

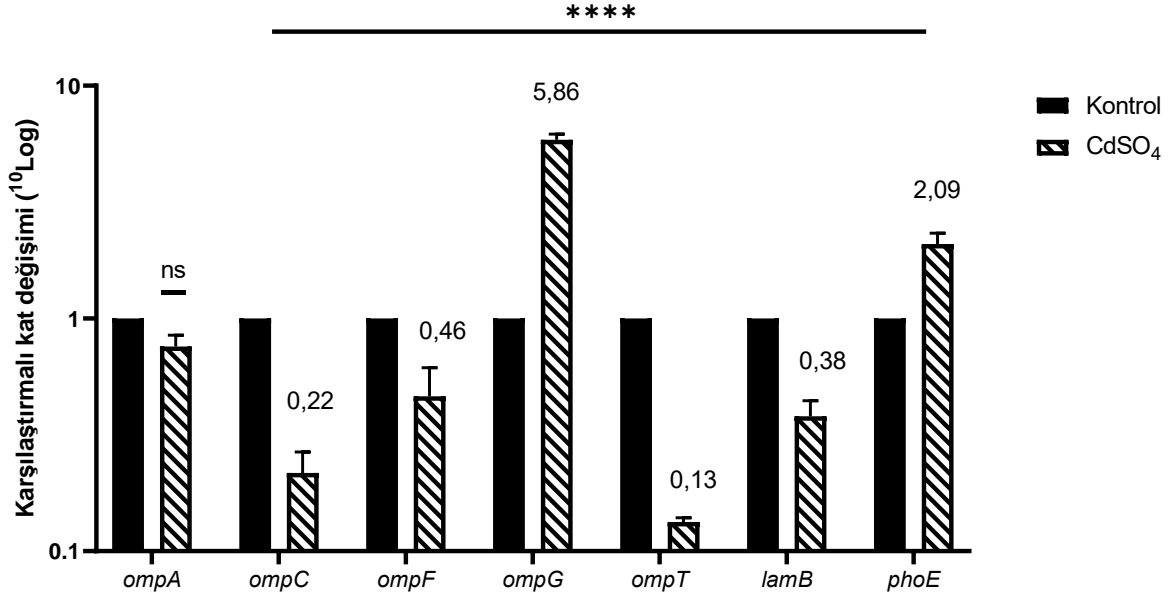


Şekil 4.8. Yabani tip *E. coli* W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cd metali varlığında petride yaşam deneyi.

4.1.3.3. Cd metali varlığında porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi

Çalışmada Cd metalinin porin genlerinin transkripsiyonel sentezine etkisi, ilk olarak yabani tip *E. coli* W3110’da belirlendi. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi, *ompA* (0,78) hariç diğer tüm porin genlerinin sentezindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Metalsiz ortamda yabani tip *E. coli* W3110’da sentezlenen porin genlerine (1,0) göre, Cd metali

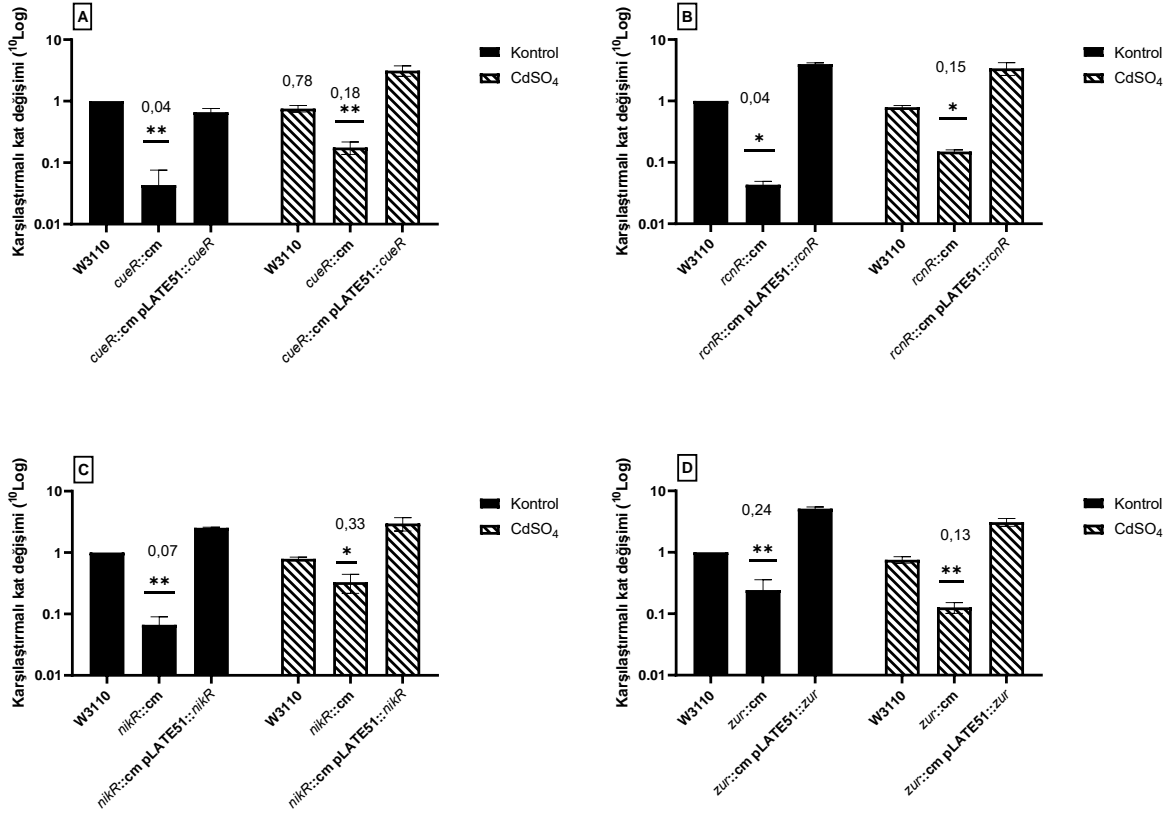
uygulanmış yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompT* (0,13), *ompC* (0,22), *lamB* (0,38) ve *ompF* (0,46) porin genlerinin sentezi azalırken *phoE* (2,09) ve *ompG* (5,86) genlerinin sentezi artmaktadır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Kadmiyum stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi.

4.1.3.3.1. *ompA* geninin sentezinde CueR, RcnR, NikR ve Zur'un rolü

Kadmiyum stresi varlığında, istatikselsel olarak önemli bulunmasa da yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompA* (0,78) geninin sentezi azalmaktadır. Metal homeostazında görevli temel genlerin bu azalıştan sorumlu olup olmadığı araştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda, metalsiz ortamda, *cueR* (0,04), *rcnR* (0,04), *nikR* (0,07) ve *zur* (0,24) genleri mutant hücrelerindeki *ompA* geninin sentezinde önemli oranda azalma görüldü. Bu azalma bu proteinlerin metalsiz ortamda *ompA* sentezinde önemli bir rolü olduğunu gösterdi. Ortama Cd ilave edildiğinde *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* genlerinin *ompA* üzerindeki etkisi değişmemiştir. Bu durum, bu proteinlerin *ompA* üzerindeki etkisinin metalden bağımsız olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, metal ilave edildiğinde, *ompA* geninin kısmen azalmasını sağlayan CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinleri dışında farklı bir düzenleyici bulunmaktadır (Şekil 4.10).

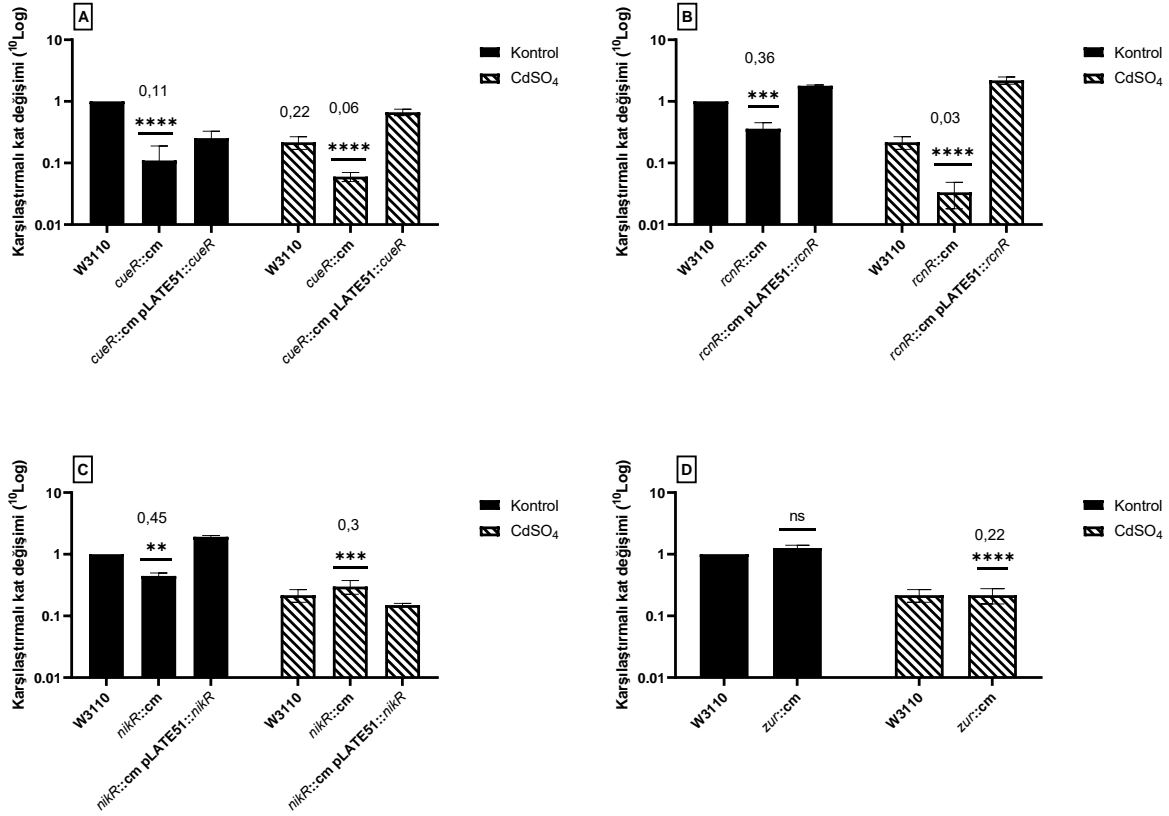


Şekil 4.10. Cd iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompA* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.3.3.2. *ompC* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Kadmiyum stresi varlığında yabancı tip *E. coli* W3110'da en fazla baskılanan porin proteinlerinden birisi *ompC* (0,22) genidir. Metalsiz ortamda yabancı tip *E. coli* W3110 (1) ile karşılaştırıldığında, *cueR* (0,11), *rcnR* (0,36) ve *nikR* (0,45) genlerinin yokluğunun *ompC* sentezinde rolü olduğu belirlenirken *zur* geninin hem metalli (0,22) hem de metalsiz ortamda (1,22) bir etkisinin olmadığı görüldü. Cd varlığında, yabancı tip *E. coli* W3110'da belirlenen *ompC* geninin (0,22) sentezindeki azalmanın, *cueR* (0,06) ve *rcnR* (0,03) genlerinin yokluğunda da benzer şekilde görülmesi, bu proteinlerin *ompC* geninin sentezinde metalden bağımsız rol oynadığını gösterdi. NikR proteininin yokluğunun ise Cd yokluğunda *ompC*'nin sentezi üzerinde önemli baskılamaya neden olduğu görüldü. Ancak, Cd varlığında *ompC* geninin sentezinde bir baskılanma görülmemesi, *ompC* genin sentezinde farklı bir düzenleyici olduğunu gösterir (Şekil 4.11).

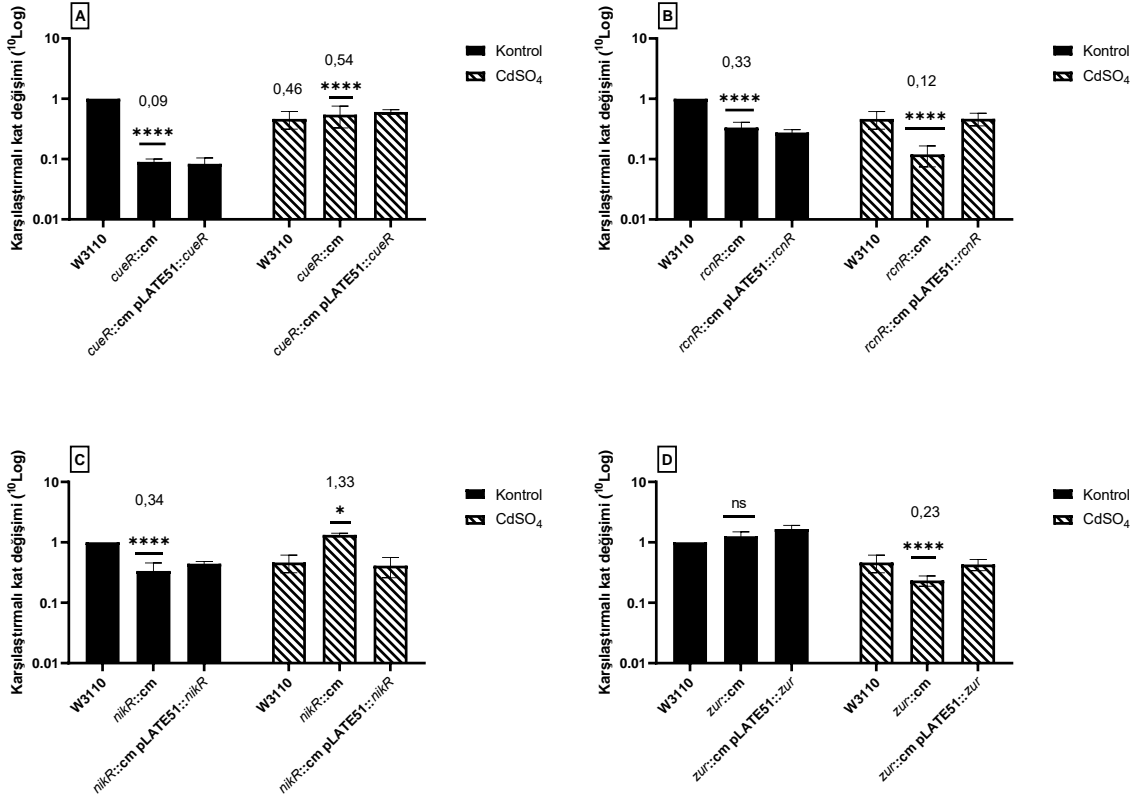


Şekil 4.11. Cd iyonları varlığında ve yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompC* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.3.3.3. *ompF* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'ün rolü

Metalsiz ortamda yabancı tip *E. coli* W3110'da **1,0** olarak belirlenen *ompF* geninin sentezi *zur* mutantında değişim göstermezken *cueR* (**0,09**), *rcnR* (**0,33**) ve *nikR* (**0,34**) mutantlarında oldukça baskılanmaktadır. Kadmiyum stresi varlığında yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompF* (**0,46**) geninin sentezi azalmaktadır. Ancak Cd iyonlarının etkisi ile gerçekleşen bu azalmanın, *rcnR* ve *zur* mutantlarında görülmesi bu proteinlerin *ompF* geninin sentezi üzerinde bir rolünün olmadığını gösterir. Ortama Cd ilave edildiğinde, *cueR*'nin nakavt edilmesi *ompF*'nin sentezinde değişikliğe neden olmazken, *nikR* mutantında ise *ompF*'nin sentezi artış gösterdi. Bu sonuçlara göre, *cueR*'nin mutant olması metale bağlı *ompF* geninin sentezinde farklı bir düzenleyicinin rolü olduğunu gösterirken, *nikR*'nin mutant olması düzenleyici proteinin NikR olduğunu gösterir (Şekil 4.12).

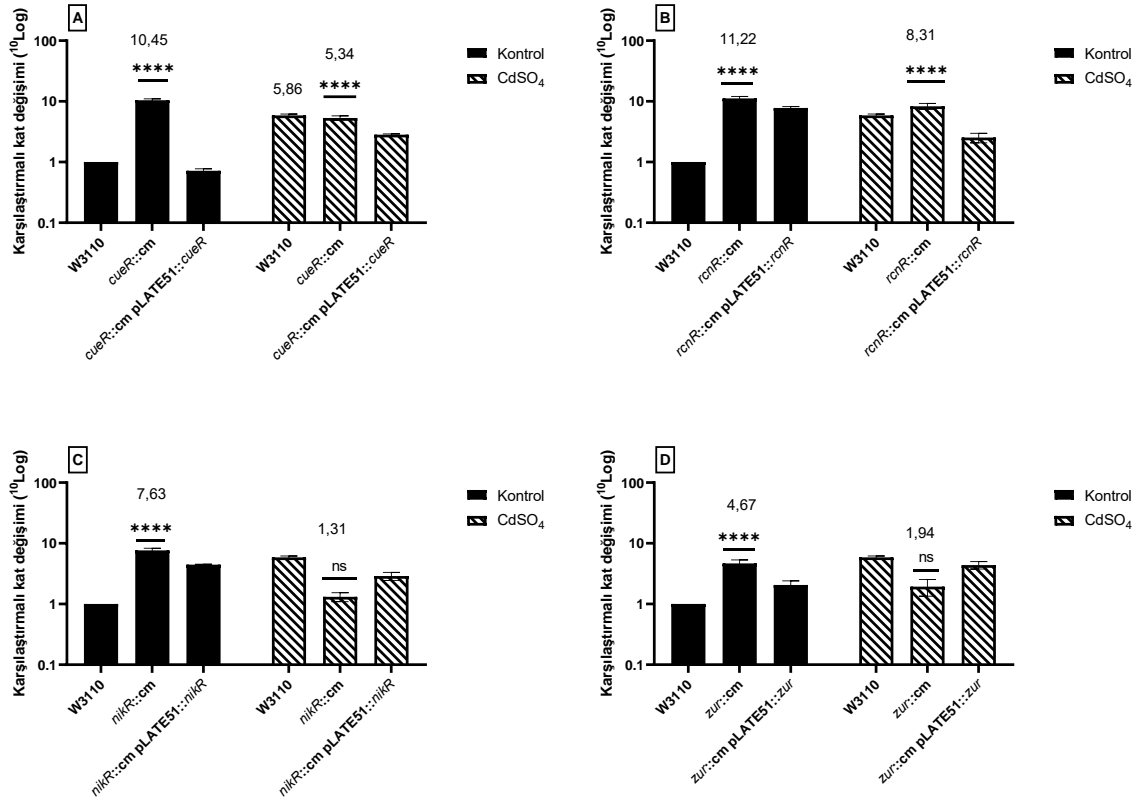


Şekil 4.12. Cd iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompF* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

4.1.3.3.4. *ompG* geninin sentezinde CueR, RcnR, NikR ve Zur'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'a (1,0) göre kadmiyum stresi altında en fazla artan *ompG* (5,86) genidir. Metalsiz ortamda *cueR* (10,45), *rcnR* (11,22), *nikR* (7,63) ve *zur* (4,67) genlerinin olmaması *ompG* geninin sentezini oldukça arttırmaktadır. Bu durum, metalsiz ortamda *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* genlerinin *ompG* gen sentezinin baskılanmasından sorumlu olduğunu gösterir. Ortama Cd ilave edildiğinde, yabani tip *E. coli* W3110'da gözlemlenen *ompG* geninin yaklaşık 5,5 kat'lık artışı, *cueR* ve *rcnR* nakavt hücrelerinde gözlenmedi. Dolayısıyla, CueR ve RcnR proteinlerinin Cd etkisi ile artan *ompG*'nin sentezinde rolü olmadığı, farklı bir düzenleyici tarafından regüle edildiği tespit edildi. *nikR* ve *zur mutant* hücrelerde Cd varlığında *ompG*'nin sentezi artmak yerine baskılanmaktadır. Bu durum Cd varlığında önemli derecede artan *ompG*'nin sentezinde, NikR ve Zur proteinlerinin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Şekil 4.13).

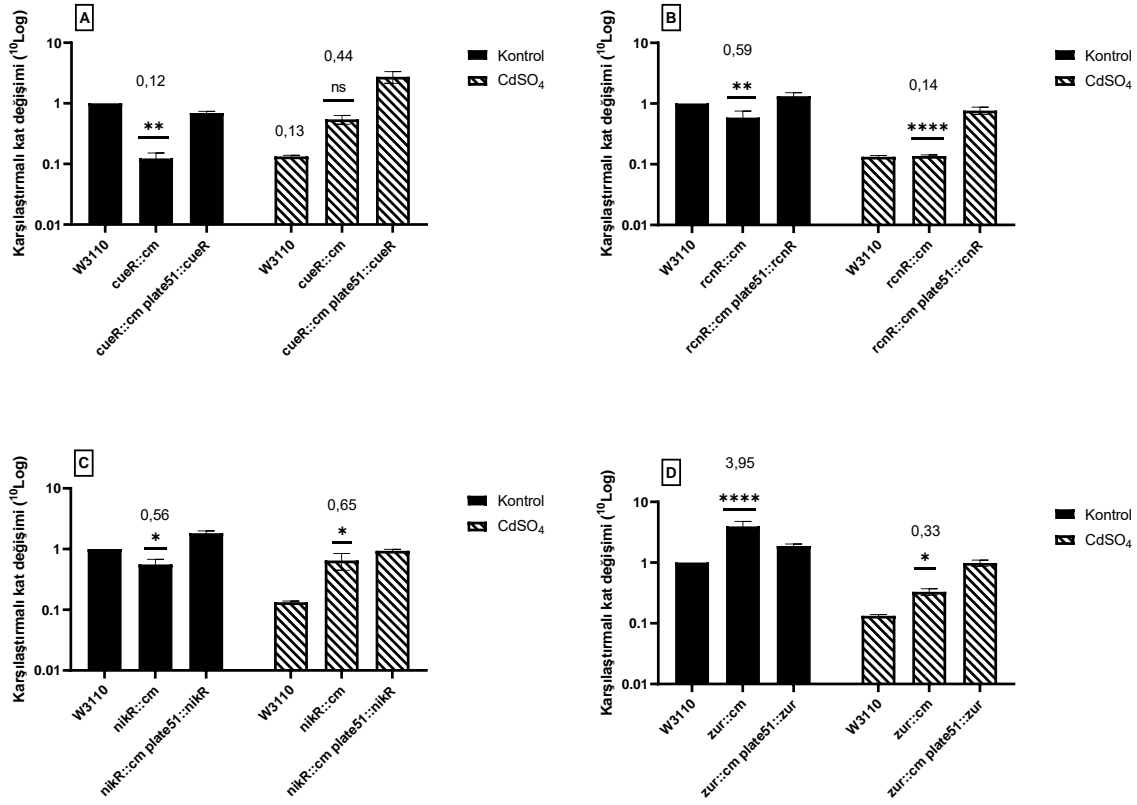


Şekil 4.13. Cd iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompG* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(**A:** *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* **B:** *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* **C:** *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* **D:** *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.3.3.5. *ompT* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'ün rolü

Kadmium stresi altındaki yabancı tip *E. coli* W3110'da en fazla baskılanan gen *ompT* (0,13)'dir. Metalsiz ortamda *cueR* (0,12), *rcnR* (0,59) ve *nikR* (0,56) mutantlarında yabancı tip *E. coli* W3110'a (1,0) göre *ompT* geninin sentezi baskılanırken, *zur* (3,95) mutantlarında ciddi bir artış meydana geldiği tespit edildi. Cd yokluğunda, başta *cueR* olmak üzere *rcnR* ve *nikR* proteinlerinin *ompT* gen ifadesinde, *Zur* regülatörünün ise *ompT* ifadesinin baskılanmasında önemli olduğunu söyleyebiliriz. Cd iyonlarının ortama eklenmesi ile baskılanan *ompT* geninin sentezi *rcnR* (0,14) ve *zur* (0,33) mutantlarında da azalma şeklinde belirlendi. RcnR ve Zur proteinlerinin *ompT* üzerindeki rolü, metalden bağımsızdır. Bununla birlikte, Cd iyonlarının eklenmesi sonucunda *cueR* (0,44) ve *nikR* (0,65) mutantlarında *ompT*'nin ifadesi artmıştır (Şekil 4.14). Böylece, *ompT*'nin ifadesinin Cd iyonları varlığında baskılanmasından CueR ve NikR proteinlerinin rol oynadığı belirlendi.

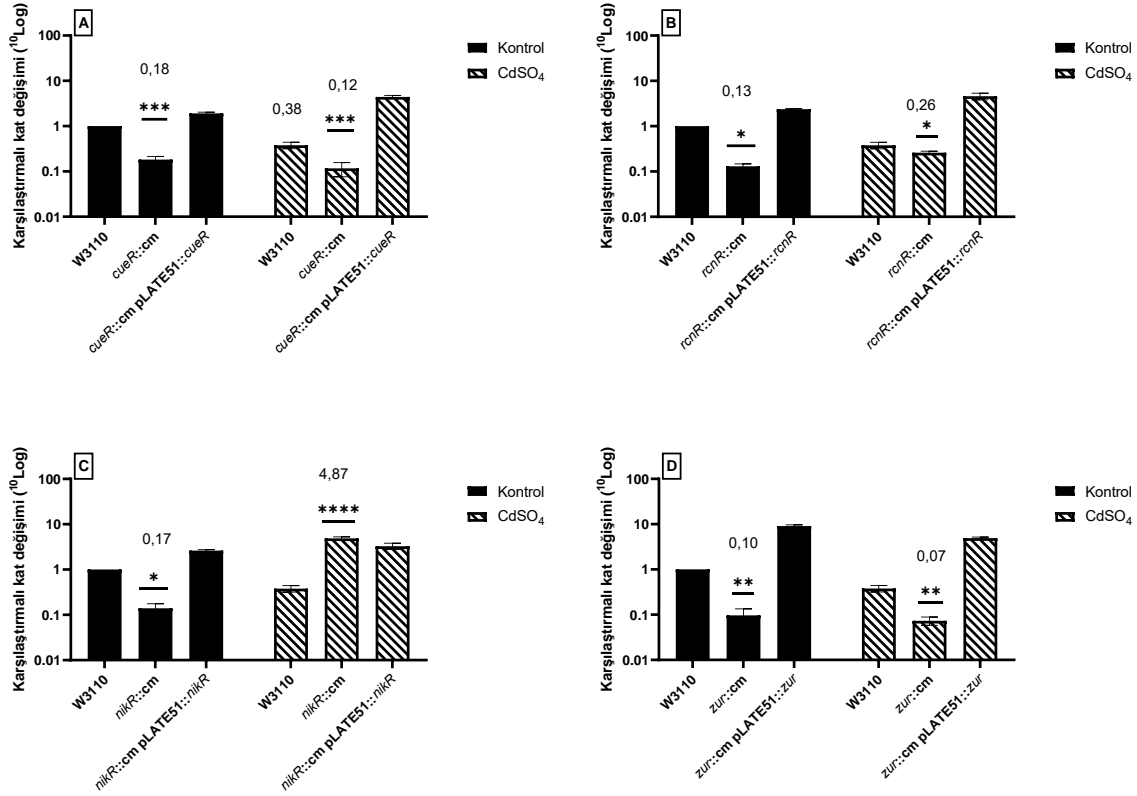


Şekil 4.14. Cd iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompT* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

4.1.3.3.6. *lamB* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'a kadmiyum ilave edilmesi sonucunda baskılanan bir diğer porin ise *lamB* (0,38)'dir. Kadmiyum yokluğunda, *cueR* (0,18), *rcnR* (0,13), *nikR* (0,17) ve *zur* (0,10) mutantlarında yabani tip *E. coli* W3110'a göre yaklaşık **10 kat** bir baskılanma görüldü. Bu baskılanmanın, *cueR*, *rcnR* ve *zur* mutantlarında, Cd iyonlarının ilave edilmesi ile de devam ettiği belirlendi. CueR, RcnR ve Zur proteinleri metalden bağımsız olarak *lamB* geninin ifadesini değiştirmektedir. *nikR* mutantlarında ise Cd iyonlarının etkisi ile *lamB* gen ifadesinde **~5 kat (4,87)** artış oldu. Bu artış, Cd varlığındaki *lamB* geninin baskılanmasından NikR proteininin sorumlu olduğunu gösterir (Şekil 4.15).

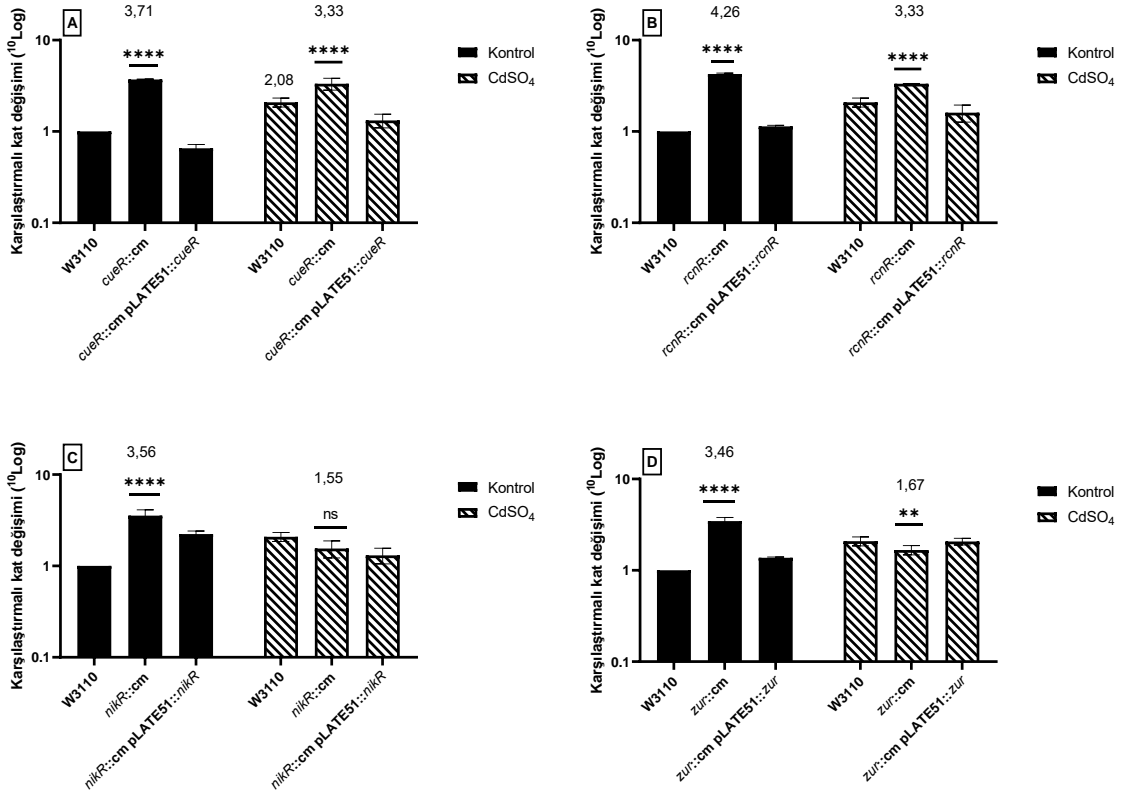


Şekil 4.15. Cd iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *lamB* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(**A:** *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* **B:** *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* **C:** *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* **D:** *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.3.3.7. *phoE* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da kadmiyum stresi ile artış gösteren ikinci porin ise *phoE* (2,09) olarak belirlendi. *ompG* geninde olduğu gibi, metalsiz ortamda *cueR* (3,71), *rcnR* (4,26), *nikR* (3,56) ve *zur* (3,46) mutantlarında gözlemlenen *phoE* geninin sentezi de önemli ölçüde artmaktadır. Bu artış, yabani tip *E. coli* W3110'da Cd iyonları yokluğunda, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin *phoE* geninin sentezini baskıladığını gösterir. Cd ortama eklendiğinde, *cueR* ve *rcnR* mutantlarında değişim gözlenmezken, *nikR* (1,55) ve *zur* (1,67) mutantlarında **2 kat'lık** baskılama gözlemlendi. Şekil 4.16'ya göre, CueR ve RcnR proteinlerinin *phoE* üzerindeki rolü metalden bağımsız iken, NikR ve Zur proteinlerinin Cd iyonları varlığında *phoE* gen ifadesinin artmasında rol oynadığı söylenebilir.



Şekil 4.16. Cd iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *phoE* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

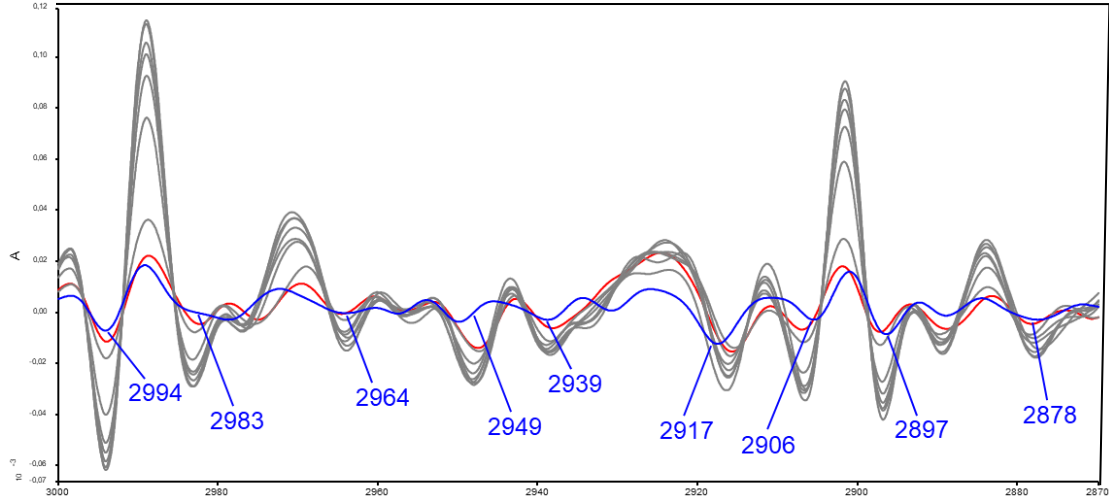
(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.3.4. Cd metalinin porin mutantlarında (*ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE*) meydana getirdiği biyomoleküler değişiklikler

Metallerin porin mutantlarında meydana getirdiği biyomoleküler değişiklikler ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak aydınlatıldı. Metale maruz kalmamış (kontrol grubu) ve maruz kalmış yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının spektrumları, tüm IR bölgesinde (4000-650 cm⁻¹) incelendi. Tespit edilen spektral bantlar, membran lipidleri (3100-2800 cm⁻¹), parmak izi (karma bölge: yağ asitleri, proteinler ve lipid /1800-1400 cm⁻¹), nükleik asitler (1250-1200 cm⁻¹) ve polisakaritler (1100-1000 cm⁻¹) olmak üzere 4 ana bölgede analiz edildi.

Membran lipidleri (3100-2800 cm⁻¹); Bu bölgenin karşılaştırılması sonucunda önemli değişim gösteren 9 adet spektrum bandı belirlenmiştir. Bu bantlardan 2994, 2982 ve 2964 bantları, metil gruplarından C-H'nin asimetrik gerilme titreşimi olarak tanımlanırken,

2947, 2938, 2916, 2907 ve 2897 cm^{-1} bantları total lipit moleküllerini (CH_2 anti simetrik, CH_2 simetrik gerilmesi, CH_3 anti simetrik) temsil etmektedir. Bu alana genel anlamda bakıldığında Cd iyonlarına maruz kalan yabani tip *E. coli* W3110 ile kontrol grubu yabani tip *E. coli* W3110 arasında önemli bir fark görülmesine de porin mutantlarında total lipit miktarının arttığı belirlendi (Şekil 4.17).



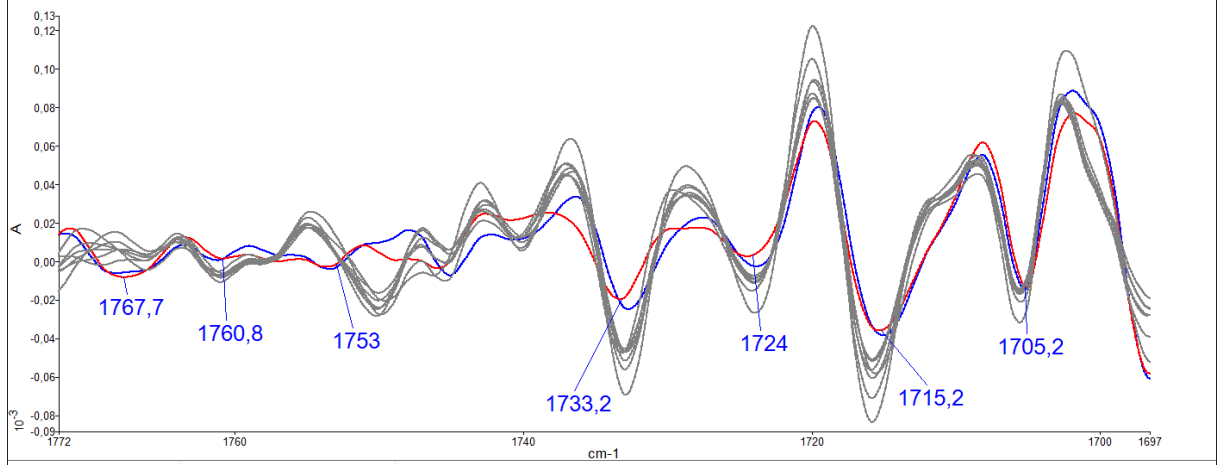
Şekil 4.17. 3100-2800 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cd iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Cd iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

Bakteriyel yağ asitleri (1800-1700 cm^{-1}); Yoğun olarak trigliseritleri (TG'ler) (lipitlerin $\text{C}=\text{O}$ germe modu) içeren bu bölge karma bölge olarak da nitelendirilmektedir. Genel olarak, Cd iyonlarının varlığında ve yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinin burada temsil edilen moleküllerin miktarlarında değişim görülmezken porin mutantlarında yüksek bir artış tespit edildi. Bu bölgede toplam 7 spektral bant incelendi ve Cd iyonlarının etkisi ile porin mutantlarında sadece 1768 cm^{-1} spektral bandını temsil eden C-H bükme aromatik halka yapılarında azalma tespit edildi. Belirlenen 1761 (alifatik grup, hidrokarbonlar), 1753 (yağ asitleri), 1733 (lipit esterlerinin), 1724 (polyester depolayan bileşikler), 1715 (fosfolipitlerin $\text{C}=\text{O}$ gerilmesi) ve 1705 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ timin) spektral bantlarını belirten moleküller de ise artış görüldü (Şekil 4.18).

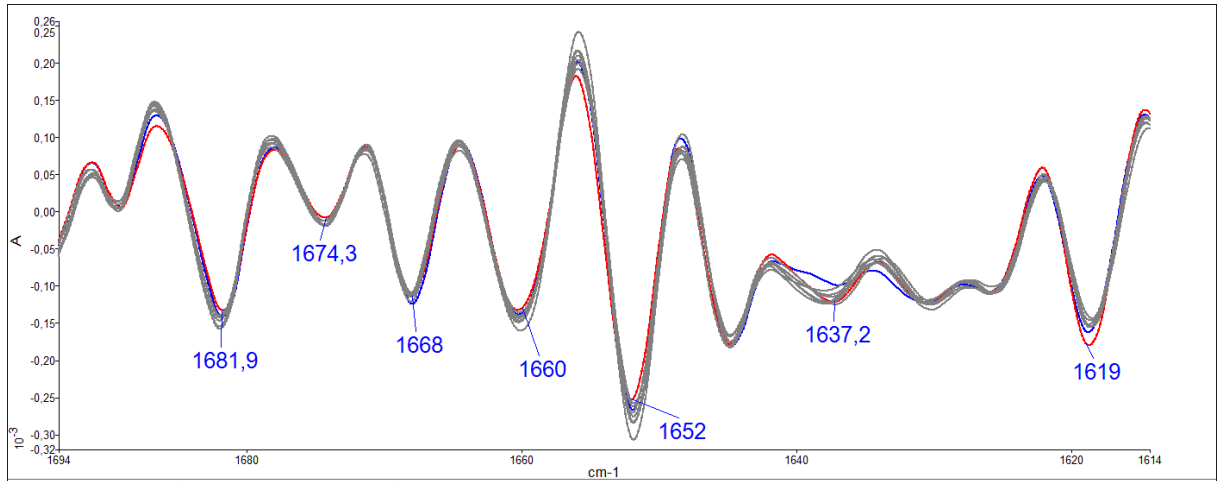
Bakteriyel proteinler Amid I Bölgesi (1700-1600 cm^{-1}); Bu bölgede genel olarak yabani tip *E. coli* W3110'da hem kadmiyum metalinin varlığında hem de yokluğunda belirlenen 7 farklı spektral bandı temsil eden moleküllerin benzer profil sergilediği belirlendi.

Cd iyonlarına maruz bırakılan yabani tip *E. coli* W3110 ile porin mutantlarının karşılaştırılması sonucunda, bölgedeki 1682 (Adenin), 1660 (Amide I bant) ve 1652 (α -sarmal yapılarının bir özelliği olan C-O'nun gerilme) bantlarının temsil ettiği moleküllerin porin mutantlarında artarken, 1637 (β -tabaka yapıları) ve 1619 cm^{-1} (Fenil halkasının C-C gerilmesi) spektral bantlarını belirten β -tabaka yapılarının azaldığı görüldü (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. 1800-1700 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

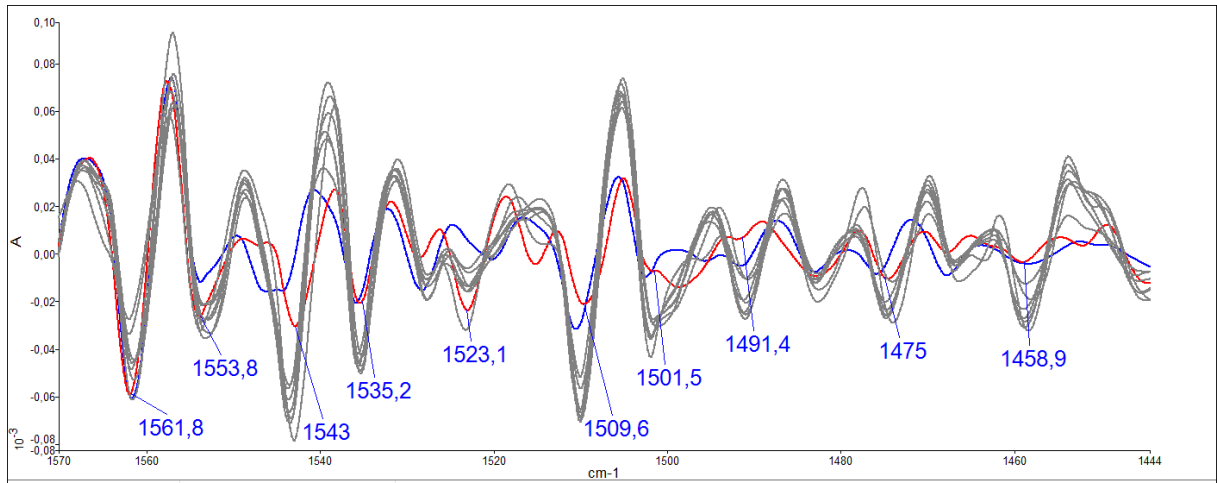
Mavi çizgi: Cd iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Cd iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.



Şekil 4.19. 1700-1600 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cd iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Cd iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

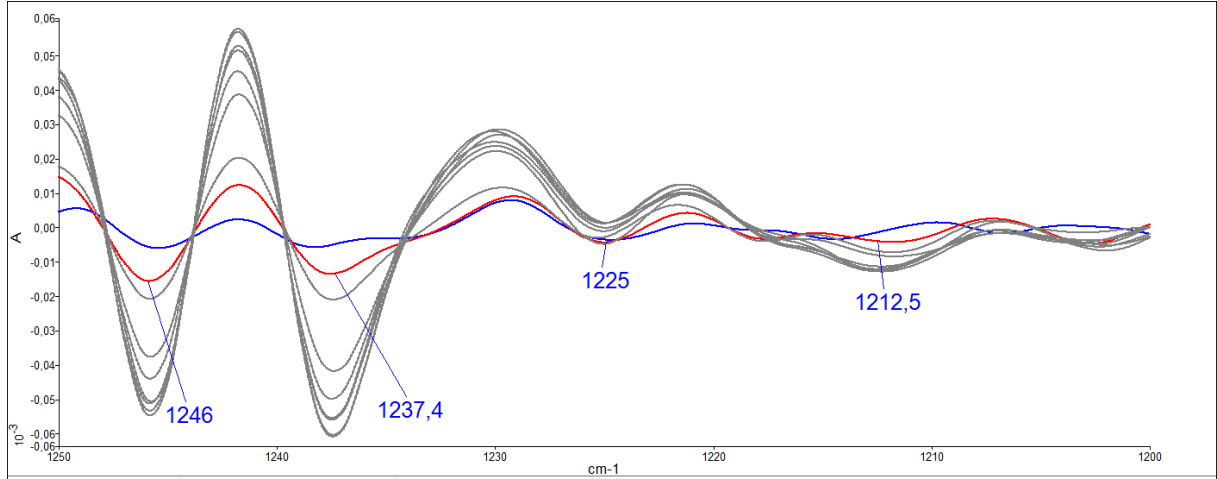
Bakteriyel proteinler Amid II Bölgesi (1600-1400 cm^{-1}); Yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinin Cd varlığında ve yokluğunda belirlenen 1562 (aromatik halkalardan uzanan C-C), 1535 (%60 N—H bükülme,%40 C—N esneme), 1475 (Lipitlerde metilen zincirlerinin CH_2 bükülmesi) ve 1459 cm^{-1} (CH_3 bükülme titreşimi) bant yapılarında önemli bir farklılık görülmediği, 1554 (CH_3 asimetrik), 1543 (N-H bükülmesi), 1523 (C=N, C=C esnemesi) ve 1502 cm^{-1} (Fenil halkalarından düzlem içi CH bükülme titreşimi) bantlarına karşılık gelen proteinlerin yoğunluğunun ise Cd varlığındaki yabani tip *E. coli* W3110’da arttığı belirlendi. Cd varlığında, porin genlerinin olmamasının hücrede 1562 (C-C germe titreşimi) ve 1523 cm^{-1} (C=N germe titreşimi) bantlarında artışa sebep olduğu tespit edildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. 1600-1400 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cd iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Cd iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

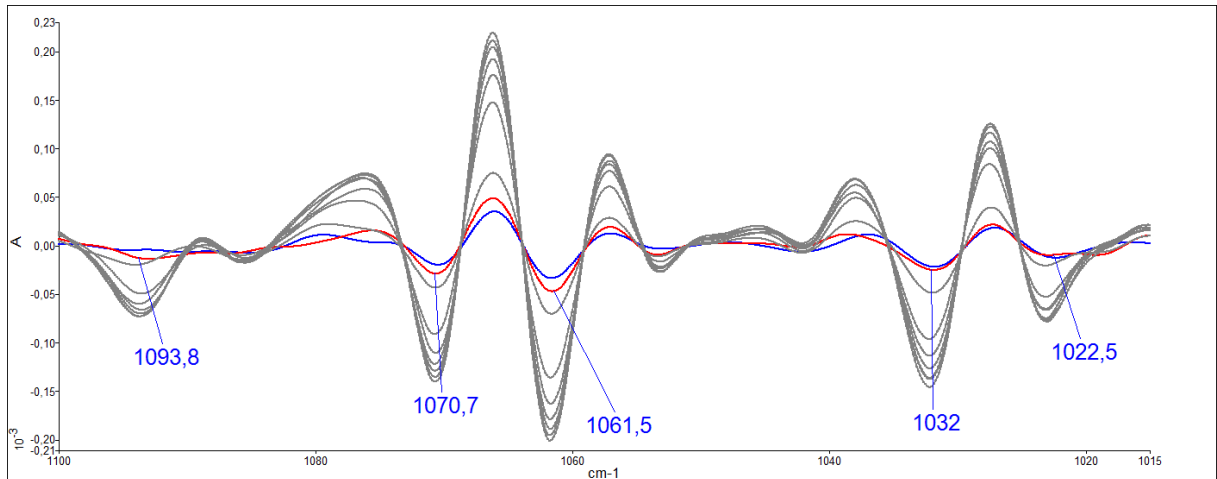
Nükleik asit bölgesi (1250-1200 cm^{-1}); Bu bölgede belirlenen 1246 cm^{-1} (gerilen PO_2 simetrik titreşim, Fosfat I), 1237 cm^{-1} (PO_2^{2-} anti simetrik esneyen, DNA’nın A formu) ve 1213 cm^{-1} (DNA’nın Z formu) bantları simgeleyen moleküllerin Cd iyonlarının varlığında hem yabani tip *E. coli* W3110’da hem de *E. coli* porin mutantlarında arttığı belirlendi. Buna karşı olarak 1225 cm^{-1} bantı gösteren DNA’nın B formunun (DNA ve RNA’daki fosfodiester bağlantılarının fosfat gruplarının asimetrik gerilmesi) yoğunluğu Cd iyonlarının etkisi ile yabani tip *E. coli*’de değişmez iken, porin mutantlarında belirgin bir azalma görüldü. Bu durum, Cd varlığında porin mutantlarında DNA’nın B formunun azalarak A ve Z formuna dönüştüğünü gösterir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. 1250-1200 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cd iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Cd iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

Bakteriyel Polisakkaritler (1100-1000 cm^{-1}); Yabani tip *E. coli* W3110'un kadmiyum metali varlığında ve yokluğunda bu bölgedeki bandı temsil eden moleküllerde önemli bir farklılık görülmedi. Ancak, Cd iyonları varlığında porin genlerinin herhangi birinin yokluğunun 1094 (polisakkaritler-selüloz), 1071 (Mannoz ve mannoz-6-fosfat), 1062 (C-O germe), 1032 (kolajen) ve 1023 cm^{-1} (Glikojen) bantlarını işaret eden moleküllerde önemli ölçüde artışa sebep olduğu belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cd iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cd iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Cd iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

4.1.4. Kobalt (Co) stresi

4.1.4.1. Co metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri

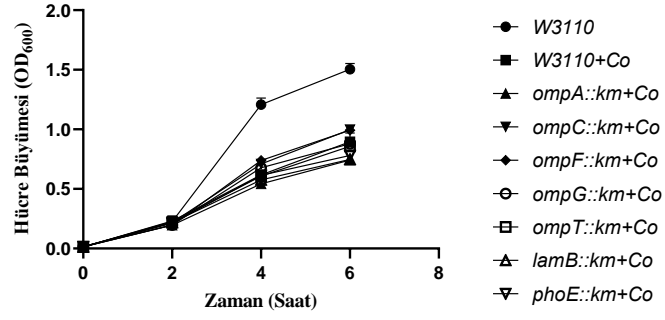
Yabani tip *E. coli* W3110'nun kobalt metaline karşı elde edilen MİK değeri **297,41 µg/ml** olup, mutant suşlar arasında bir farklılık gözlenmedi. Ancak MSK değerleri yabani tip *E. coli* W3110 (**446,12 µg/ml**) ile karşılaştırıldığında, *ompF* (**1784,48 µg/ml**), *ompT* (**892,24 µg/ml**) ve *phoE* (**892,24 µg/ml**) mutantlarının kobalt metaline karşı daha dirençli olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *E. coli* W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine kobalt metalinin MİK ve MSK değerleri

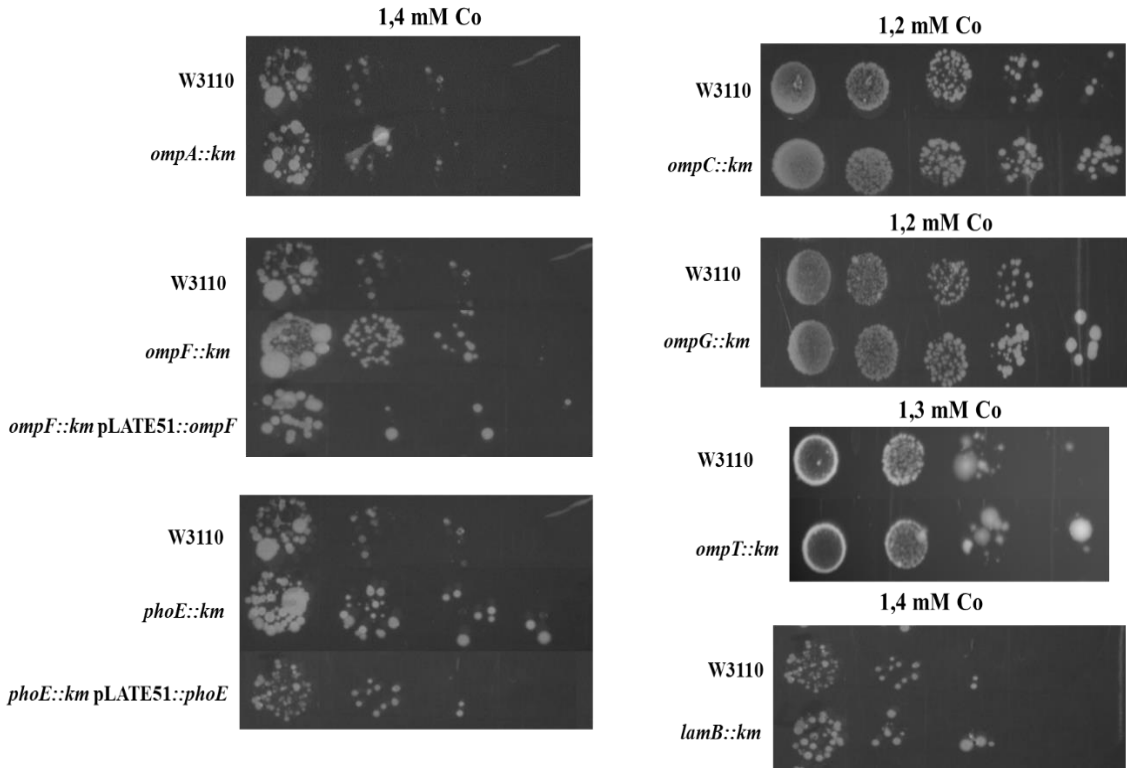
	Suşlar	MİK (µg/ml)	MSK(µg/ml)
	CoCl ₂ *6H ₂ O	W3110	297,41
<i>ompA::km</i>		297,41	446,12
<i>ompA::km</i> pLATE51:: <i>ompA</i>		297,41	446,12
<i>ompC::km</i>		297,41	446,12
<i>ompC::km</i> pLATE51:: <i>ompC</i>		297,41	446,12
<i>ompF::km</i>		297,41	1784,48
<i>ompF::km</i> pLATE51:: <i>ompF</i>		297,41	446,12
<i>ompG::km</i>		297,41	446,12
<i>ompG::km</i> pLATE51:: <i>ompG</i>		297,41	446,12
<i>ompT::km</i>		297,41	892,24
<i>ompT::km</i> pLATE51:: <i>ompT</i>		297,41	446,12
<i>lamB::km</i>		297,41	446,12
<i>lamB::km</i> pLATE51:: <i>lamB</i>		297,41	446,12
<i>phoE::km</i>		297,41	892,24
<i>phoE::km</i> pLATE51:: <i>phoE</i>		297,41	446,12

4.1.4.2. Co metalinin büyüme üzerine etkisi

Kobalt metalinin sıvı besiyerinde çoğalma üzerine etkisi incelendiğinde porin mutantlarının yabani tip *E. coli* W3110'dan farklı olmadığı belirlendi ve Şekil 4.23'de gösterildi. Kobalt metalinin petrielerde yapılan yaşam deneyi sonuçlarında ise *ompF* ve *phoE* mutantlarında yabani tip *E. coli* W3110'a göre bir kademe dirençlilik gözlemlendi (Şekil 4.24).



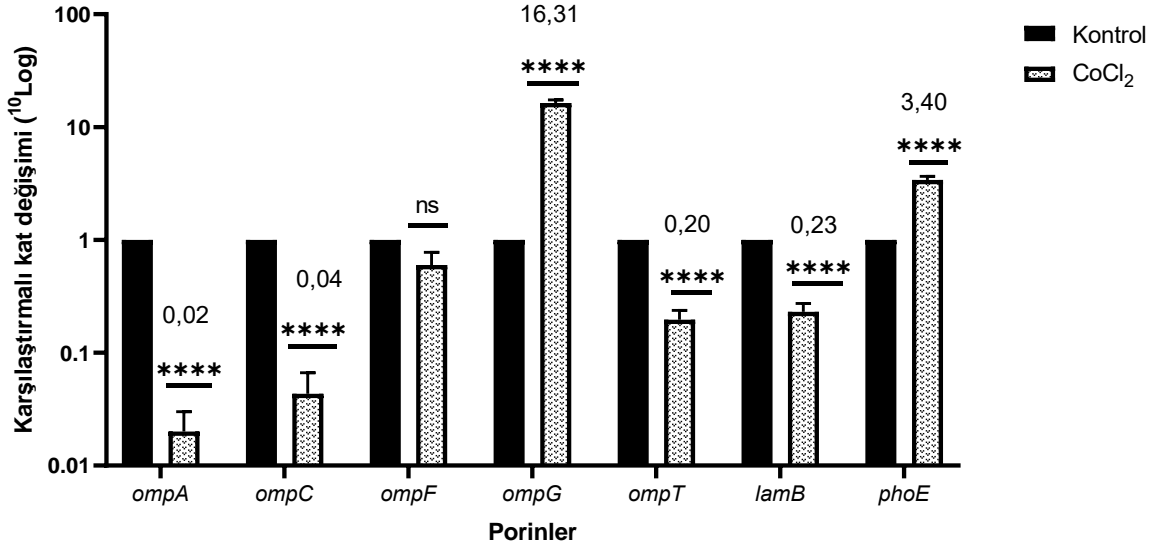
Şekil 4.23. Yabani tip *E. coli* W3110 ve bütün porin mutant suşlarının Co metali varlığında büyüme grafiği



Şekil 4.24. Yabani tip *E. coli* W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Co metali varlığında petride yaşam deneyi.

4.1.4.3. Co metali varlığında porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi

Çalışmada Co stresi altında yabani tip *E. coli* W3110'daki porin genlerinin transkripsiyonel seviyedeki sentezi Şekil 4.25'de gösterildi. Buna göre, *ompF* hariç bütün porin genlerinin Co iyonları varlığındaki değişimleri istatistiksel olarak önemli bulundu. Genel olarak, yabani tip *E. coli* W3110'da Co varlığında *ompA* (0,02), *ompC* (0,04), *ompT* (0,20) ve *lamB* (0,23) porin genlerinin sentezi azalırken *ompG* (16,31) ve *phoE* (3,40) genlerinin sentezi artmaktadır.



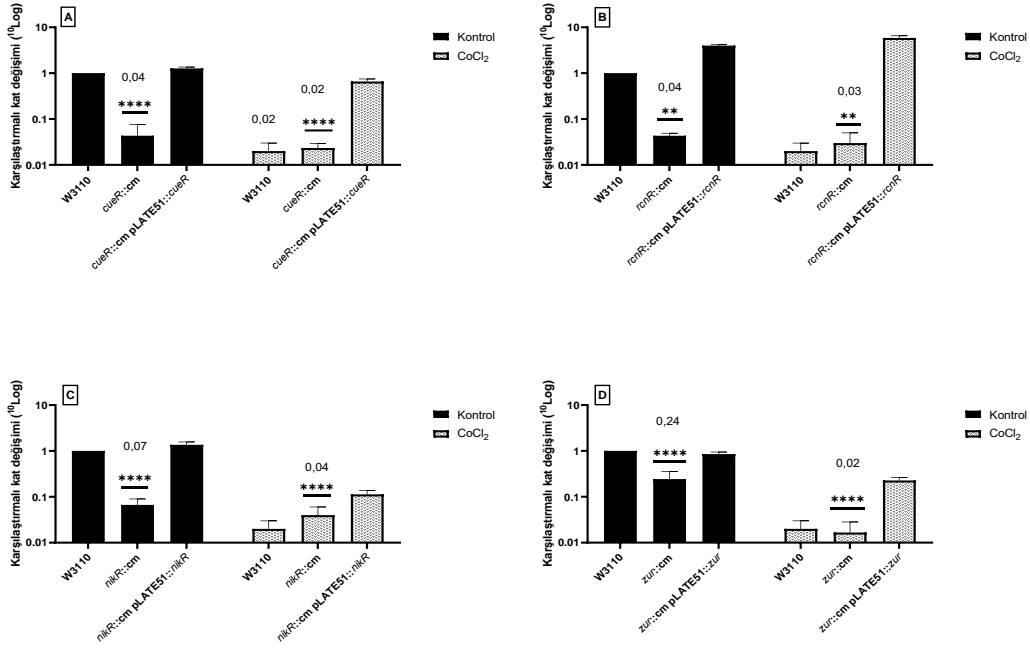
Şekil 4.25. Kobalt stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde porin genlerinin sentez seviyesi.

4.1.4.3.1. *ompA* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'da Co metali varlığında en fazla baskılanan gen *ompA* (0,02)'dir. Ortama Co metali ilave edildiğinde, yabancı tip *E. coli* W3110'da belirlenen yaklaşık 50 katlık azalma, *cueR* (0,02), *rcnR* (0,03) *nikR* (0,04) ve *zur* (0,02) mutant hücrelerinde belirlenmedi. Sonuçlar, Co varlığında önemli miktarda baskılanan *ompA* geninin kontrolünde, *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur* proteinlerinin rolünün olmadığı ve ifadesinin farklı bir düzenleyici tarafından baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.26).

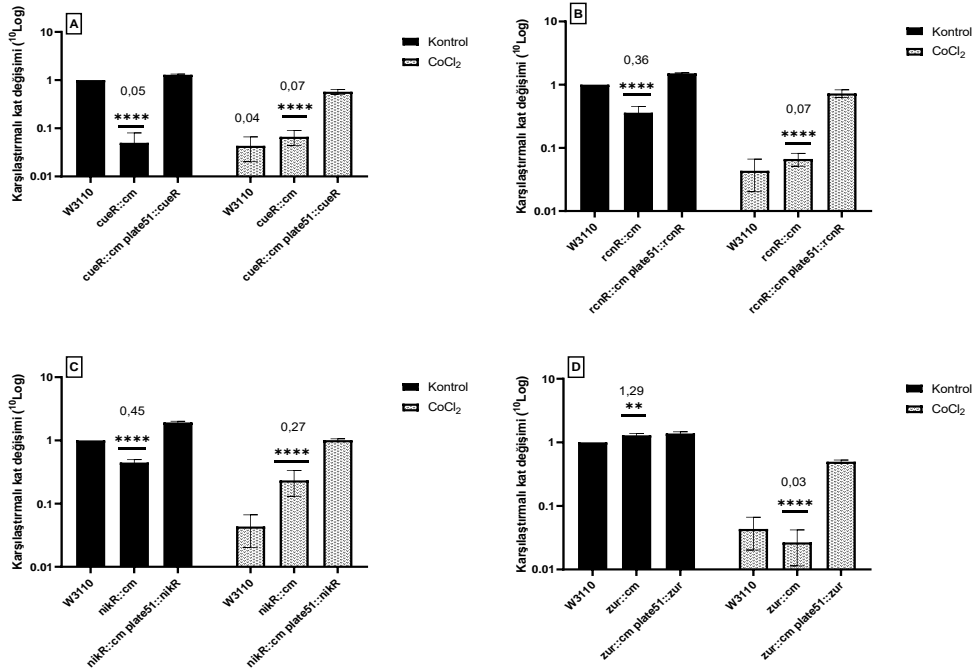
4.1.4.3.2. *ompC* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde kobalt stresi altında önemli derecede baskılanan bir diğer gen *ompC* (0,04) genidir. Kobalt varlığında *ompC* geninin ifadesindeki bu azalış, *cueR* (0,07), *rcnR* (0,07) ve *zur* (0,03) genlerinin yokluğunda görülmedi. Ancak *nikR* mutantında (0,27) ise *ompC*'nin ifadesinde önemli bir artış belirlendi. Bu durum, *CueR*, *RcnR* ve *Zur* proteinlerinin Co varlığında *ompC*'nin ifadesi üzerindeki rolünün metalden bağımsız olduğunu gösterirken, *NikR* proteininin ise doğrudan *ompC* ifadesinin baskılanmasından sorumlu olduğunu gösterdi (Şekil 4.27).



Şekil 4.26. Co iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompA* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

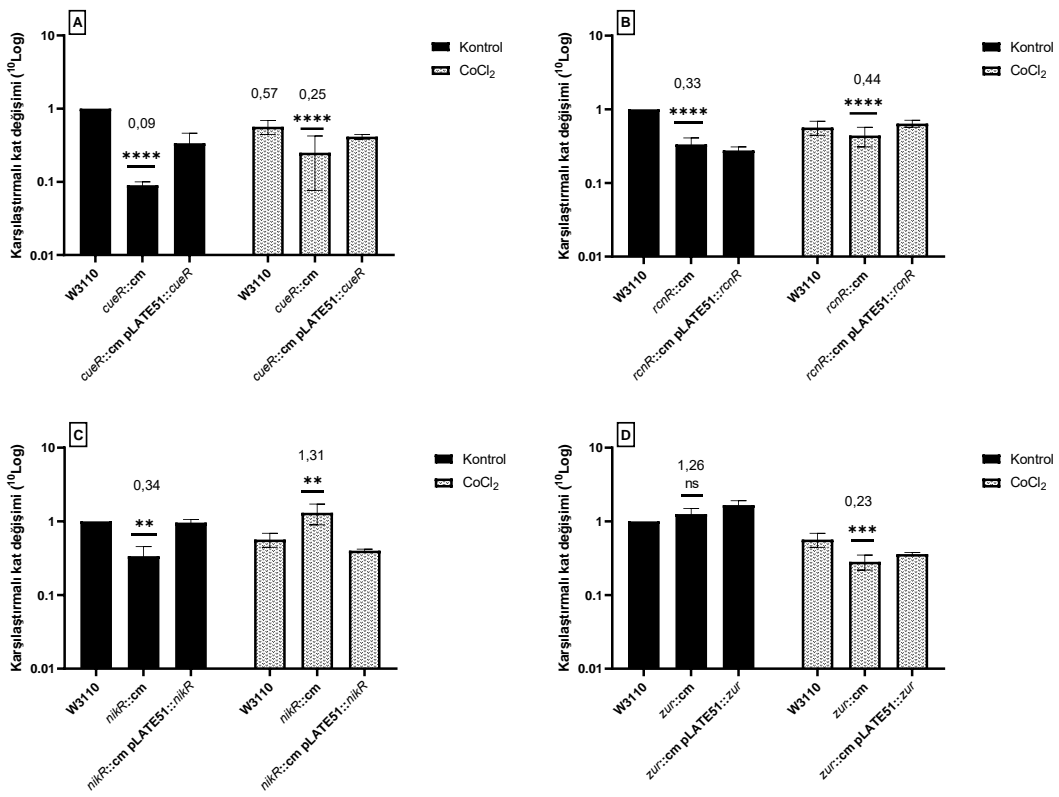


Şekil 4.27. Co iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompC* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.4.3.3. *ompF* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinde ortama Co ilave edilmesi sonucunda meydana gelen *ompF* (0,57) geninin sentezindeki azalma istatikselsel olarak anlamlı bulunmadı. Co iyonlarının etkisi ile yabani tip *E. coli* W3110'da belirlenen *ompF* geninin sentezindeki azalma *cueR* (0,25) ve *zur* (0,23) mutantlarında da belirlenirken, *rcnR* (0,44) mutantında belirlenmedi. Ancak bu durumun aksine, *nikR* (1,31) nakavt hücrelerinde *ompF* geninin ifadesinde artış gözlemlendi. Sonuçta, kobalt iyonlarının etkisi ile azalan *ompF* geninin ifadesinde sadece *NikR* proteininin rolü olduğu, diğer proteinlerin ise metalden bağımsız olarak rollerinin olduğu belirlendi (Şekil 4.28).



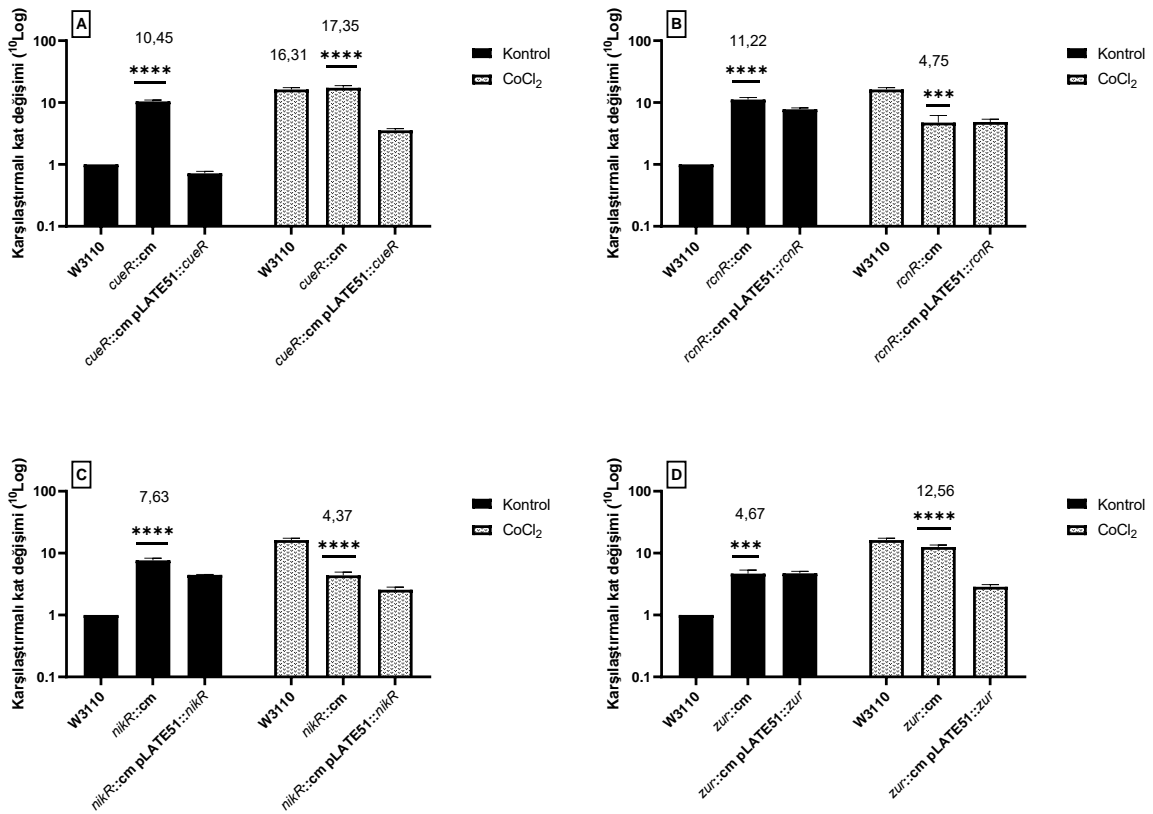
Şekil 4.28. Co iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompF* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.4.3.4. *ompG* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da Co metali ilavesi *ompG* (16,31) geninin sentezini önemli derecede arttırdı. Ancak Co varlığındaki bu artış, *cueR* (17,35) ve *zur* (12,56) nakavt

hücrelerinde görülmedi. Bu durum, CueR ve Zur proteinlerinin Co varlığında *ompG*'nin ifadesi üzerinde bir rolü olmadığını ve farklı bir düzenleyici tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Ancak *nikR* ve *rcnR* genlerinin olmadığı durumda, *ompG* sentezinin baskılanması, var olduğu durumlarda ise *ompG* sentezinin artması, bu genlerin *ompG* düzenlemesinde önemli olduğunu gösterir. Sonuç olarak, Co varlığında *ompG* gen ifadesinin artışından sorumlu proteinlerin NikR ve RcnR olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.29).



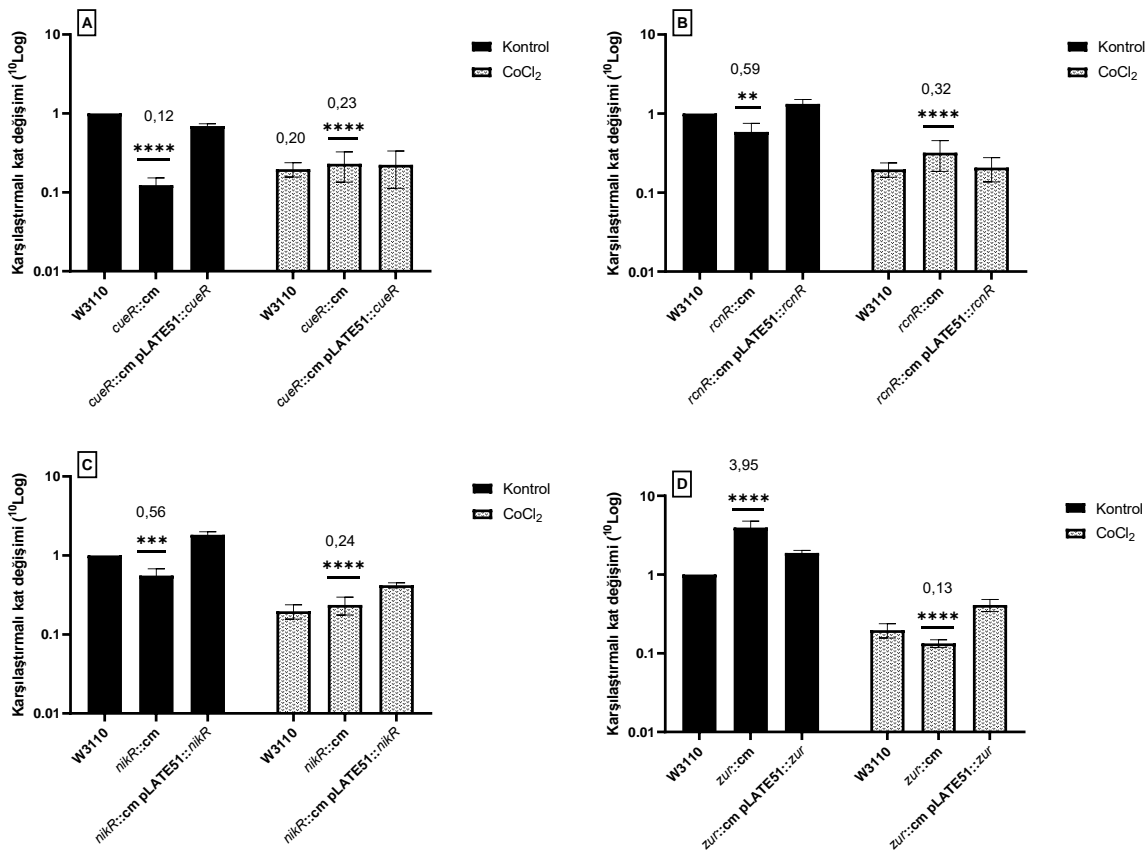
Şekil 4.29. Co iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompG* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

4.1.4.3.5. *ompT* geninin sentezinde CueR, RcnR, NikR ve Zur'un rolü

Co ilave edilmemiş yabancı tip *E. coli* W3110 hücresine (1,0) göre, ortama Co ilave edilmesi *ompT* (0,2) geninin ifadesini azaltmaktadır. Kobalt iyonlarının ortama eklenmesi ile *cueR* (0,23), *rcnR* (0,32), *nikR* (0,24) ve *zur* (0,13) nakavt edilmiş hücrelerde *ompT* geninin ifadesi, yabancı tip *E. coli* W3110 ile benzerdir (Şekil 4.30). Sonuç olarak, Co iyonlarının

etkisi ile önemli derecede azalan *ompT* geninin ifadesinin düzenlenmesinde CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin dışında farklı bir düzenleyicinin olduğu tespit edilmiştir.

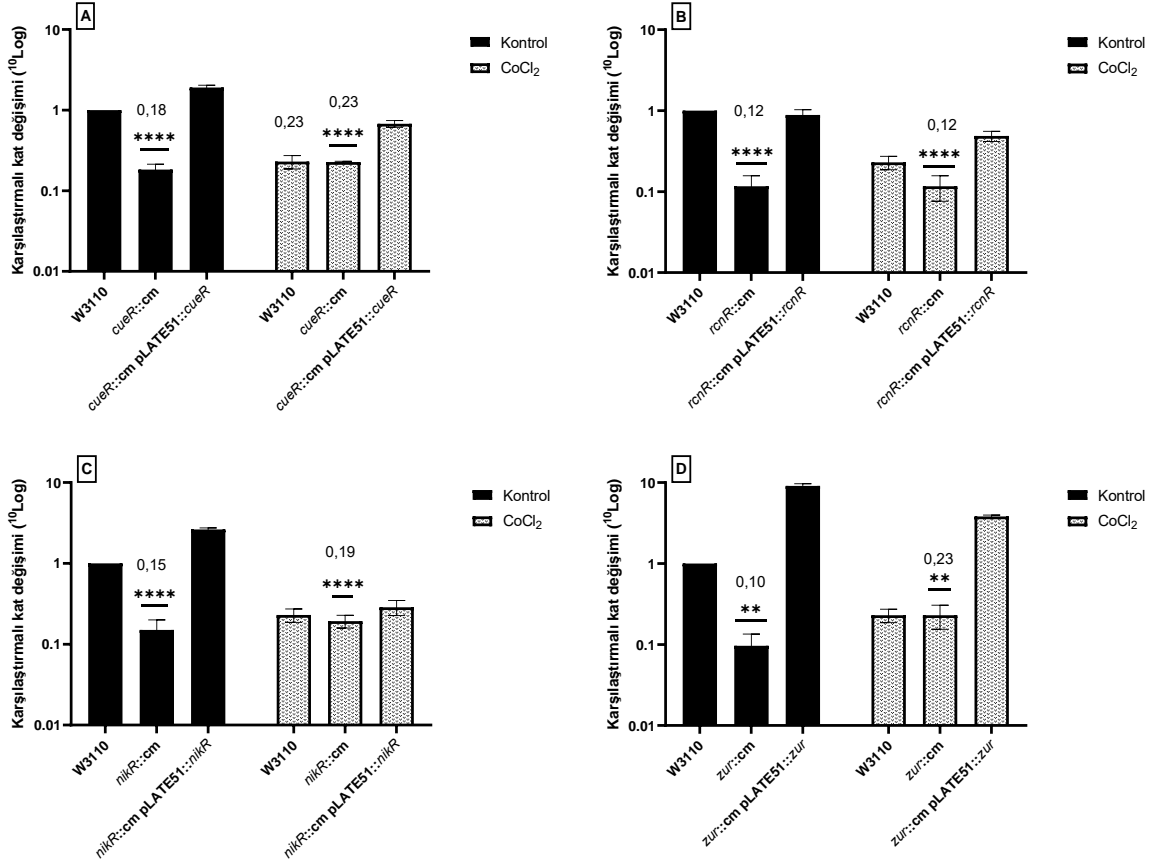


Şekil 4.30. Co iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompT* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.4.3.6. *lamB* geninin sentezinde CueR, RcnR, NikR ve Zur'un rolü

Metalsiz ortamda yabani tip *E. coli* W3110'da *lamB* geni sentezinin kobalt metalinin ilavesi ile **1,0'dan 0,23'e** azaldığı belirlendi. Ancak yabani tip *E. coli* W3110'da belirlenen **~5 kat azalma**, *cueR* (**0,23**), *rcnR* (**0,12**), *nikR* (**0,19**) ve *zur* (**0,23**) nakavt edilmiş hücrelerde görülmedi. Bu durum kobalt iyonları varlığında *lamB* geninin baskılanmasında, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin değil farklı bir düzenleyicinin rol oynadığını gösterir (Şekil 4.31).

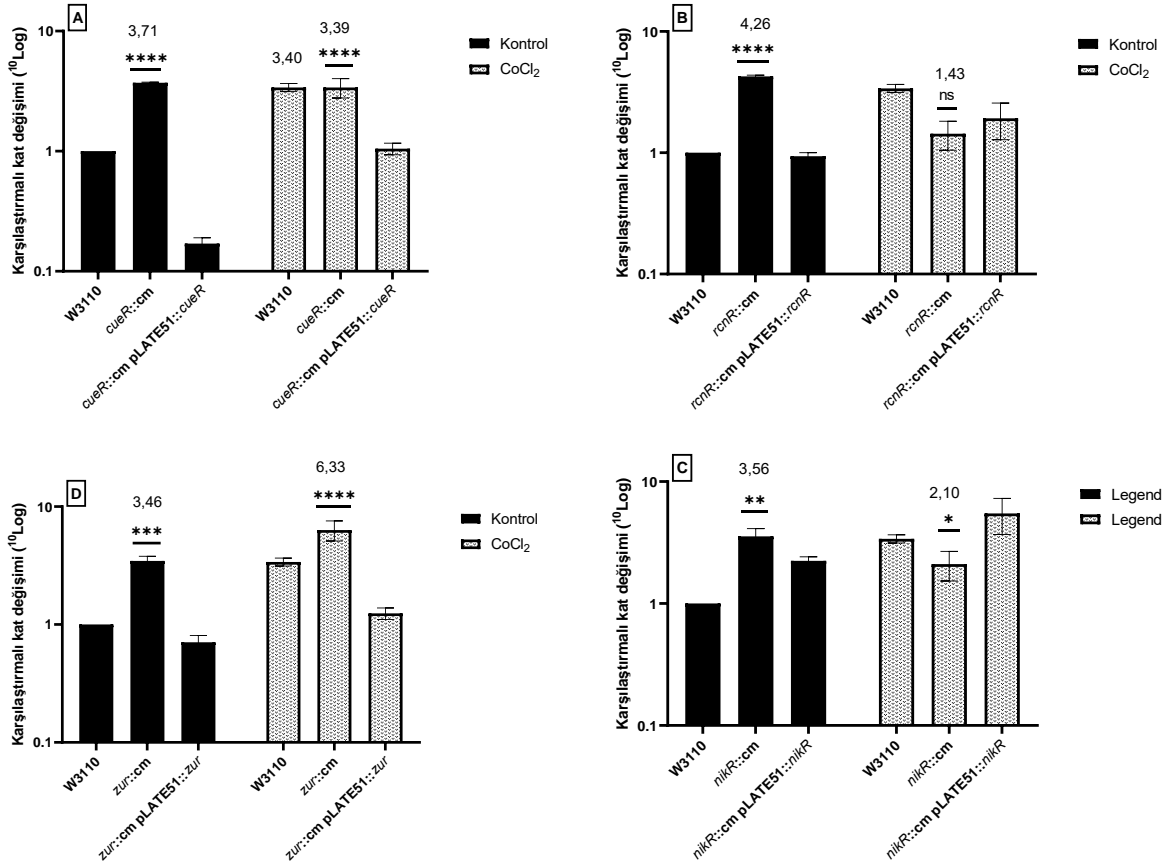


Şekil 4.31. Co iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *lamB* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

4.1.4.3.7. *phoE* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'da kobalt metalinin etkisi ile artan bir diğer gen ise *phoE* (1,0 'dan 3,40'a) olarak belirlendi. Yabancı tip *E. coli* W3110 ile karşılaştırıldığında, kobalt varlığında *phoE* geninin sentezi *zur* (3,40'dan 6,33'e) mutantında da benzer profil sergilerken, *cueR* (3,39) mutantında herhangi bir değişim görülmedi. Diğer mutant hücrelere bakıldığında ise, *rcnR* (3,40'dan 1,43'e) ve *nikR* (3,40'dan 2,10'a) mutantlarında bir azalma belirlendi. Şekil 4.32'den anlaşılacağı gibi, Co varlığında *phoE* geninin ifadesinin artışından *RcnR* ve *NikR* proteinlerinin rolü olduğu tespit edilmiştir.



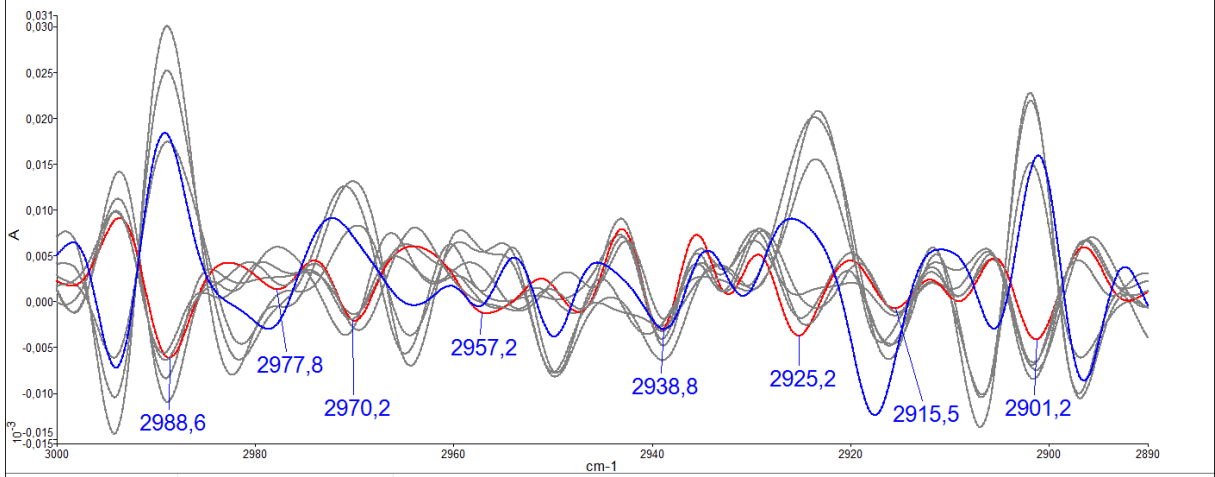
Şekil 4.32. Co iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *phoE* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.4.4. Co metalinin porin mutantlarında (*ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE*) meydana getirdiği biyomoleküler değişiklikler

Membran lipidleri (3100-2800 cm⁻¹); Yabancı tip *E. coli* W3110'da hem metalin hem de porinlerin mutant olmasının etkisi ile bu alanda belirlenen spektral bantlarda ciddi farklılıkların olduğu tespit edildi. Kobalt metalinin meydana getirdiği bantsal farklılıkların yanı sıra, aynı yapının farklı konformasyonuna işaret eden kaymaların da olduğu gözlemlendi. Bu alanda birçok spektral bantta değişim olmasına rağmen genel olarak 8 spektral bant değerlendirildi. Yabancı tip *E. coli* W3110'da Co metalinin etkisi incelendiğinde, belirlenen bu spektral bantlardan sadece 2939 cm⁻¹'de (C-H germe bantları) belirlenen lipit miktarının değişmediği, 2977 (N-H esneme, C-H esneme) ve 2916 cm⁻¹'de (CH₂ ve CH₃ fosfolipitler) belirlenen moleküllerde azalma, 2970 (CH₃, lipitler, yağ asitleri), 2957 (CH₃ asimetrik germe)

ve 2925 cm^{-1} (CH_2 lipitler) spektral bantları temsil eden moleküllerde ise artış belirlendi. Genel anlamda, kobalt iyonları varlığında, bazı mutantlar (*lamB*, *ompT* ve *phoE*) metale maruz kalmamış yabani tip *E. coli* W3110'a benzer bir bant profili sergilerken, bazıları da Co metaline maruz kalmış yabani tip *E. coli* W3110'a benzer profil sergiledi. (Şekil 4.33).

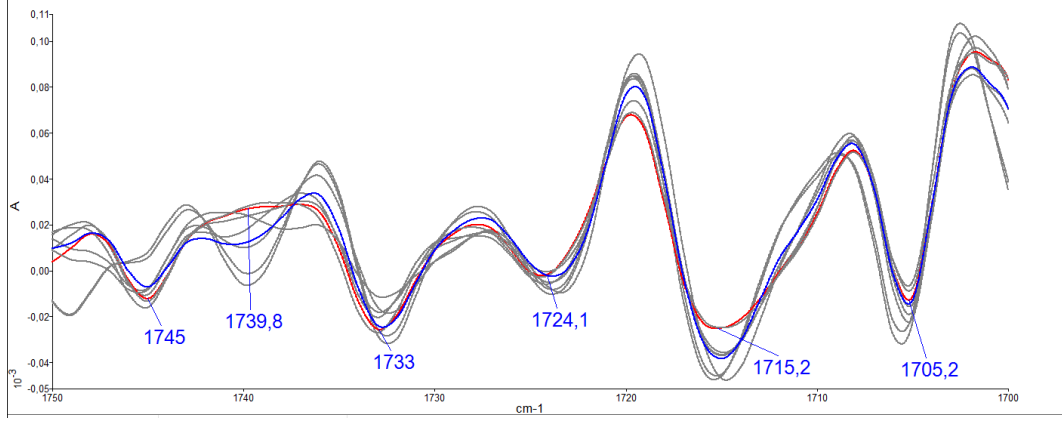


Şekil 4.33. 3100-2800 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Co yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Co varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Co iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

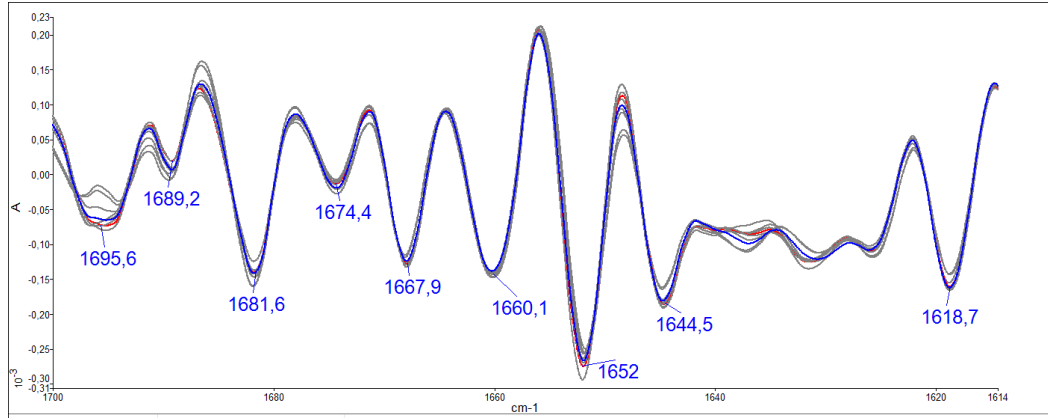
Bakteriyel yağ asitleri (1800-1700 cm^{-1}); Bu bölgede belirlenen 1743 (triacilgliseroller (TG'ler)), 1733 (lipit esterlerinin), 1724 (polyester depolayan bileşikler) ve 1705 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ timin) spektral bantlarını gösteren moleküllerde yabani tip *E. coli* W3110'da kobalt iyonlarının etkisi olmadığı görüldü. Ancak kobalt iyonlarının etkisi ile yabani tip *E. coli* W3110'da 1740 ve 1715 cm^{-1} spektral bantlarını simgeleyen fosfolipit miktarlarında azalma belirlendi. Ancak, kobalt metali varlığında porin mutantlarında fosfolipit miktarı tekrardan arttığı gözlemlendi (Şekil 4.34).

Bakteriyel proteinler Amid I Bölgesi (1700-1600 cm^{-1}); Bu bölgede Co iyonlarının etkisi ile belirlenen spektral bantlarda suşlar arasında küçük farklılıklar belirlense de diğer bölgelere göre daha fazla korunmuş profil göstermektedir. Genel anlamda proteinlerin amid I bağlarını temsil eden bu bölgede, 1696 ile 1668 (Proteinlerin amid I β -tabakaları), 1682 (Adenin), 1674 (karbonil grupları), 1645, 1660 ile 1652 (amid I bandı), ve 1619 cm^{-1} (Fenil halkasının C-C gerilmesi) bantları olmak üzere 9 adet spektral bant belirlendi (Şekil 4.35).



Şekil 4.34. 1800-1700 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Co iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Co iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Co iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

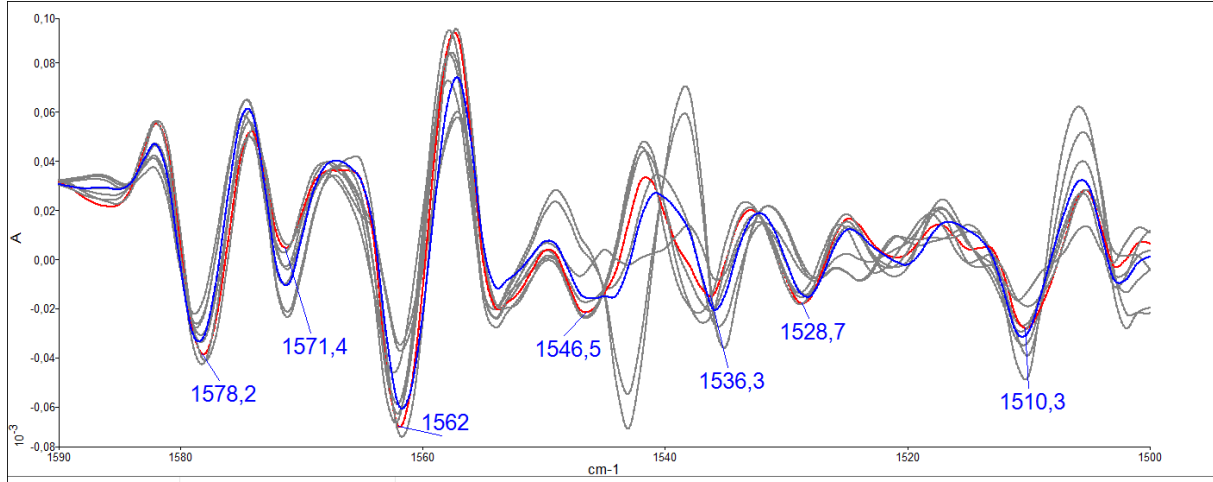


Şekil 4.35. 1700-1600 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Co iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Co iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Co iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları.

Bakteriyel proteinler Amid II Bölgesi (1600-1400 cm^{-1}); 3100-2800 cm^{-1} spektral bölgede olduğu gibi, bu alanda da Co etkisi ile karmaşık bir spektral bant profili belirlendi. Bu durum, kobalt iyonlarının, proteinlerin amid II bağları üzerinde etkili olduğunu gösterdi. Co metale maruz kalmamış yabancı tip *E. coli* W3110 hücreleri ile Co metale maruz kalan yabancı tip *E. coli* W3110 hücreleri karşılaştırıldığında, 1578 (Fenil halkasının C-C gerilmesi), 1562(aromatik halkalardan uzanan C-C), 1529 (C=N adenin, sitozin) ve 1547 cm^{-1} (α -sarmal yapı, protein NH bükülmesi, CN gerilmesi) spektral bantlarını temsil eden moleküllerde artış olurken, 1571 (C=N adenin), 1536 (sitozin), ve 1510 cm^{-1} (Fenil halkalarından C-H bükülme titreşimi) spektral bantlarını gösteren moleküllerde ise azalış belirlendi. Bu bant profilleri

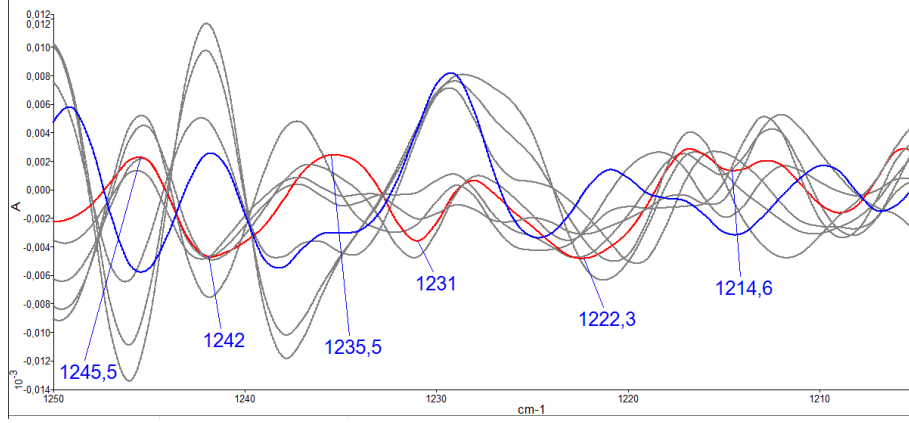
kobalt iyonları varlığında, yabani tip *E. coli* W3110 hücreleri ile karşılaştırılan porin mutantlarında 1578, 1562, 1546 ve 1528 cm^{-1} bantlarını simgeleyen moleküllerde azalış; 1571, 1536 ve 1510 bantlarını gösteren moleküllerde ise artış görüldü (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. 1600-1400 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Co iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Co iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Co iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

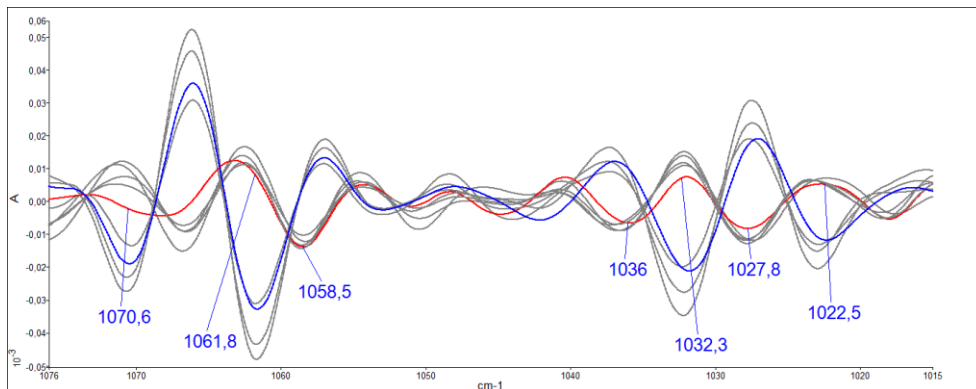
Nükleik asit bölgesi (1250-1200 cm^{-1}); Kobalt iyonlarının yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarında meydana getirdiği nükleik asit bölgesindeki spektral bantların oldukça değişken olduğu tespit edildi. Şekil 4.37’de görüldüğü gibi, yabani tip *E. coli* W3110’da 1245’ten 1242 cm^{-1} ’ye, 1238’den 1231 cm^{-1} ’e ve 1224’lerden ise 1222 cm^{-1} spektral bandına kaydığı belirlendi. Bu durum, bu bantları temsil eden moleküllerin yapısal olarak da değiştiğini göstermektedir. Kobalt iyonlarının yabani tip *E. coli* W3110 üzerindeki etkisi ile, sadece 1222-24 cm^{-1} ’deki (hüresel nükleik asitlerin fosfodiester gruplarındaki fosfat germe) spektral bandı gösteren moleküllerde artma, 1245-42 (gerilen PO^{2-} simetrik titreşim), 1238-31 (PO^{2-} anti simetrik esneyen) ve 1212-14 cm^{-1} ’deki (DNA’nın Z formu) bantlarını gösteren moleküllerde ise azalma olduğu belirlendi. Bu bölgede değişen spektrumlardaki moleküllerin değişimine bakıldığında, kobalt metaline maruz kalmış bazı porin mutantlarının kobalta maruz kalan yabani tip *E. coli* W3110’a göre; bazı porin mutantlarının ise metale maruz kalmayan yabani tip *E. coli* W3110’a göre arttığı tespit edildi.



Şekil 4.37. 1250-1200 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Co varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Co iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Co iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Co iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel Polisakkaritler (1100-1000 cm^{-1}); Yabani tip *E. coli* W3110 ve onun porin mutantları Co iyonları varlığında karşılaştırıldığında hem miktar olarak hem de yapısal olarak karmaşık bir polisakkarit içeriğine sahip olduğu Şekil 4.38’da gösterildi. Genel olarak bakıldığında, kobalt iyonlarına maruz kalan mutantların bir kısmı metale maruz kalmamış yabani tip *E. coli* W3110’a benzer molekül profili sergilerken, bazı porin mutantları metale maruz kalmayan yabani tip *E. coli* W3110’a benzer molekül profili sergilediği tespit edildi. Co metale maruz kalmayan yabani tip *E. coli* W3110’a göre, metale maruz kalan yabani tip *E. coli* W3110’da 1071-68 (Mannoz ve mannoz-6-fosfat), 1062-58 (C-O germe), 1032-36 (kolajen), 1023-27 cm^{-1} (Glikojen) spektral bantları gösteren moleküllerde azalış gözlemlendi (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Co iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Co iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Co iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Co iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

4.1.5. Bakır (Cu) Stresi

4.1.5.1. Cu metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri

Tablo 4.3’de gösterildiği gibi, yabani tip *E. coli* W3110 (MİK:936,38 ve MSK:1248,50 µg/ml) ile karşılaştırıldığında hem MİK hem de MSK değerlerinde *ompC* mutantları bakır metaline karşı hassasiyet (sırasıyla 624,25 ve 936,38 µg/ml) kazanırken *ompF* mutantının dayanıklı (1248,50 ve 1872,75 µg/ml) olduğu belirlendi. Bununla birlikte yabani tipe göre, *lamB* mutant hücrelerin MİK değeri (1248,50 µg/ml) ve *phoE* mutant hücrelerin ise MSK değeri (1872,75 µg/ml) daha yüksek belirlendi.

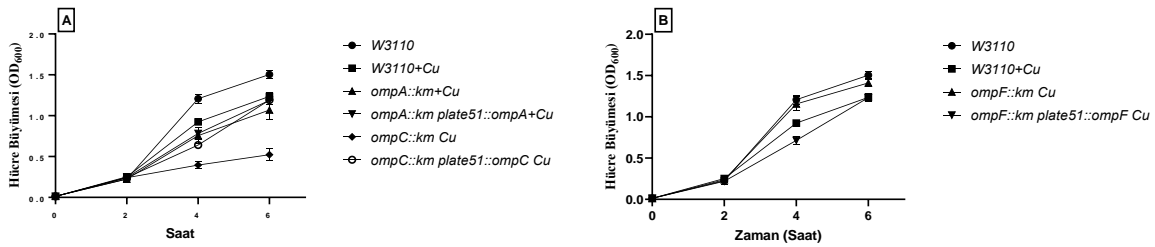
Tablo 4.3. *E. coli* W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine bakır metalinin MİK ve MSK değerleri

Suşlar	MİK (µg/ml)	MSK(µg/ml)
W3110	936,38	1248,50
<i>ompA::km</i>	936,38	1248,50
<i>ompA::km</i> pLATE51:: <i>ompA</i>	936,38	1248,50
<i>ompC::km</i>	624,25	936,38
<i>ompC::km</i> pLATE51:: <i>ompC</i>	936,38	1248,50
<i>ompF::km</i>	1248,50	1872,75
<i>ompF::km</i> pLATE51:: <i>ompF</i>	936,38	1248,50
<i>ompG::km</i>	936,38	1248,50
<i>ompG::km</i> pLATE51:: <i>ompG</i>	936,38	1248,50
<i>ompT::km</i>	936,38	1248,50
<i>ompT::km</i> pLATE51:: <i>ompT</i>	936,38	1248,50
<i>lamB::km</i>	1248,50	1248,50
<i>lamB::km</i> pLATE51:: <i>lamB</i>	936,38	1248,50
<i>phoE::km</i>	936,38	1872,75
<i>phoE::km</i> pLATE51:: <i>phoE</i>	936,38	1248,50

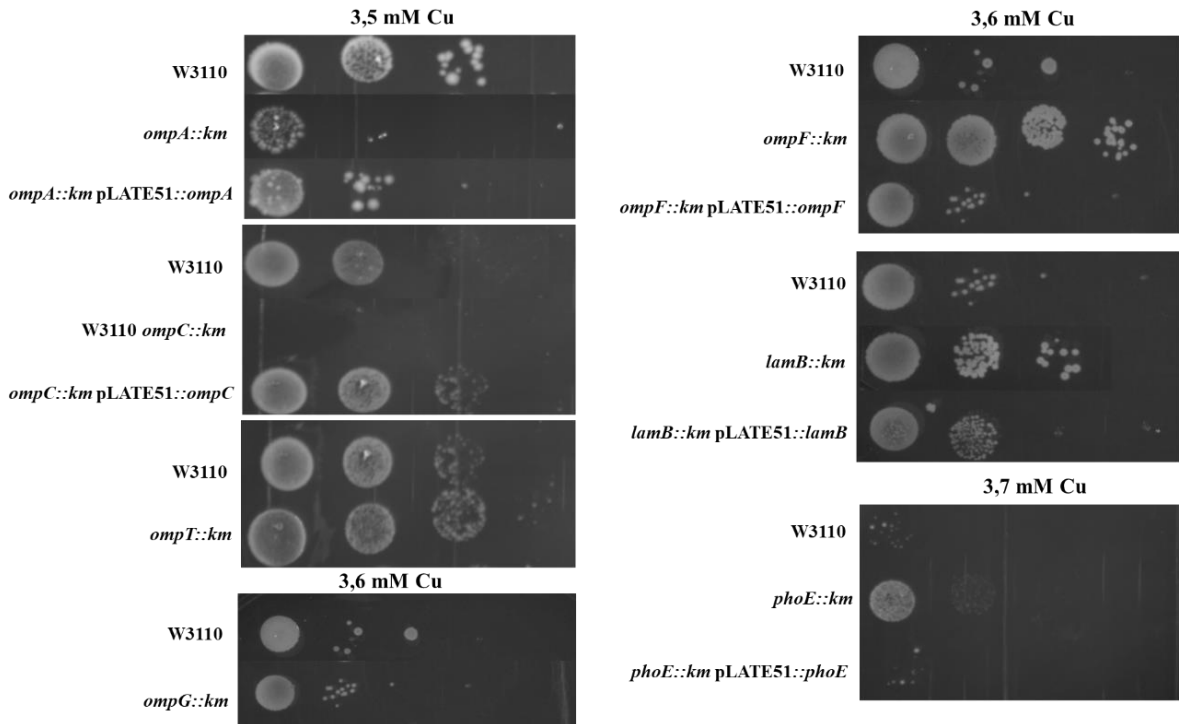
4.1.5.2. Cu metalinin büyüme üzerine etkisi

Porin mutantlarının bakır metali varlığında yapılan büyüme deneyleri sonucunda, yabancı tip *E. coli* W3110'a göre *ompA* ve *ompC* mutantları metale karşı daha duyarlı hale gelirken, *ompF* mutantının metale karşı daha dayanıklı hale geldiği belirlendi (Şekil 4.39).

Metal varlığında petri damlatma deneyleri incelendiğinde, hücrelerin, *ompA* ve *ompC* genlerinin yokluğunda duyarlılık, *ompF* geninin yokluğunda ise dirençlilik kazandığı net bir şekilde belirlendi. Büyüme deneylerinde etkisiz gibi görünmesine rağmen petri damlatma deneylerinde *lamB* ve *phoE* genlerinin yokluğunun da hücreye direnç kazandırdığı görüldü (Şekil 4.40).



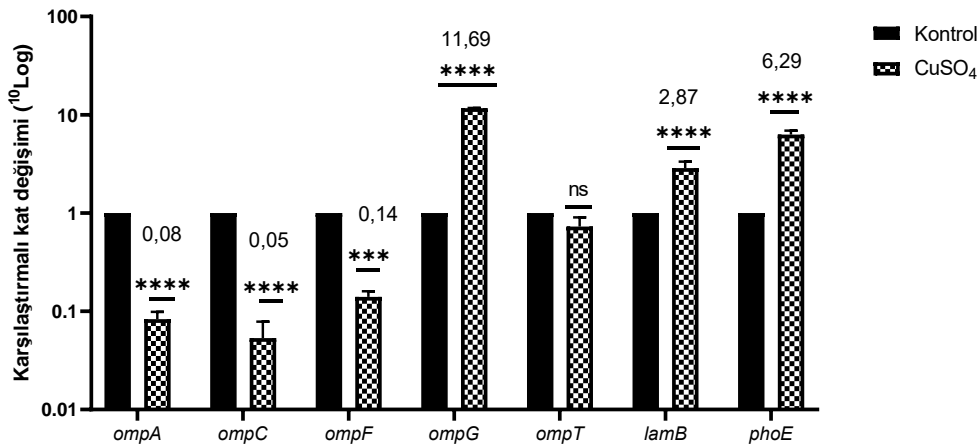
Şekil 4.39. Yabancı tip *E. coli* W3110, *ompA*, *ompC* ve *ompF* mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cu metal varlığında büyüme grafiği



Şekil 4.40. Yabancı tip *E. coli* W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Cu metal varlığında petride yaşam deneyi

4.1.5.3. Cu metali varlığında porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi

Şekil 4.41’de metale maruz kalmayan yabancı tip *E. coli* W3110 (1,0) ile bakır meteline maruz kalan *E. coli* W3110’da porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi gösterildi. Metalsiz ve bakır ilave edilmiş hücrelerin karşılaştırılması sonucunda, *ompT* (0,73) geninin sentezindeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı; *ompA* (0,08), *ompC* (0,05) ve *ompF* (0,14) genlerinin sentezinin azaldığı ve *ompG* (11,69), *lamB* (2,87) ve *phoE* (6,29) genlerinin sentezinin ise artış gösterdiği belirlendi. Bu durumda *ompT* geni hariç diğer porin genlerinin bakır homeostazında önemli görevleri olduğunu söyleyebiliriz.



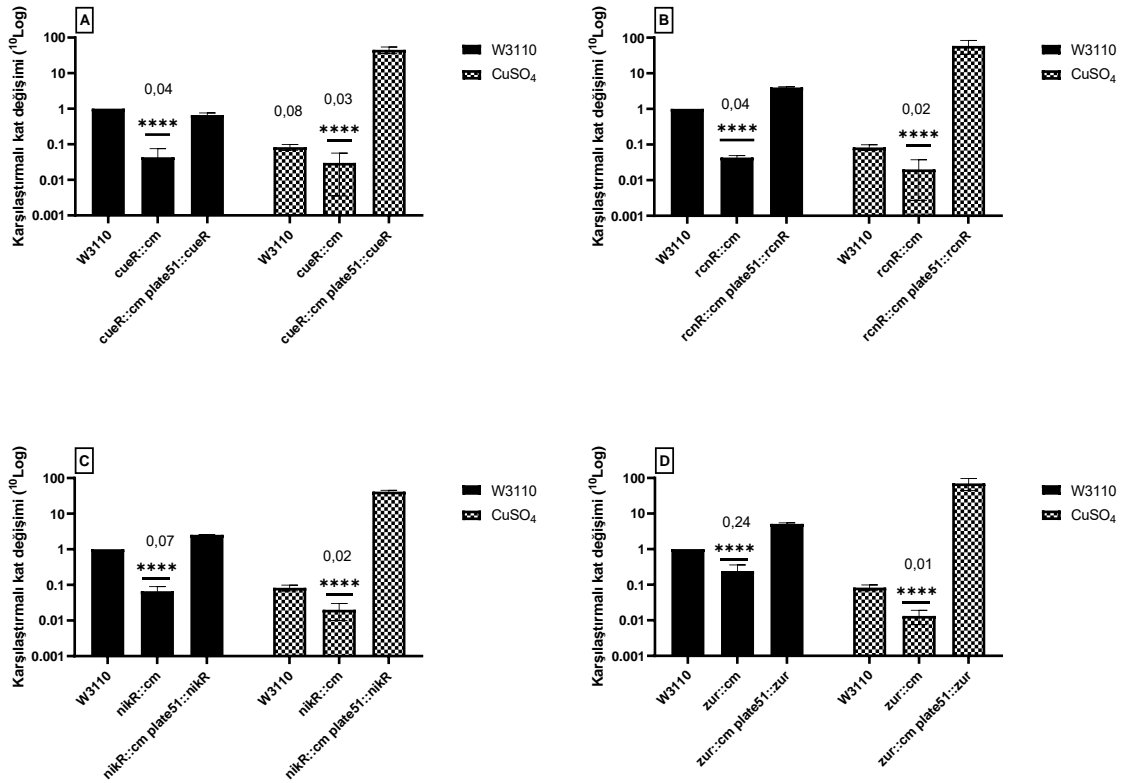
Şekil 4.41. Bakır stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde porin genlerinin sentez seviyesi

4.1.5.3.1. *ompA* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

ompA (0,08) geninin sentezi bakır metali varlığında yabancı tip *E. coli* W3110’da önemli miktarda azaldı. Ancak Cu iyonları varlığında, *ompA*’nın ifadesi *cueR* (0,03 kat), *rcnR* (0,02), *nikR* (0,02) ve *zur* (0,01) genleri nakavt olan hücrelerde yabancı tip *E. coli* W3110’daki gibi anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.42). Bu sonuçlara göre, Cu varlığında *ompA* geninin ifadesinde meydana gelen azalmada *CueR*, *Rcnr*, *NikR* ve *Zur* proteinlerinin rolü olmadığı belirlendi.

Bakır metali varlığında ekstra olarak, *CpxAR* ve *CusSR* iki bileşenli sistem genlerinin porin genleri üzerine etkisine de bakıldı. Çünkü bu genler, bakır hemostazında görevli en temel sinyal iletim sistemlerinden biridir. Çalışmada bakır metalinin etkisine bakılmadan önce, ilk olarak metalsiz ortamdaki yabancı tip *E. coli* W3110 ile *cpxA*, *cpxR*, *cusS* ve *cusR* mutant olduğu durumlarda *ompA*’nın sentez miktarları karşılaştırıldı. Bakır yokluğunda *cpxR*

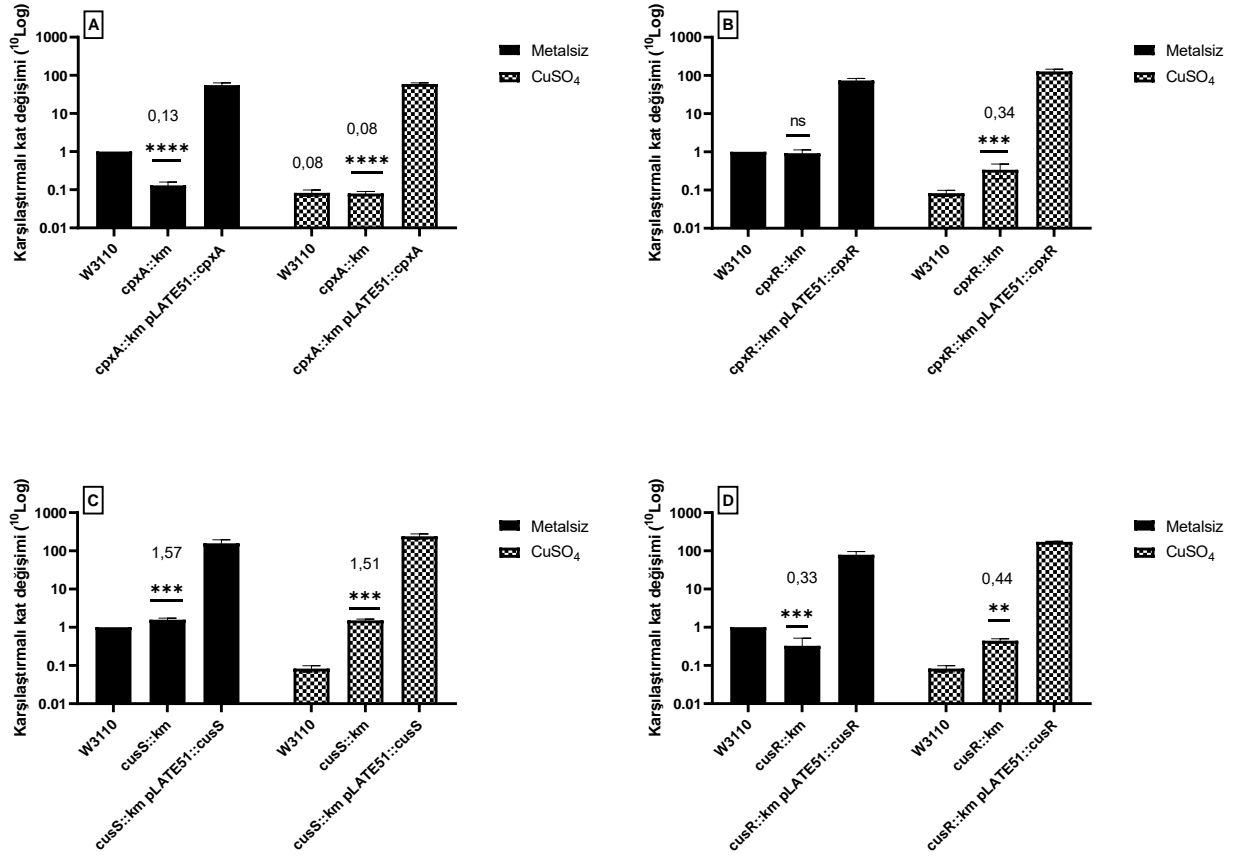
(0,92) geninin olmaması, yabancı tip *E. coli* W3110'daki *ompA*'nın sentez miktarına (1,0) yakın olduğu, *cpxA* (0,13) ve *cusR* (0,33) genlerinin yokluğu *ompA* sentezinin azalmasına ve *cusS* (1,57) geninin yokluğunun ise *ompA* sentezinin artmasına sebep olduğu belirlendi (Şekil 4.43).



Şekil 4.42. Cu varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompA* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

Ortamda bakır ilave edilmesi sonucunda yabancı tip *E. coli* W3110'da ifade edilen *ompA* geninin miktarı 1,0'dan 0,08'e düştüğü belirlendi. İki bileşenli sistemin genlerinin mutant olduğu durumda Cu iyonlarının etkisi ile *ompA* geninin sentez seviyesindeki değişime bakıldığında, *cpxA* (0,08) nakavt edilen hücrede yabancı tip *E. coli* W3110'dan farklı olmadığı, *cpxR* (0,34), *cusS* (1,51) ve *cusR* (0,44) nakavt suşlarında *ompA* sentezinin artmakta olduğu görüldü. Sonuç olarak, Cu varlığında *ompA*'nın baskılanmasında CpxR, CusS ve CusR proteinlerinin önemli rolü olduğu tespit edildi (Şekil 4.43).

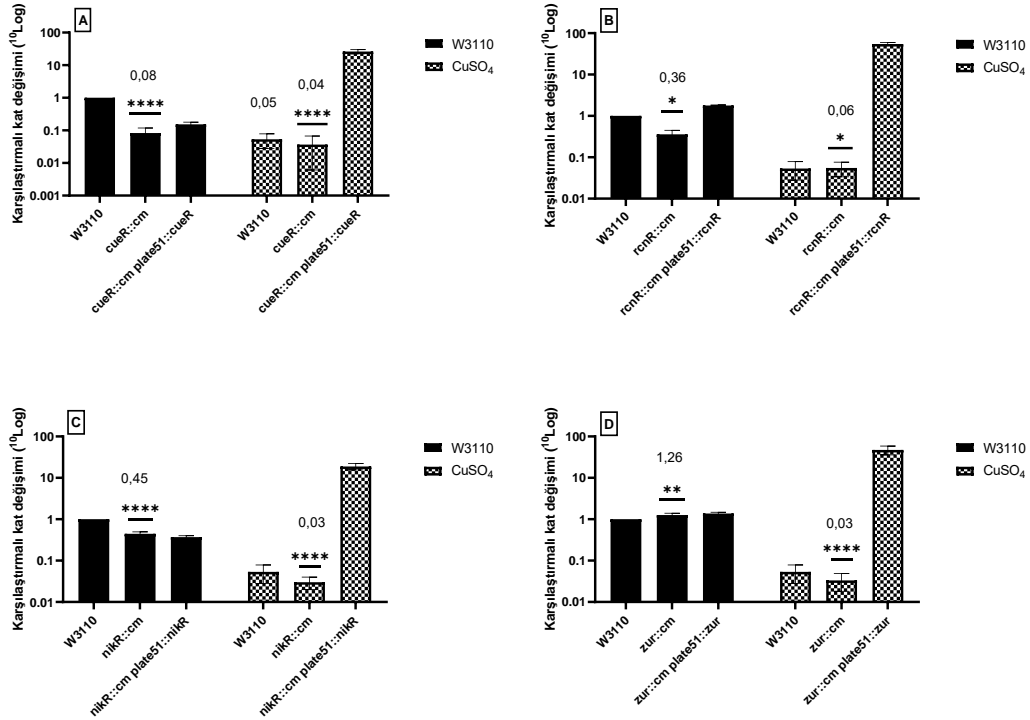


Şekil 4.43. Cu varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxAR* ve *cusSR* mutantlarında *ompA* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km pLATE51::cpxA* B: *cpxR::km* ve onun komplement hücresi *cpxR::km pLATE51::cpxR* C: *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km pLATE51::cusS* D: *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km pLATE51::cusR*)

4.1.5.3.2. *ompC* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'da bakır metalinde en fazla baskılanan gen *ompC* (0,05) olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan *cueR* (0,04), *rcnR* (0,06), *nikR* (0,03) ve *zur* (0,03) mutantlarında *ompC* geninin sentezinin bakır iyonlarının etkisi ile değişim göstermediğinin belirlenmesi, bu porinin *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur* proteinlerinden başka bir düzenleyici tarafından baskılandığını göstermektedir.

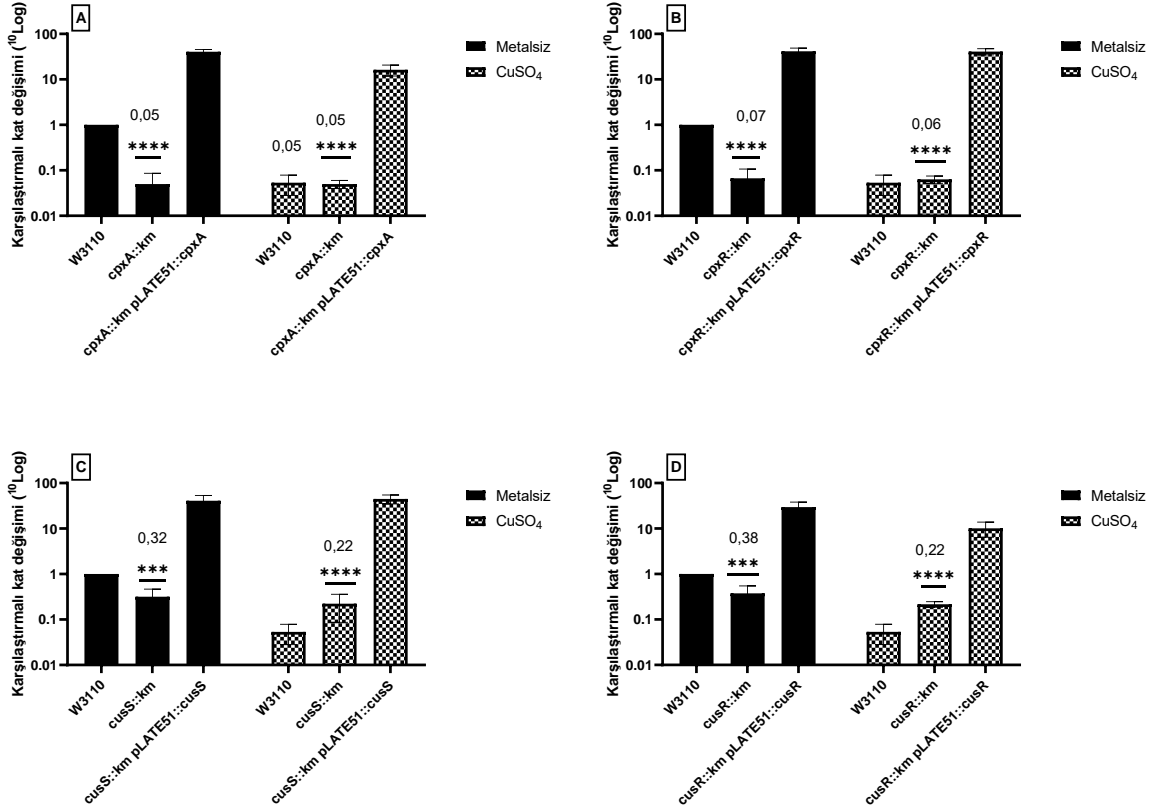


Şekil 4.44. Cu varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompC* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

Metal içermeyen ortamda büyütülen yabancı tip *E. coli* W3110'a (1,0) göre, iki bileşenli sistemlerin genleri mutant olan, *cpxA* (0,05), *cpxR* (0,07), *cusS* (0,32) ve *cusR* (0,38) hücrelerinde *ompC*'nin ifadesi oldukça azalmaktadır (Şekil 4.45). Bu durum, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin *ompC*'nin ifadesinin kontrolünde önemli olduğunu gösterir.

Bakır iyonlarının ilavesi ile yabancı tip *E. coli* W3110'da belirlenen *ompC* sentezindeki 20 katlık (0,05) azalış, *cpxA* (0,05) ve *cpxR* (0,06) genleri nakavt edilmiş hücrelerde görülmedi. Ancak *cusS* (0,22) ve *cusR* (0,22) mutantlarında azalmanın aksine ~4 katlık bir artış tespit edildi. Böylece, CusS ve CusR proteinlerinin Cu varlığında *ompC* geninin baskılanmasında rol oynadığı belirlendi (Şekil 4.45)

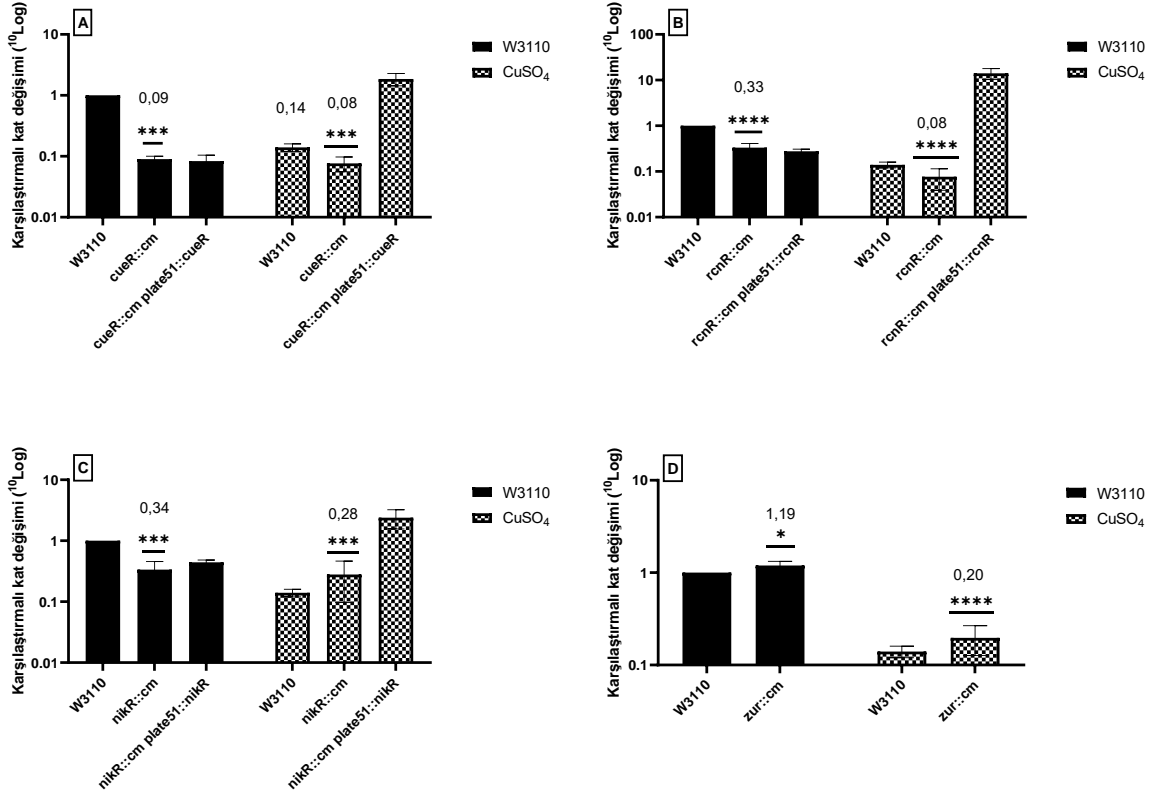


Şekil 4.45. Cu varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxAR* ve *cusSR* mutantlarında *ompC* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km pLATE51::cpxA* B: *cpxR::km* ve onun komplement hücresi *cpxR::km pLATE51::cpxR* C: *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km pLATE51::cusS* D: *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km pLATE51::cusR*)

4.1.5.3.3. *ompF* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

Bakır stresi altında *ompF* geninin sentezi, yabancı tip *E. coli* W3110'da **1,0'dan 0,14'e** kadar baskılandığı belirlendi. Bu çalışmada Zur proteininin nakavt olduğu hücrelerde, bakır varlığı (**0,20**) ve yokluğunda (**1,19**) *ompF* geninin ifadesinin yabancı tip *E. coli* W3110 ile benzer olduğu için sentez üzerinde herhangi bir rolü olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, bakır ilavesi sonucunda yabancı tip *E. coli* W3110'daki *ompF* sentezi, *cueR* (**0,08**) ve *rcnR* (**0,08**) mutantlarında değişmez iken *nikR* (**0,28**) mutantında yaklaşık **2 kat** bir artış olduğu tespit edildi. Bu durumda, *CueR* ve *RcnR* proteinlerinin Cu varlığında *ompF*'nin ifadesi üzerinde rolü bulunmaz iken, *NikR* proteininin kısmen de olsa baskılanmasında rolü olduğu görülmektedir (Şekil 4.46).

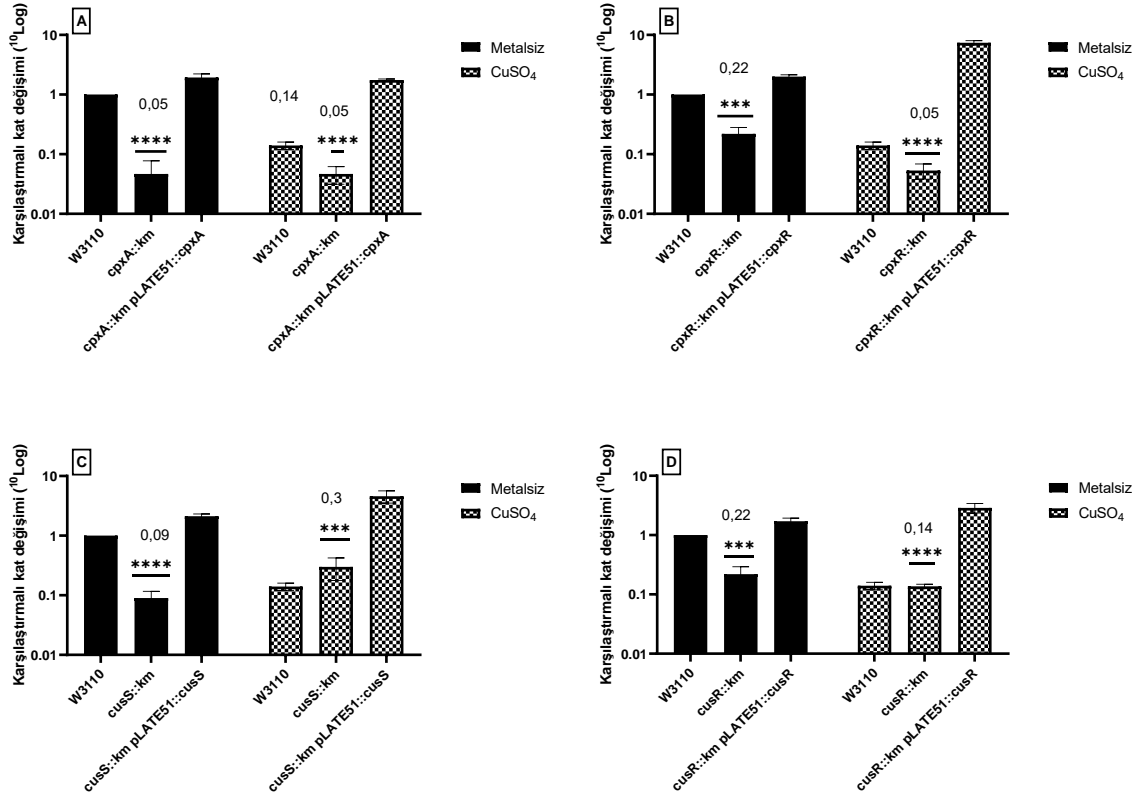


Şekil 4.46. Cu varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompF* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

Yabancı tip *E. coli* W3110'a (1,0) göre, metallsiz ortamda *ompF* geninin sentezi, *cpxA* (0,05), *cpXR* (0,22), *cusS* (0,09) ve *cusR* (0,22) mutant hücrelerinde önemli oranda baskılanmaktadır. Bu durumda, Cu yokluğunda hücredeki *ompF* geninin sentezinin artmasında CpxAR ve CusSR sisteminin genlerinin sorumlu olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda ortama Cu ilave edilmesi, yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompF* geninin sentezini ~ 7 kat (0,14) azaltırken, *cusR* (0,14) mutantında değişmediği, *cpxA* (0,05) ve *cpXR* (0,05) mutantlarında ~ 3 kat azaldığı ve *cusS* (0,3) mutantında ise ~2,5 kat arttığı belirlendi. Bakır iyonlarının etkisi ile, *cpxA* ve *cpXR* mutantının yabancı tip *E. coli* W3110'a benzer profil sergilemesi, *ompF* geni sentezi üzerindeki bu proteinlerin rolünün metalden bağımsız olduğunu gösterdi. Yabancı tip *E. coli* W3110'da bakır iyonlarının etkisi ile baskılanan *ompF* ifadesinin, CusS proteini tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (Şekil 4.47).

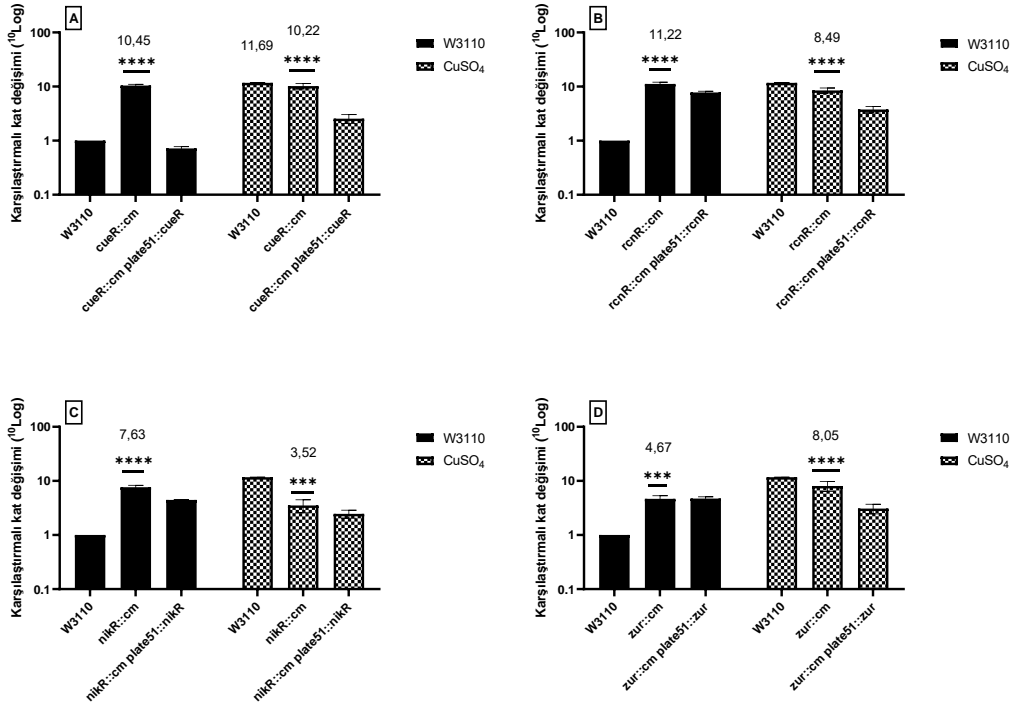


Şekil 4.47. Cu iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxAR* ve *cusSR* mutantlarında *ompF* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(**A:** *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km pLATE51::cpxA* **B:** *cpxR::km* ve onun komplement hücresi *cpxR::km pLATE51::cpxR* **C:** *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km pLATE51::cusS* **D:** *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km pLATE51::cusR*)

4.1.5.3.4. *ompG* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'da metallsiz ortama göre, bakır stresi altında en fazla artan porin *ompG* (11,69)'dir. Bakır iyonlarının ilavesi ile ~11 kat artan *ompG* geni sentezi, *cueR* (10,22), *rcnR* (8,49) ve *zur* (8,05) genleri nakavt edilmiş suşlarda görülmez iken, *nikR* (3,52) mutantında artışın aksine ~4 kat bir azalma olduğu görüldü. Çalışmanın sonucunda, *CueR*, *RcnR* ve *Zur* proteinlerinin Cu varlığında *ompG*'nin artan ifadesinde rolü olmadığı, *NikR* proteininin ise önemli derecede rolünün olduğu tespit edildi (Şekil 4.48).

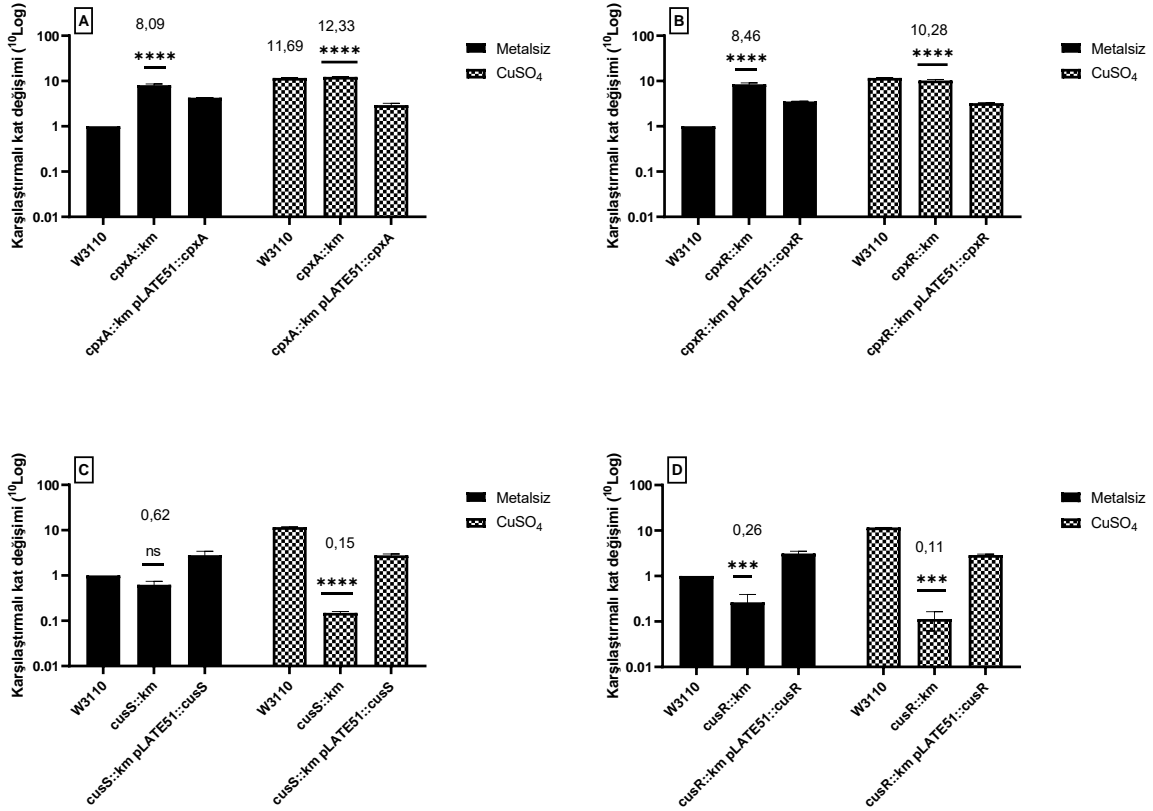


Şekil 4.48. Cu iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *ompG* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

Metalsiz ortamda yabani tip *E. coli* W3110'a (1,0) göre, *cpxA* (8,09) ve *cpxR* (8,46) genlerinin yokluğunda *ompG*'nin ifadesinin arttığı, *cusR* (0,26) geninin yokluğunda ifadesinin azaldığı ve *cusS* (0,62)'nin ise anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi. Bu durum, metalsiz ortamda CpxA ve CpxR proteinleri *ompG*'nin ifadesinin baskılanmasında, CusR proteini ise *ompG*'nin ifadesinin artışında rol oynadığını gösterir.

CpxAR ve CusSR iki bileşenli sistemlerin genlerinin mutant olduğu hücelere bakır ilave edildiğinde *ompG*'nin sentezi *cpxA* (12,33) ve *cpxR* (10,28) genlerinin olmaması durumunda yabani tip *E. coli* W3110'a göre değişmese de *cusS* (0,15) ve *cusR* (0,11) nakavt edilmiş hücrelerde *ompG*'nin ifadesinin önemli oranda azaldığı belirlendi (Şekil 4.49). Sonuç olarak, bakır iyonları varlığında *ompG*'nin artışından CusSR sisteminin sorumlu olduğu görüldü.



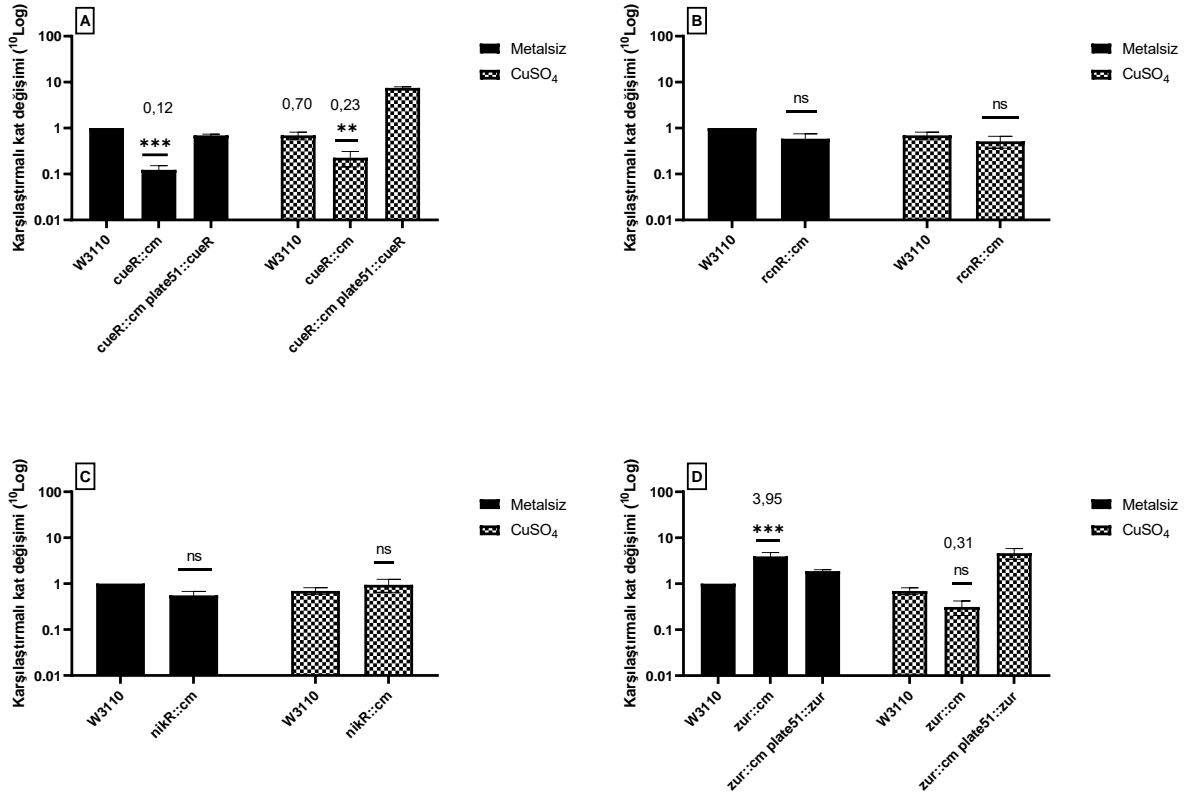
Şekil 4.49. Cu iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxAR* ve *cusSR* mutantlarında *ompG* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km* pLATE51::*cpxA* B: *cpxR::km* ve onun komplement hücresi *cpxR::km* pLATE51::*cpxR* C: *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km* pLATE51::*cusS* D: *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km* pLATE51::*cusR*)

4.1.5.3.5. *ompT* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

Bakır içermeyen ve Cu içeren ortamda büyütülen yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompT* geninin sentezi arasında (1,0'dan 0,70'e) anlamlı bir değişim bulunmadı. *rcnR* ve *nikR* genleri nakavt edilmiş hücrelerdeki *ompT* geninin hem bakır varlığında hem de yokluğunda *ompT* geninin sentezindeki değişim yabancı tip *E. coli* W3110'a benzer olduğu, bu nedenle de *ompT* geninin sentezinde herhangi bir rolünün olmadığı tespit edildi. Diğer nakavt suşlara bakıldığında ise *cueR*'nin (0,23) ve *zur*'un (0,31) mutantlarında *ompT*'nin ifadesinin baskılandığı görüldü (Şekil 4.50). Ancak *cueR* mutant hücrelerde bakır yokluğunda da baskılanması, bu proteinin metalden bağımsız olarak *ompT* geninin sentezini arttırmada görevli olduğunu gösterirken, *zur* mutant hücrelerin bakır yokluğunda *ompT* geninin sentezini arttırması ise *Zur* proteinin bakır varlığında *ompT*'nin sentezini arttırıcı rol oynadığını

gösterir. Bakır varlığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan *ompT* geninin sentezinde CueR, RcnR ve NikR'nin rolü olmadığı Zur'un ise *ompT* sentezi üzerinde arttırıcı rolü olduğu söylenebilir.

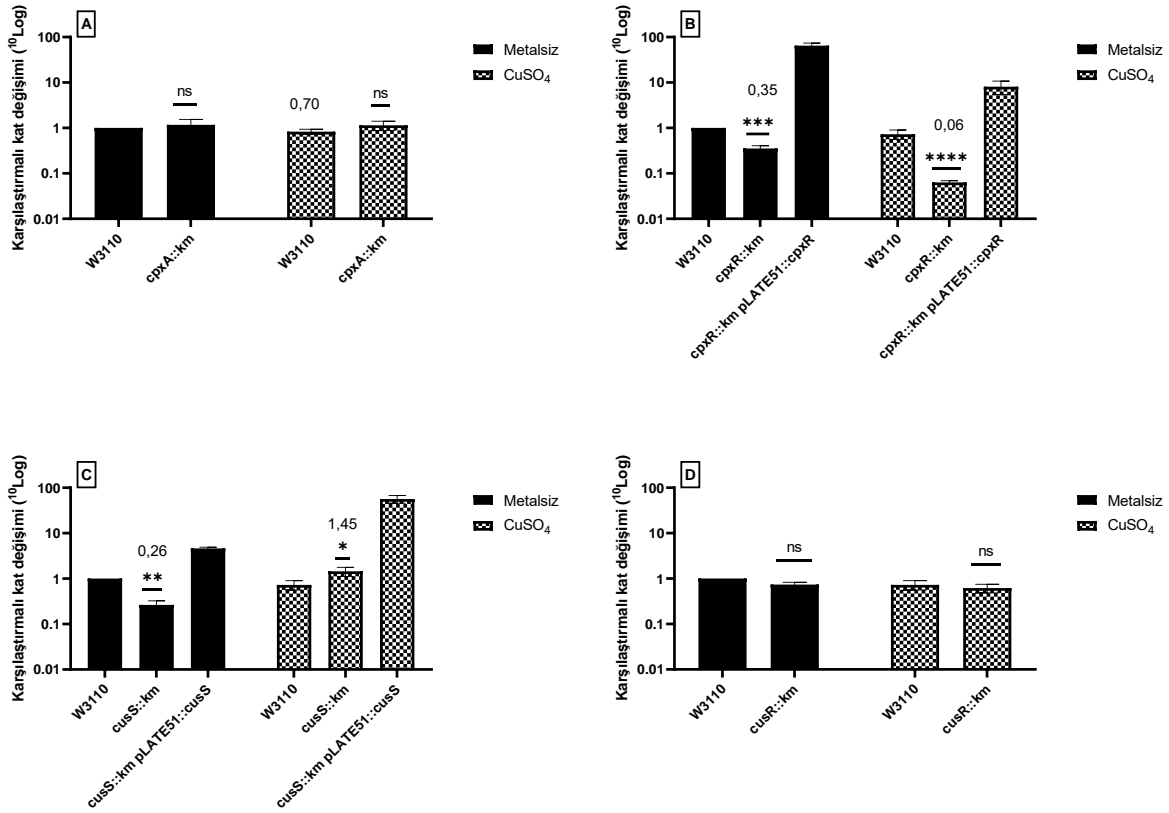


Şekil 4.50. Cu iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nkr* ve *zur* mutantlarında *ompT* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nkr::cm* ve onun komplement hücresi *nkr::cm* pLATE51::*nkr* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

Bakır homeostazından sorumlu olan *cpxA* ve *cusR* genleri yokluğunda hücrede sentezlenen *ompT* miktarının hem metali hem de metalsiz ortamda yabancı tip *E. coli* W3110'da sentezlenen *ompT* geninin miktarına benzer olduğu görüldü. *cpxR* ve *cusS* nakavt edilmiş suşlarda ise durum farklıdır. Metale maruz kalmayan (kontrol) yabancı tip *E. coli* W3110'a (1,0) göre, *cpxR* (0,35) ve *cusS* (0,26) mutantlarında *ompT* geninin ifadesi azalmaktadır. Bu durum, CpxR ve CusS proteinlerinin Cu yokluğunda *ompT* geninin sentezinden sorumlu olduğunu gösterir. Bununla birlikte, *ompT* geninin sentezi üzerine bakır iyonlarının etkisi araştırıldığında, *cpxR* (0,06) mutantında *ompT* sentezi baskılanırken, *cusS*

(1,45) mutantında sentezi artmaktadır. Şekil 4.51’de görüldüğü gibi, Cu iyonlarının etkisi ile kısmen azalan *ompT* geninin ifadesinden CusS proteininin sorumlu olduğunu söyleyebiliriz.



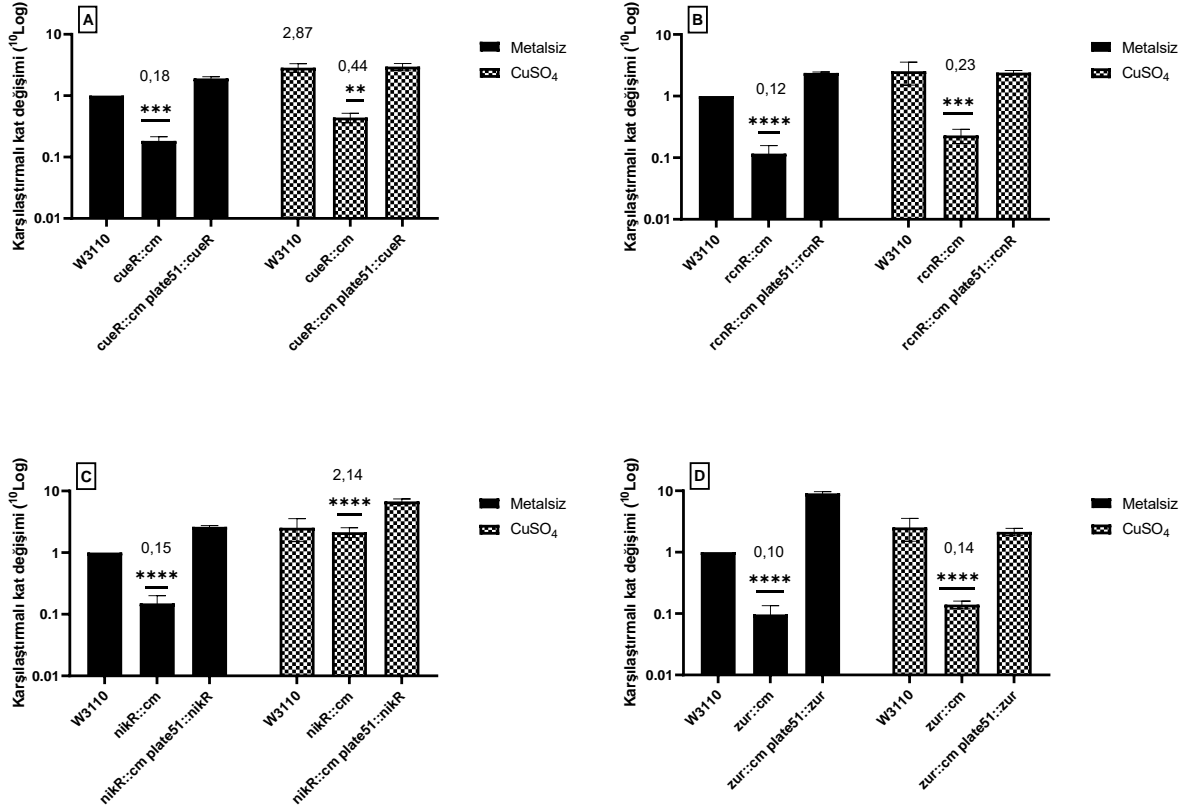
Şekil 4.51. Cu iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxAR* ve *cusSR* mutantlarında *ompT* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km pLATE51::cpxA* B: *cpxR::km* ve onun komplement hücresi *cpxR::km pLATE51::cpxR* C: *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km pLATE51::cusS* D: *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km pLATE51::cusR*)

4.1.5.3.6. *lamB* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'a göre, *lamB* geninin sentezi bakır iyonları varlığında ~3 kat (2,87) artış gösterdi. Bakır iyonlarının etkisi ile, yabancı tip *E. coli* W3110'a göre *cueR* (0,44), *rcnR* (0,23) ve *zur* (0,14) mutantlarında meydana gelen ~13 katlık azalma, bakır iyonlarının olmadığı durumda da görülmektedir (Şekil 4.52). Bu nedenle, *CueR*, *RcnR* ve *Zur* proteinlerinin metalden bağımsız olarak *lamB* geninin ifadesini arttırdığı belirlendi. Bununla birlikte, Cu varlığında *nikR* nakavt edilmiş hücrede *lamB*'nin ifadesinin yabancı tip *E. coli*

W3110’da sentezlenenden farklı olmaması, bakır varlığında *lamB*’nin ifadesini arttıran farklı bir düzenleyicinin olduğunu gösterir.



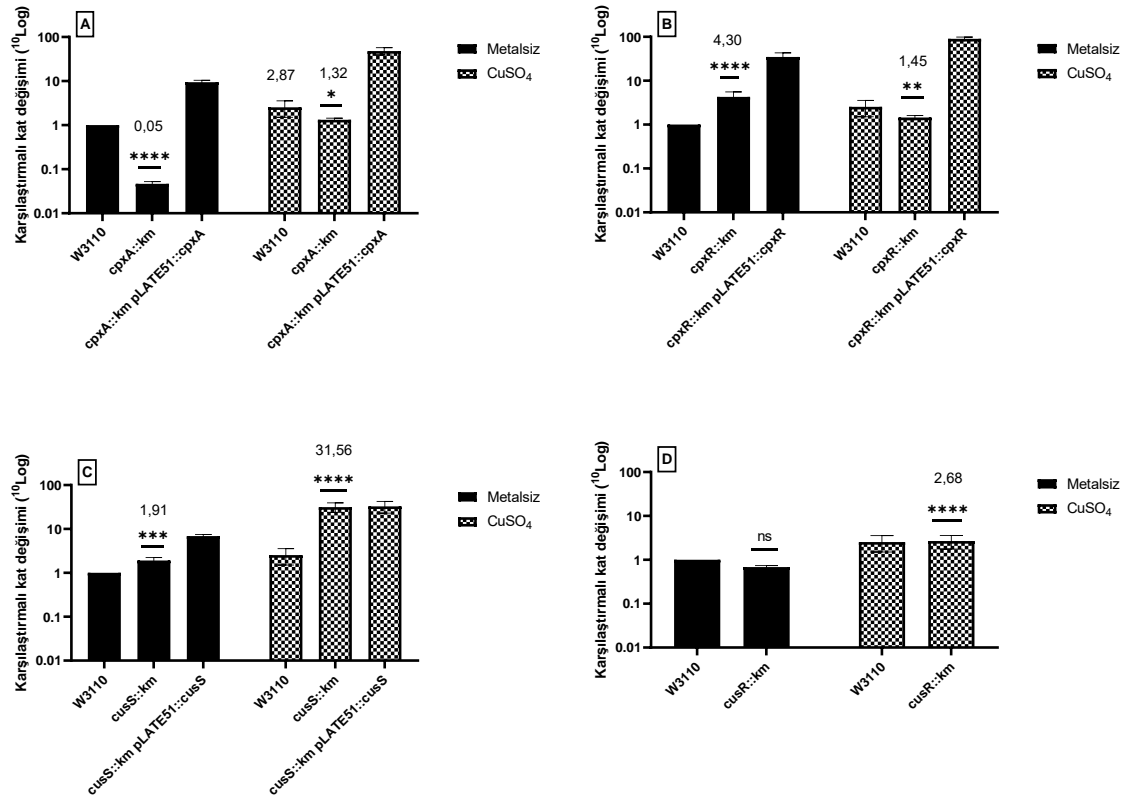
Şekil 4.52. Cu iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *lamB* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

Bakır bulunmayan ortamda, yabani tip *E. coli* W3110’da sentezlenen *lamB* miktarı ile karşılaştırıldığında, *cusS* nakavt olan suşta değişim olmadığı, *cpxA* (0,05)’de azalma olduğu, *cpxR* (4,30) ve *cusS* (1,91)’de ise artma olduğu tespit edildi. Bu sonuçlara göre, bakır yokluğunda *lamB*’nin ifadesini CpxA proteini arttırmada, CpxR ve CusS proteinleri ise baskılamada görev alır.

Ortama Cu iyonlarının eklenmesi sonucunda yabani tip *E. coli* W3110’da *lamB* ifadesinin ~3 kat (2,87) arttığı görülmektedir. *cusR* (2,68) mutant olduğunda da benzer oranda artış gözlemlendi. Hücrede bakır varlığında, *cpxA* (1,32), *cpxR* (1,45) ve *cusR* (2,68)’nin nakavt olduğu suşlarda sentezlenen *lamB*’nin yabani tip *E. coli* W3110 ile istatistiksel olarak aynı

olduğu tespit edildi. Ancak Şekil 4.53’de görüldüğü gibi, Cu varlığında, CusS proteinin yokluğunun hücrede *lamB* ifadesini (31,56) yüksek oranda (~11 kat) arttırdığı belirlendi. Bu durum, CusS proteinin *lamB* geninin bakır varlığında artışından değil, baskılanmasından sorumlu olduğunu göstermektedir.



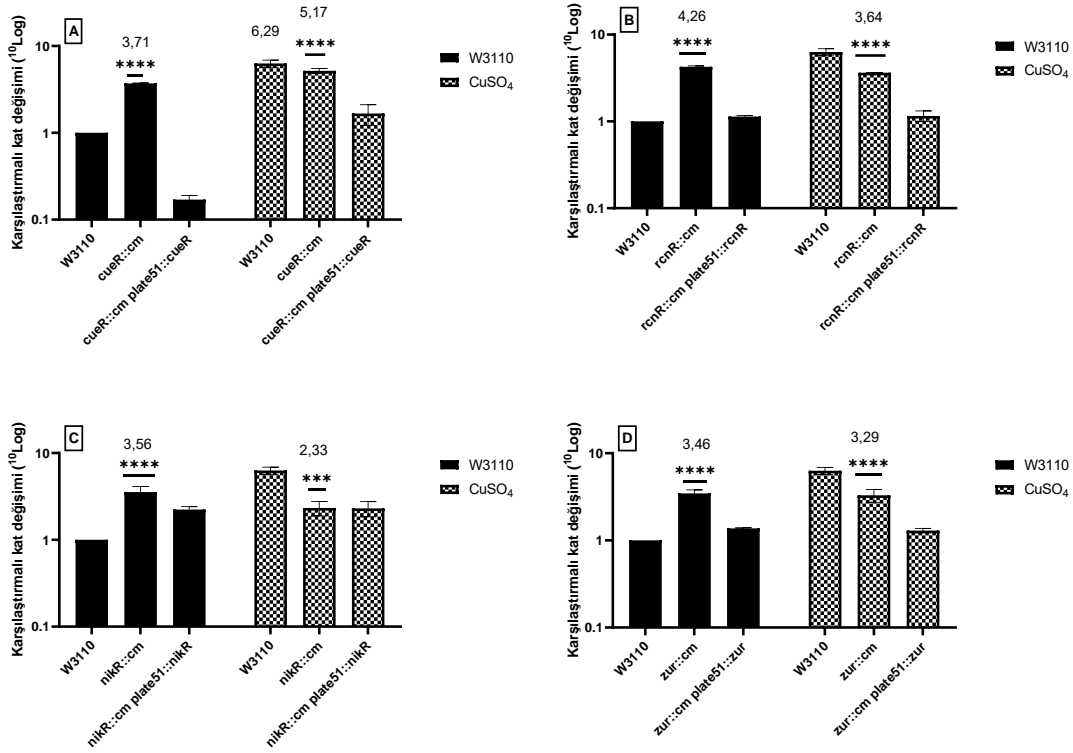
Şekil 4.53. Cu iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxA*R ve *cusSR* mutantlarında *lamB* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km pLATE51::cpxA* B: *cpXR::km* ve onun komplement hücresi *cpXR::km pLATE51::cpXR* C: *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km pLATE51::cusS* D: *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km pLATE51::cusR*)

4.1.5.3.7. *phoE* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR*, *Zur*, *CpxAR* ve *CusSR*'nin rolü

Bakır iyonlarına maruz kalan yabancı tip *E. coli* W3110 hücresinde, sayısı en çok artan ikinci porin *phoE* (6,29)'dir. Yabancı tip *E. coli* W3110 hücresinde bakır ilavesi ile meydana gelen *phoE* geninin ifadesindeki artışın, *cueR* (5,17) geninin yokluğunda da olduğu tespit edilirken, *rcnR* (3,64), *nikR* (2,33) ve *zur* (3,29) mutantlarında ise *phoE* ifadesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.54). Bu sonuçlara göre, bakır varlığında *CueR* proteinin *phoE* geninin

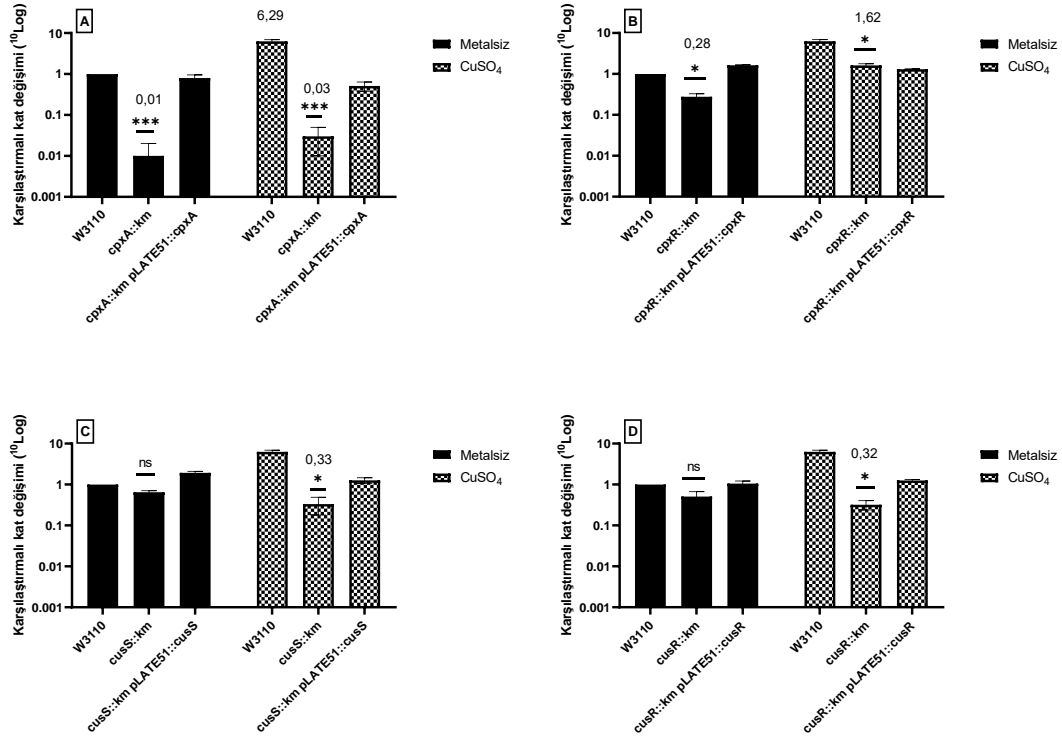
ifadesinde rolü bulunmazken, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin *phoE* geninin ifadesinin artışından sorumlu olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.54. Cu iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında *phoE* geninin transkripsiyonel seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

Metal içermeyen ortamda, CusSR iki bileşenli sistem genlerinin mutant olduğu hücrelerdeki *phoE* genin sentezi, yabani tip *E. coli* W3110'dan farklı olmadığı, *cpxA* (0,01) ve *cpXR* (0,28)'nin mutant olduğu durumda önemli miktarda baskılanmakta olduğu görüldü. Bu durum, CusSR sisteminin *phoE*'nin ifadesi üzerinde rolü olmadığını, CpxAR sisteminin ise ifadesinin artışından sorumlu olduğunu gösterir. Ancak ortama bakır iyonları ilave edildiğinde yabani tip *E. coli* W3110'da meydana gelen *phoE* genindeki ~6 kat (6,29) artış, *cusS* (0,33) ve *cusR* (0,32) mutantlarında azalma şeklinde görüldü. Bununla birlikte *cpxA* (0,03) ve *cpXR* (1,62) mutantlarında da *phoE* geninin ifadesi azalmıştır ancak bu azalma metal içermeyen ortamda da gerçekleştiği için bu azalmanın metale bağlı olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, bakır varlığında *phoE* geninde meydana gelen artıştan CpxAR'nin değil CusSR proteinlerinin önemli derecede sorumlu olduğunu söyleyebiliriz.

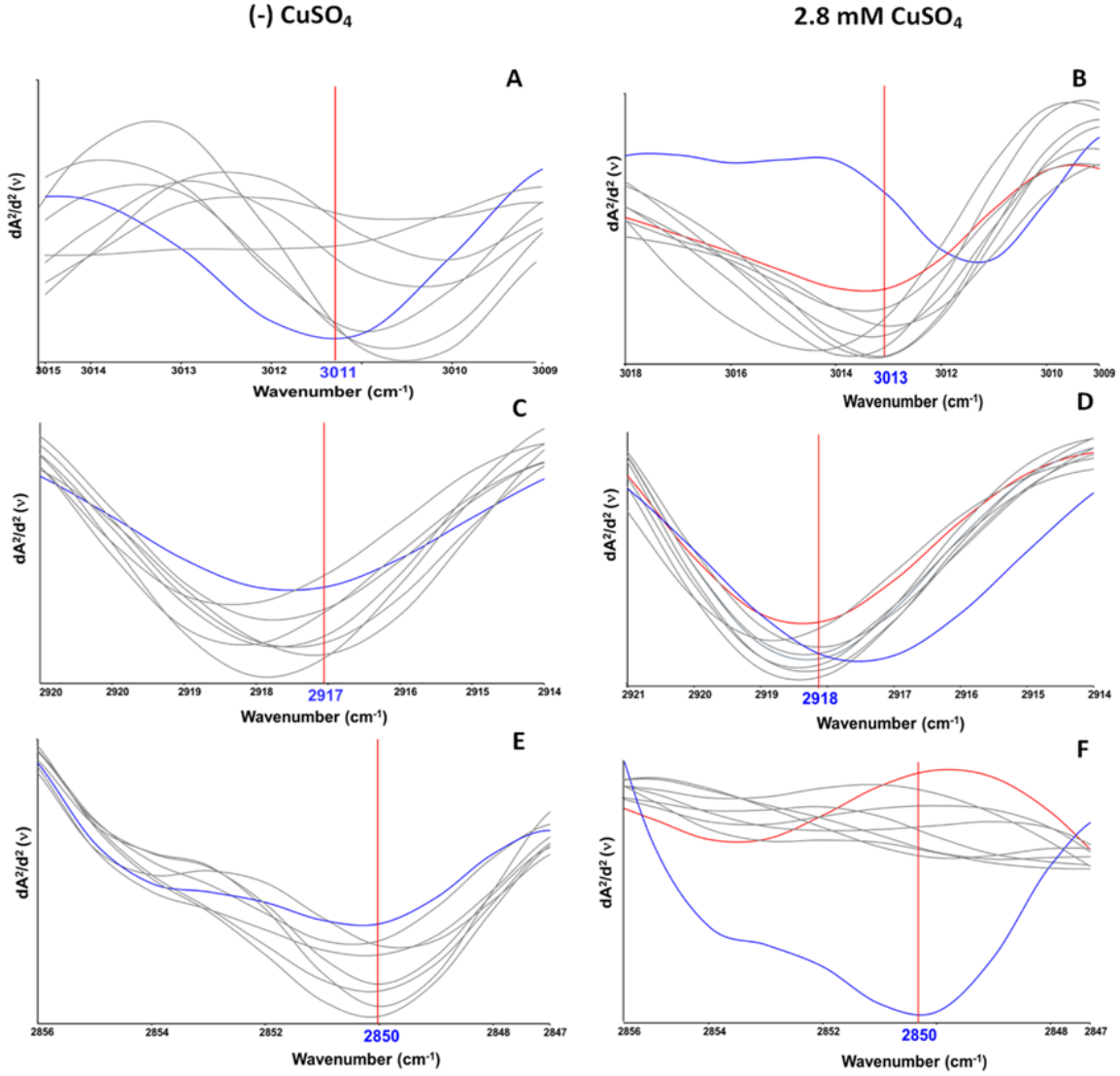


Şekil 4.55. Cu iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cpxAR* ve *cusSR* mutantlarında *phoE* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cpxA::km* ve onun komplement hücresi *cpxA::km pLATE51::cpxA* B: *cpxR::km* ve onun komplement hücresi *cpxR::km pLATE51::cpxR* C: *cusS::km* ve onun komplement hücresi *cusS::km pLATE51::cusS* D: *cusR::km* ve onun komplement hücresi *cusR::km pLATE51::cusR*)

4.1.5.4. Cu metalinin porin mutantlarında (*ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE*) meydana getirdiği biyomoleküler değişiklikler

Membran lipidleri (3100-2800 cm⁻¹); metal içermeyen bir ortamda, 3011 cm⁻¹ konumundaki spektral bandın temsil ettiği doymamış lipid miktarı, porin mutant hücrelerinde azaldı. Ancak, Cu ilavesiyle yabancı tip *E. coli* W3110'da bu bandın konumunun 3013 cm⁻¹ noktasına kaydığı belirlendi. Tüm porin mutantlarında doymamış lipid miktarının arttığı görüldü. 2918 cm⁻¹'deki bandın temsil ettiği lipid moleküllerin (CH₂ antisimetrik gerilmesi) miktarında, metal yokluğu veya varlığına bakılmaksızın, tüm porin mutantlarında artış olduğu belirlendi. 2850 cm⁻¹'de (CH₂ simetrik gerilmesi) spektral bandı oluşturan lipid miktarının ise, Cu yokluğunda porin mutantlarında arttığı görüldü. Bu bandın Cu varlığında kaybolması, hem *E. coli* W3110'da hem de tüm mutantlarda lipid konsantrasyonlarının azaldığını gösterir (Şekil 4.56).

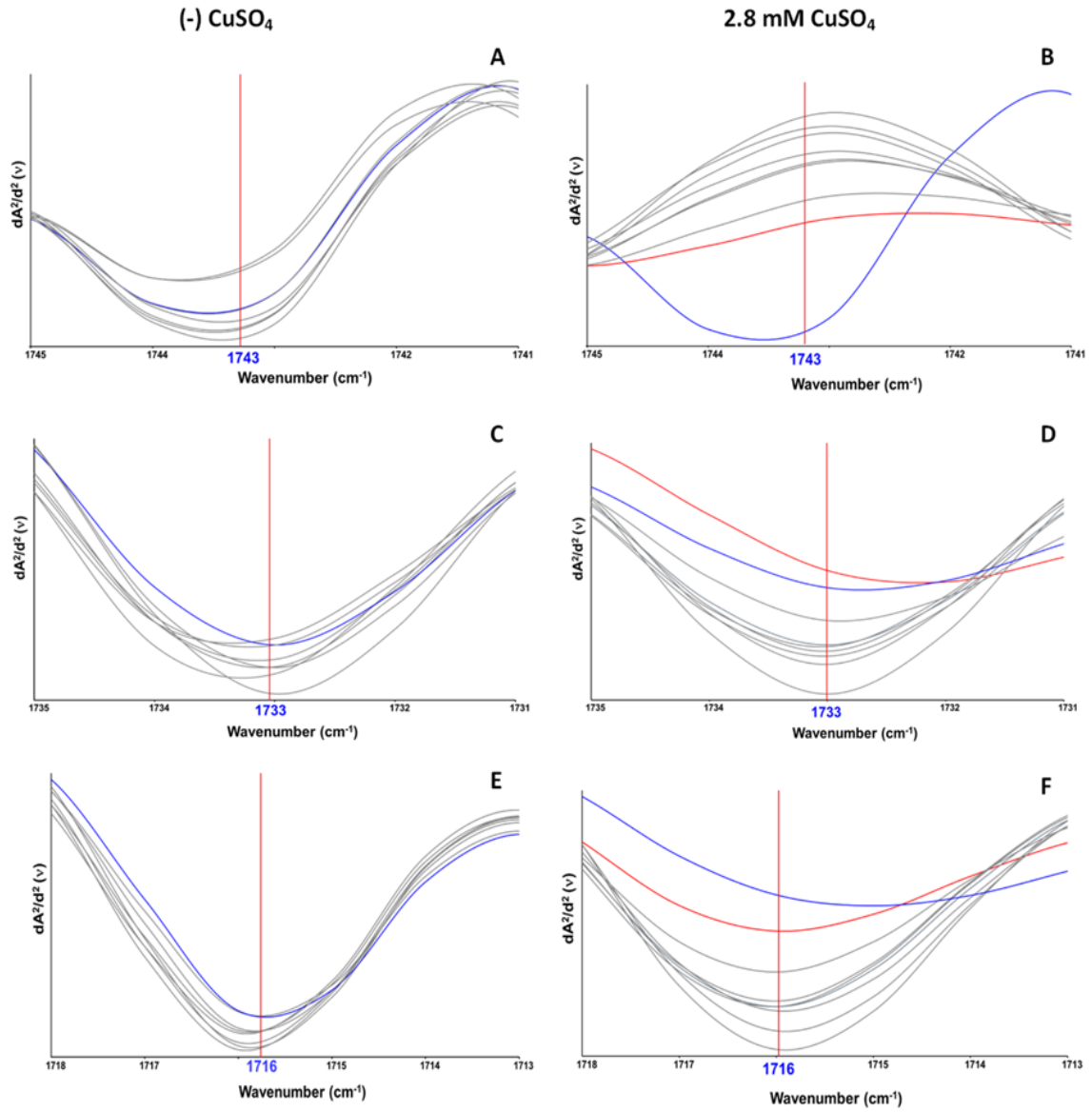


Şekil 4.56. 3100-2800 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cu iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cu iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel yağ asitleri (1800-1700 cm^{-1}); 1743 cm^{-1} spektral bandını oluşturan triasilgliseroller (TG'ler) (lipitlerin C=O germe modu), Cu iyonlarının yokluğunda porin mutantlarında genel olarak arttı. Bununla birlikte, TG miktarı, Cu iyonlarının varlığında hem yabancı tipte hem de porin mutantlarında ciddi şekilde azaldı. Bu azalma muhtemelen porin mutasyonlarından değil, Cu iyonlarından kaynaklanmaktadır. 1733 ve 1716 cm^{-1} konumlarındaki bantlar, sırasıyla lipit esterlerinin ve fosfolipidlerin C=O gerilmesi ile ilişkilidir. Her iki banttaki varyasyon benzerdir ve doğrudan porin mutasyonları ile ilişkilidir.

Başka bir deyişle, porin genlerinin yokluğu, Cu iyonlarından bağımsız olarak fosfolipitlerin sayısını artırır (Şekil 4.57).

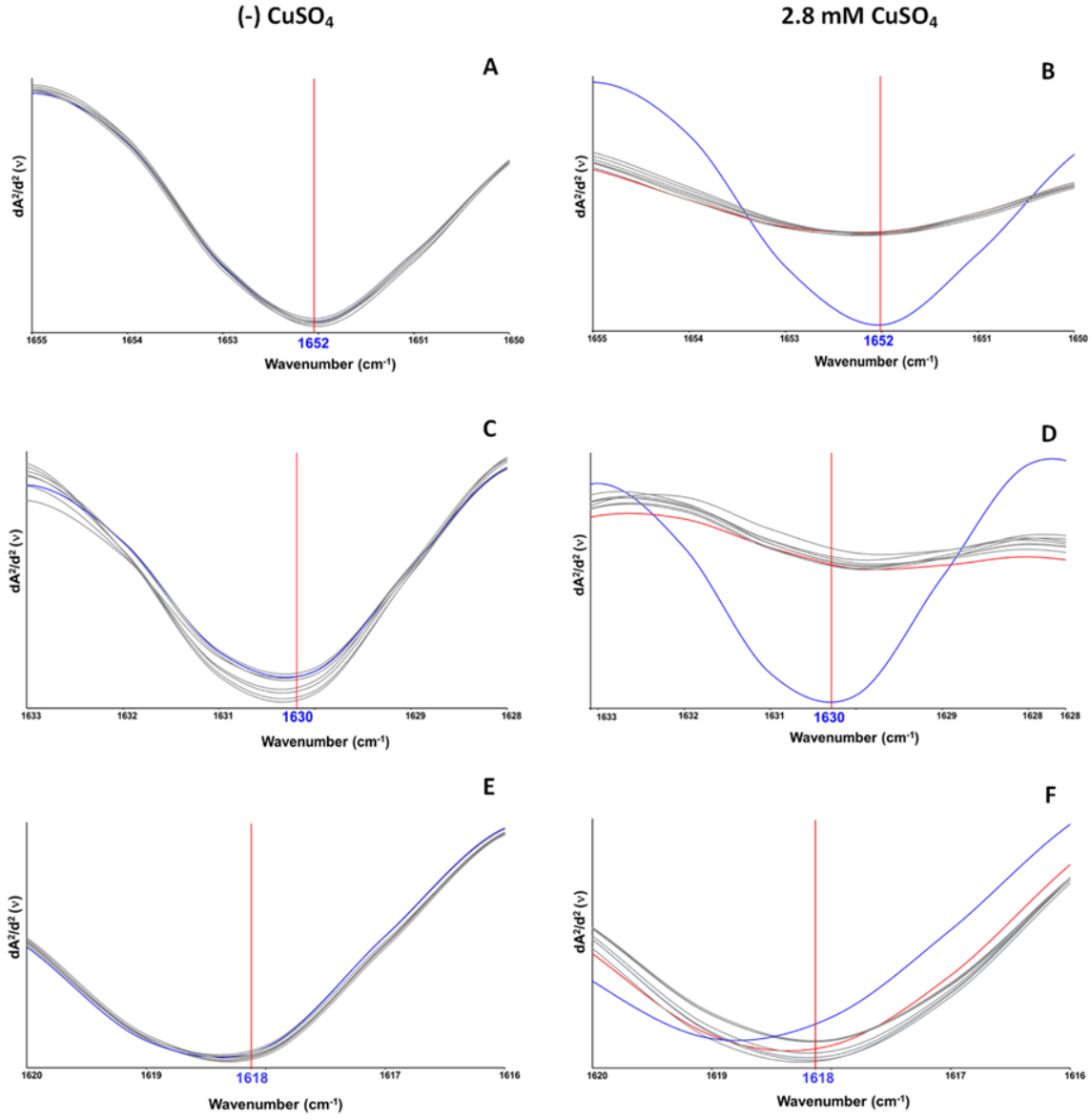


Şekil 4.57. 1800-1700 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cu iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cu iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel proteinler Amid I Bölgesi (1700-1600 cm^{-1}); 1652 cm^{-1} 'deki bant, α -sarmal yapılarının bir özelliği olan C-O'nun gerilme titreşimlerinden kaynaklanırken, 1630 cm^{-1} 'deki bant, β -tabaka yapılarına atfedilir. 1652 cm^{-1} 'deki bandın değerlendirilmesi sonucunda, Cu iyonlarının yokluğunda porin mutantları ile yabani tip *E. coli* W3110 arasında

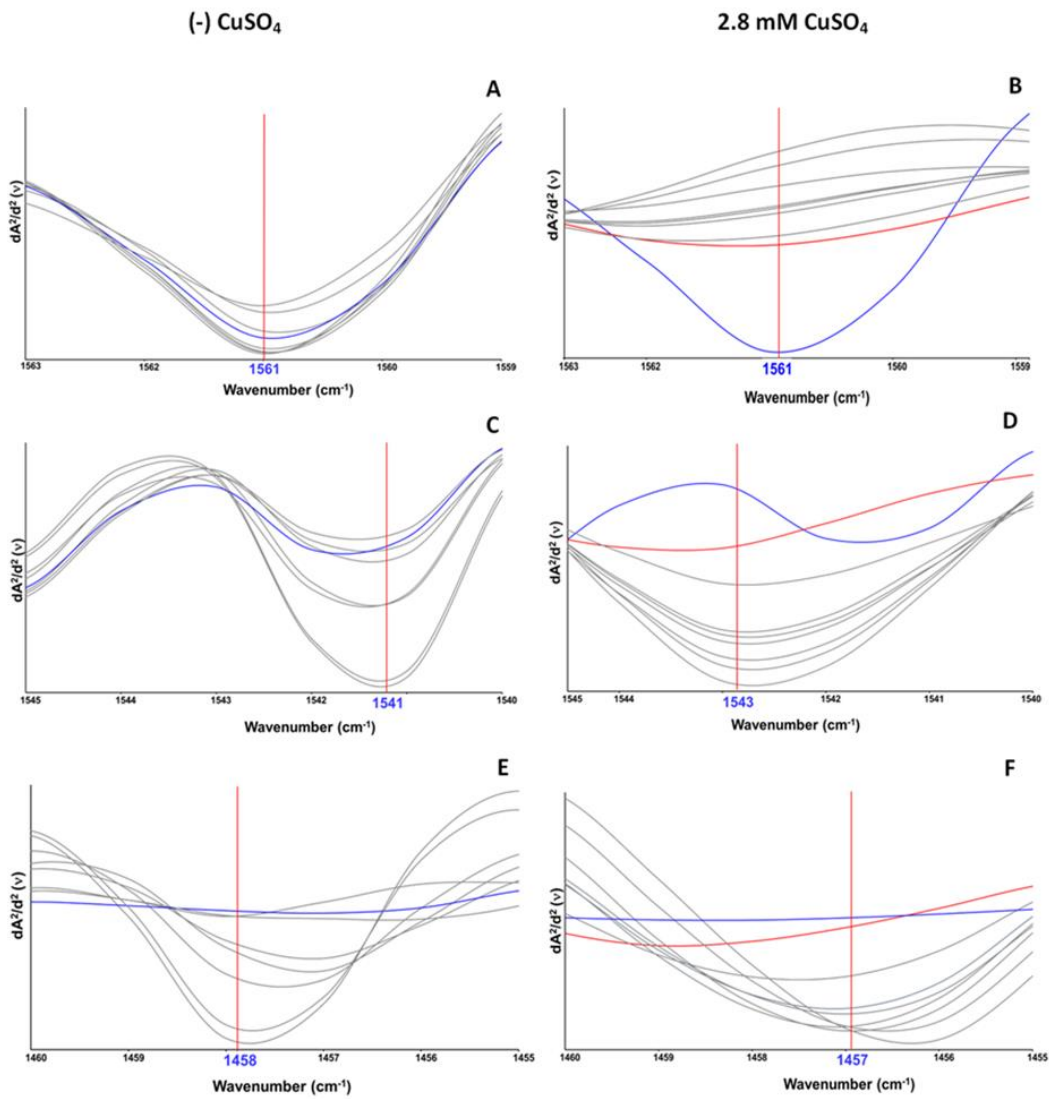
hiçbir fark olmadığı görüldü. Ancak bu bant, Cu iyonlarının varlığıyla ortadan kalktı. 1630 cm^{-1} spektral bandın alanı, Cu iyonlarının yokluğunda porin mutant gruplarında arttı. Bu bant da 1652 cm^{-1} bandında olduğu gibi Cu iyonlarının varlığıyla ortadan kalktı. 1618 cm^{-1} bandı ayrıca β -tabakaları arası H-bağları olan moleküle atfedilir. Bu bant, porin mutant gruplarında değişmese de Cu iyonlarına maruz bırakılan porin mutantlarında artış gösterdi (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. 1700-1600 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cu iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cu iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel proteinler Amid II Bölgesi (1600-1400 cm^{-1}); 1561 cm^{-1} bandı aromatik halkalardan uzanan C-C'yi göstermektedir. Bant alanı, Cu iyonlarının yokluğunda yabancı tip bakterilere kıyasla porin mutantlarının arasında farklı şekilde değişim gösterir. Ancak bu bandın temsil ettiği molekülün miktarı, Cu ilavesi ile oldukça azaldı. Ayrıca, 1543-1541 cm^{-1} (N-H bükülmesi) ve 1458-1457 cm^{-1} (CH_3 asimetrik) bantlarına karşılık gelen proteinlerin yoğunluğu, Cu iyonlarının hem yokluğunda hem de varlığında porin mutantlarında artmaktadır (Şekil 4.59). Bu artış, Cu iyonları ile ilgili olmayıp, porin genlerinin eksik olması ile ilişkilidir.

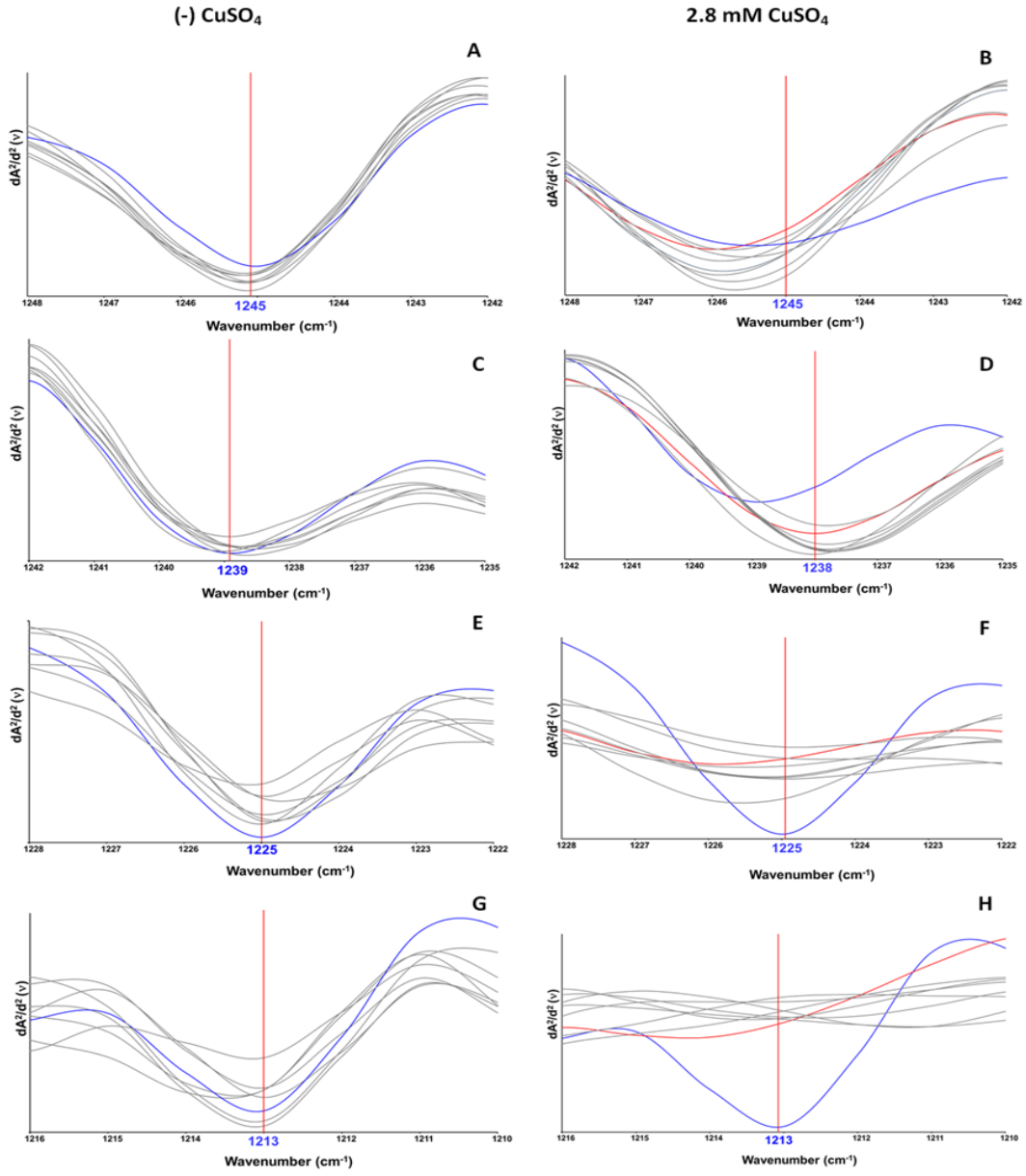


Şekil 4.59. 1600-1400 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cu iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cu iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Farklı *E. coli* porin mutantları

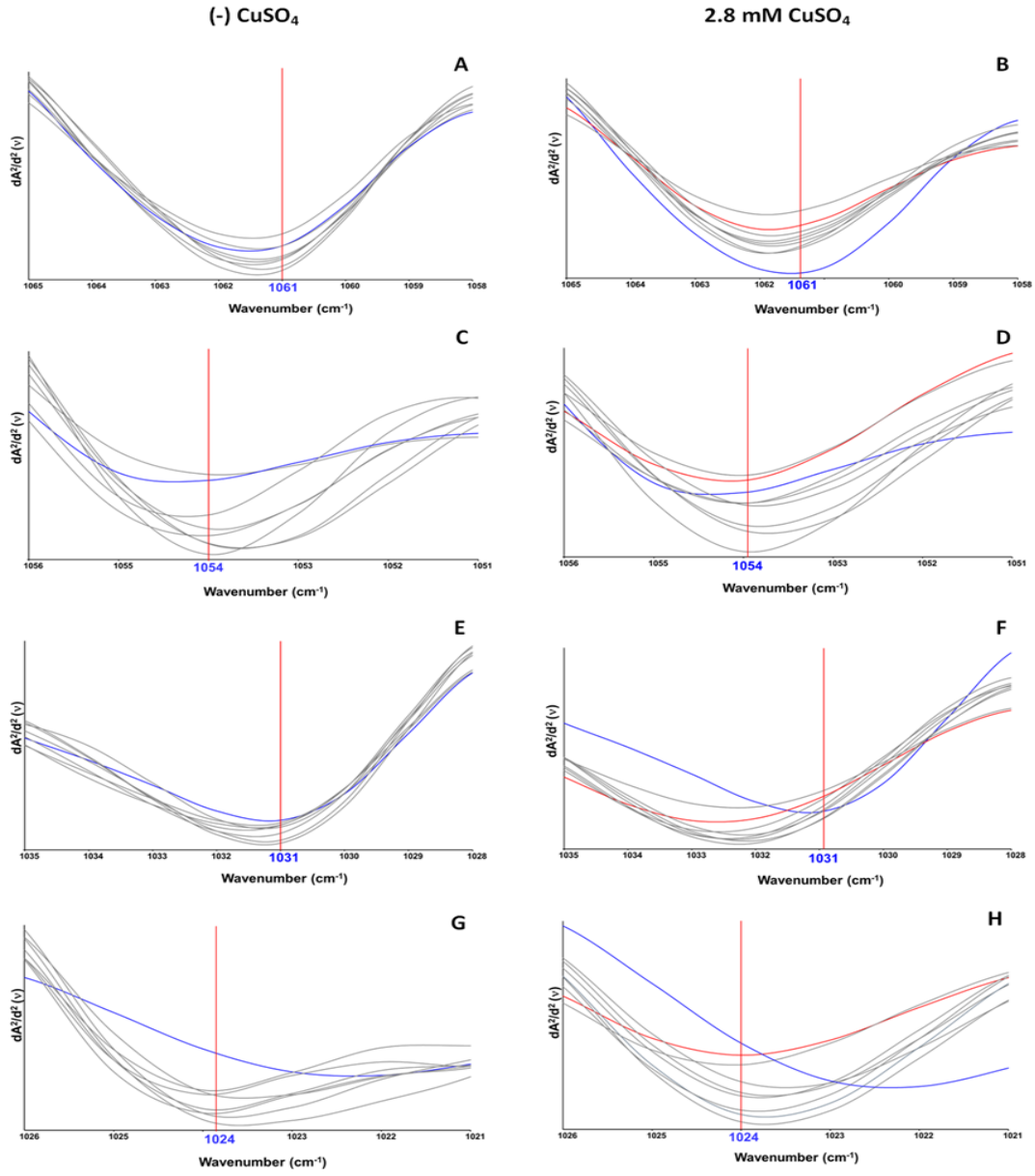
Nükleik asit bölgesi (1250-1200 cm^{-1}); Yabani tip *E. coli* W3110 ve onun porin mutantları karşılaştırıldığında, 1245 cm^{-1} (gerilen PO_2 simetrik titreşim) ve 1238 cm^{-1} (PO_2^- anti simetrik esneyen) bant alanları, Cu iyonlarının hem yokluğunda hem de varlığında porin mutantlarında artar. Bu artış, Cu iyonlarından bağımsız olarak, *E. coli* porin mutantlarında A-formu DNA konsantrasyonunun arttığını gösterir. Ayrıca, Cu'ya maruz kalan bakteriler için, bu bantlarda DNA'da yapısal değişiklikler gösteren konumsal kaymalar vardır. 1225 cm^{-1} bandı ile gösterilen B-formu DNA konsantrasyonları, Cu iyonlarının yokluğunda porin mutantlarında yabani tip *E. coli* W3110'a göre azaldı ve hatta bu iyonların varlığıyla kayboldu. Bununla birlikte, Cu iyonlarının yokluğunda, yabani tip ve mutant suşlar arasında 1213 cm^{-1} bandı ile temsil edilen Z-form DNA'sında farklılıklar gözlemlendi. B-DNA'ya benzer bir gözlem, Cu varlığında Z-DNA için de belirlendi (Şekil 4.60). Bu bulgular, porin genlerinin yokluğu ve Cu iyonlarının varlığı nedeniyle DNA'nın B- ve Z- formlarından A-formuna dönüşümlerini göstermektedir.

Bakteriyel Polisakkaritler (1100-1000 cm^{-1}); Yabani tip *E. coli* W3110 ve onun porin mutantları karşılaştırıldığında, porin genlerinin eksikliği, Cu iyonlarının hem yokluğunda hem de varlığında bakterilerin polisakkarit içeriğinde artışa neden oldu (Şekil 4.61). Bakteriler polisakkarit içeriğini arttırırlar ve polisakkariti hücre dışına salgılayarak, toksik ürünlerin hücre içine girmesini engellerler. Bu sayede, olumsuz çevre koşullarından kendilerini korurlar.



Şekil 4.60. 1250-1200 cm⁻¹ aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cu iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cu iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Farklı *E. coli* porin mutantları



Şekil 4.61. 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Cu iyonlarının yokluğunda ve/veya varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Cu iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Cu iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Farklı *E. coli* porin mutantları

4.1.6. Nikel (Ni) stresi

4.1.6.1. Ni metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri

Nikel metaline karşı belirlenen MİK ve MSK değerleri karşılaştırıldığında, yabancı tip *E. coli* W3110 ile mutantlar arasında MİK değeri (**594,15 µg/ml**) bakımından farklılık tespit edilmedi. Ancak MSK değerlerine bakıldığında, *ompA* geni mutant olan hücrelerin, yabancı tip *E. coli* W3110'a göre nikelde daha duyarlı (**4753,20 µg/ml**) olduğu belirlendi (Tablo 4.4).

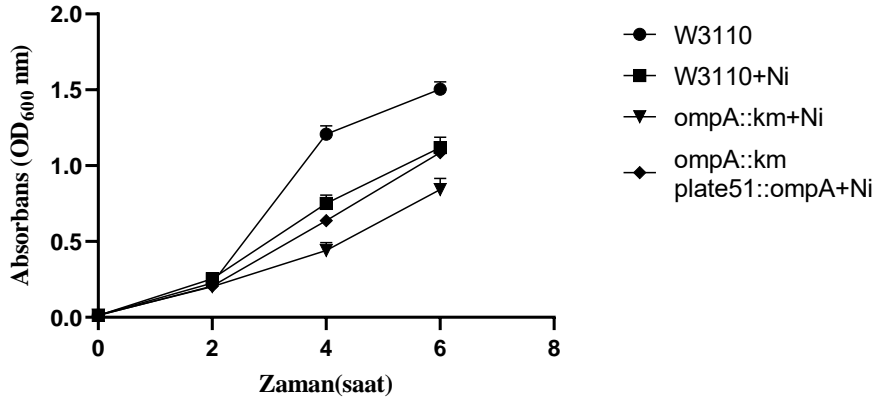
Tablo 4.4. *E. coli* W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine nikel metalinin MİK ve MSK değerleri

	Suşlar	MİK (µg/ml)	MSK(µg/ml)
NiCl ₂ *6H ₂ O	W3110	594,15	>7129,80
	<i>ompA::km</i>	594,15	4753,20
	<i>ompA::km</i> pLATE51:: <i>ompA</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompC::km</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompC::km</i> pLATE51:: <i>ompC</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompF::km</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompF::km</i> pLATE51:: <i>ompF</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompG::km</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompG::km</i> pLATE51:: <i>ompG</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompT::km</i>	594,15	>7129,80
	<i>ompT::km</i> pLATE51:: <i>ompT</i>	594,15	>7129,80
	<i>lamB::km</i>	594,15	>7129,80
	<i>lamB::km</i> pLATE51:: <i>lamB</i>	594,15	>7129,80
	<i>phoE::km</i>	594,15	>7129,80
	<i>phoE::km</i> pLATE51:: <i>phoE</i>	594,15	>7129,80

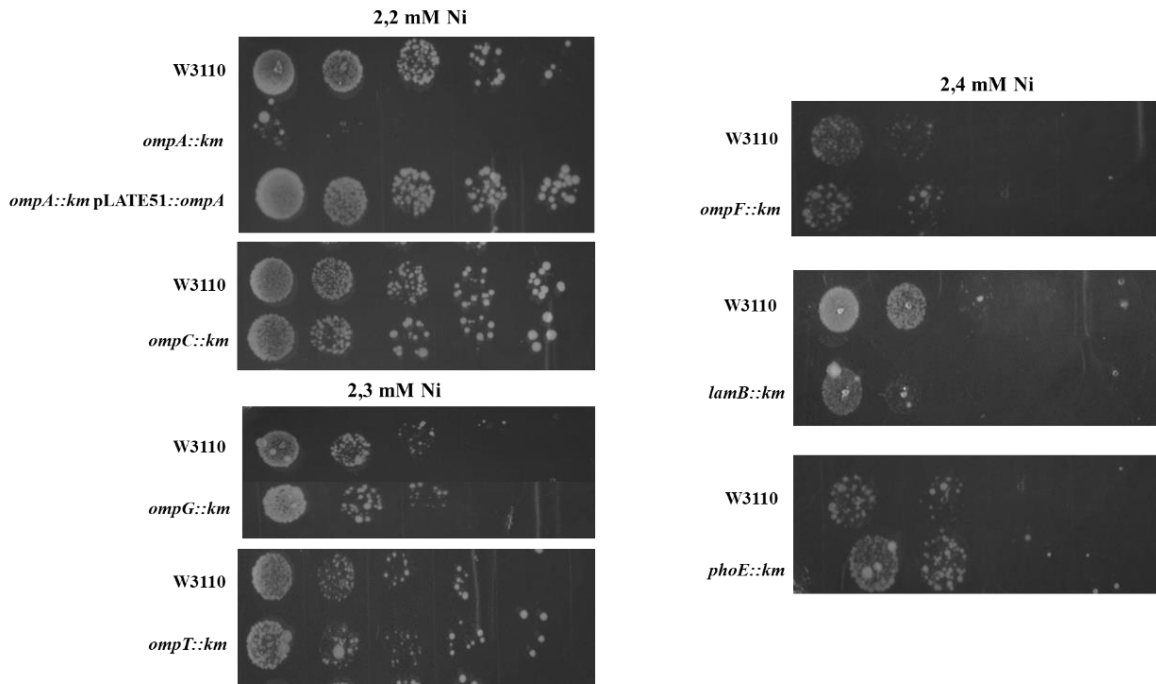
4.1.6.2. Nikel metalinin büyüme üzerine etkisi

Nikel varlığında gerçekleştirilen büyüme deneyleri sonucunda, yabancı tip *E. coli* W3110'a göre, *ompA* mutantının nikelde karşı oldukça duyarlı olduğu belirlendi. Bunun dışında diğer porin mutantlarının nikel varlığında çoğalma açısından yabancı tip *E. coli* W3110'a benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.62). Metal varlığında petri yaşam deneylerine

bakıldığında ise *ompA* mutantının duyarlılık kazandığı burada da görüldü. Diğer mutantların ise yabani tip *E. coli* W3110'a benzer olduğu Şekil 4.63'de gösterildi.



Şekil 4.62. Yabani tip *E. coli* W3110, *ompA* mutant suşu ve bu mutantın komplement hücrelerinin Ni metali varlığında büyüme grafiği

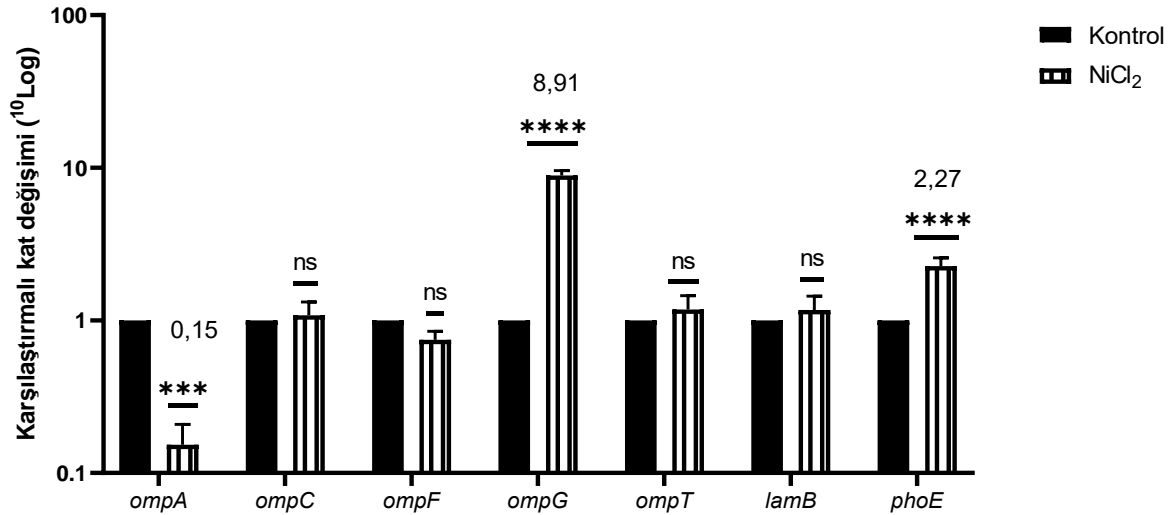


Şekil 4.63. Yabani tip *E. coli* W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Ni metali varlığında petride yaşam deneyi

4.1.6.3. Ni metali varlığında porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi

Çalışmada Ni stresi uygulanan yabani tip *E. coli* W3110'daki porin genlerinin transkripsiyonel seviyedeki sentezi Şekil 4.64'te gösterildi. Buna göre, metalsiz ortamda büyütülen yabani tip *E. coli* W3110 (kontrol) (1,0) ile nikel ilave edilmiş ortamda büyütülen

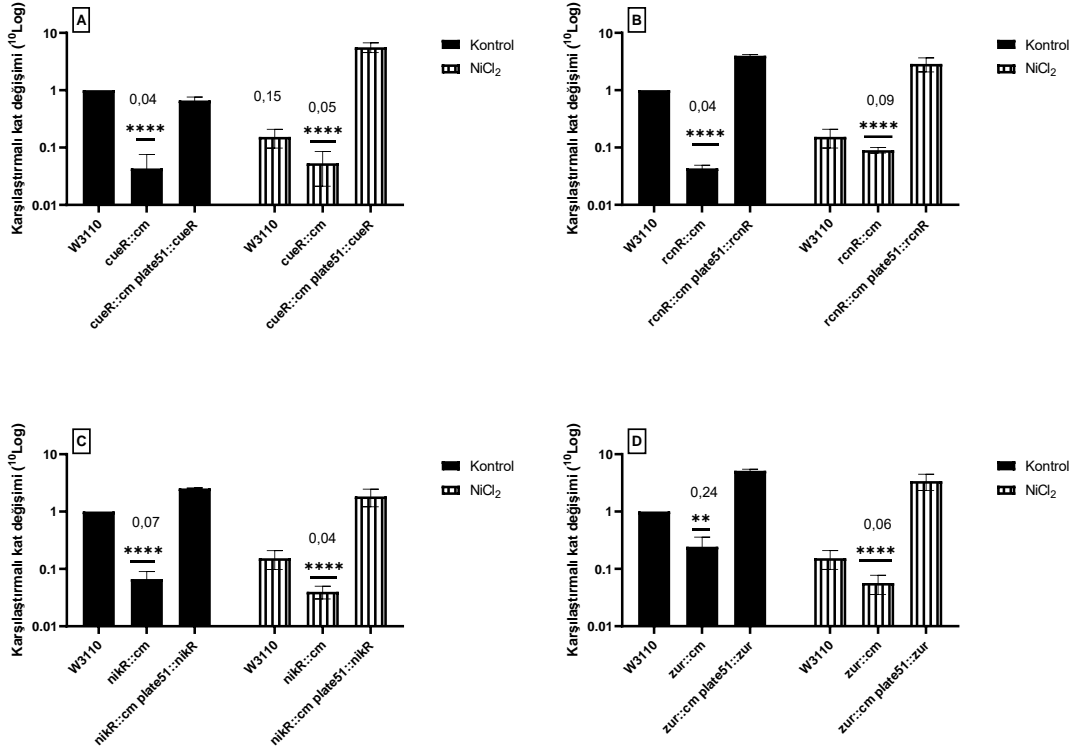
yabani tip *E. coli* W3110'daki porin genlerinin sentezinin karşılaştırılması sonucunda, *ompC* (1,08), *ompF* (0,75), *ompT* (1,18) ve *lamB* (1,17) genlerinin sentezinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi. Ancak metalsiz ortama nikel iyonlarının ilave edilmesiyle *ompA* (0,15) geninin sentezindeki azalma, *ompG* (8,91) ve *phoE* (2,27) genlerinin sentezinde ise artış istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. Nikel stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinde porin genlerinin sentez seviyesi

4.1.6.3.1. *ompA* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Metal stresi uygulanmamış yabani tip *E. coli* W3110 (1,0) ile nikel stresi uygulanan hücrelerin karşılaştırılması sonucunda sadece *ompA* (0,15) geninin sentezinde önemli oranda azalma belirlendi. Şekil 4.65'de görüldüğü gibi, nikel varlığında *cueR* (0,05), *rcnR* (0,09), *nikR* (0,04) ve *zur* (0,06) nakavt suşlarında *ompA* ifadesinin yabani tip *E. coli* W3110'a nazaran daha fazla azaldığı belirlendi. Aynı zamanda, metalsiz ortamda yapılan denemelerde, yabani tip *E. coli* W3110'da ve mutantlarında *ompA* ifadesinde benzer bir baskılanmanın olduğu belirlendi. Bu nedenle, nikel iyonları varlığında, *ompA* geninin sentezindeki azalmanın *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur* proteinlerine bağlı olmadığı belirlendi. Ancak, bu proteinlerin metalden bağımsız olarak *ompA* sentezini arttırdığı tespit edildi.

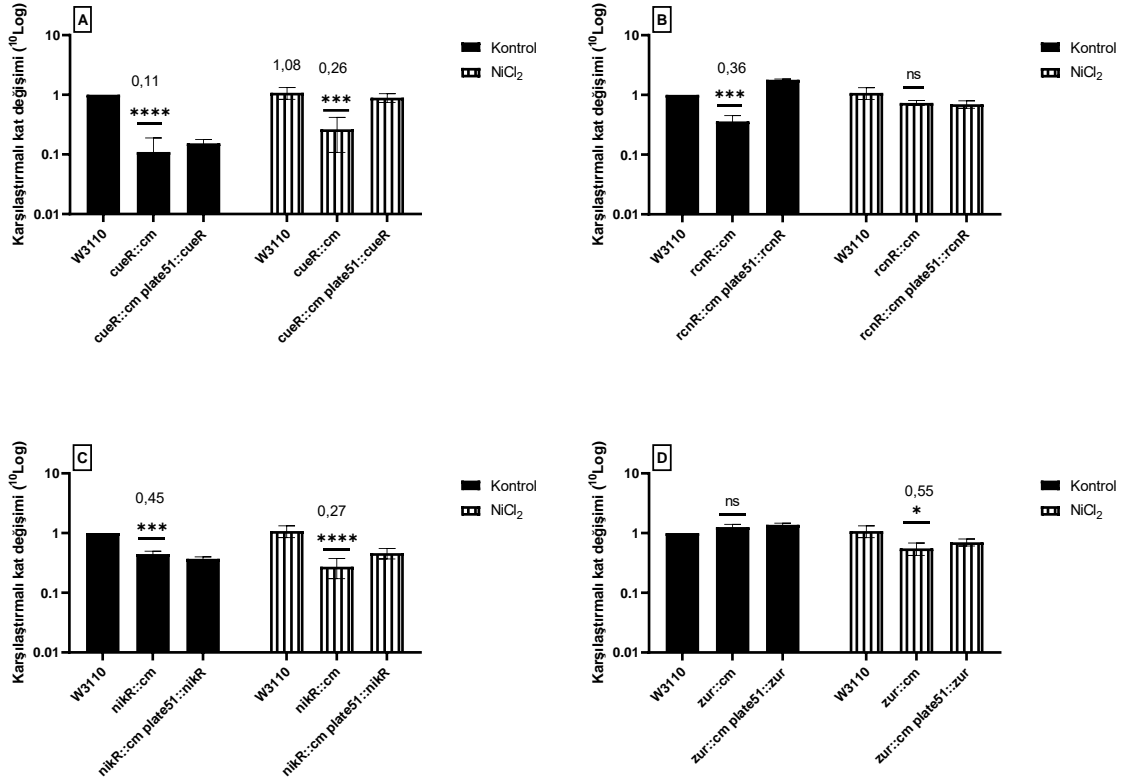


Şekil 4.65. Ni iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompA* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.6.3.2. *ompC* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompC* geninin sentezindeki değişim, nikel iyonlarının varlığında (1,08) ve yokluğunda (1,0) istatikselsel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak, nikel iyonlarının ilave edilmesi ile yabancı tip *E. coli* W3110'da ifade edilen *ompC* geninin sentezi ile mutant hücrelerdeki *ompC* geninin sentezi karşılaştırıldığında; *rcnR* nakavt edilmiş hücrelerde gen sentezinin değişmediği, *cueR* (0,26), *nikR* (0,27) ve *zur* (0,55) mutantlarında ise gen sentezinin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.66). Bununla birlikte, metal içermeyen ortamda, *cueR* (0,11) ve *nikR* (0,45) nakavt suşlarında da benzer şekilde baskılanma olurken, *zur* mutantında herhangi bir baskılanmanın olmadığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, CueR, RcnR ve NikR proteinlerinin nikel varlığında *ompC*'nin ifadesi üzerinde rolü olmadığı, Zur proteininin ise *ompC* ifadesinin artışından sorumlu olduğu tespit edildi. Burada çalışılan proteinlerin dışında nikel ile bağlı farklı bir düzenleyici sayesinde de *ompC*'nin ifadesinin tekrar dengeye geldiği, metale bağlı anlamlı bir değişim olmamasından anlaşılmaktadır.

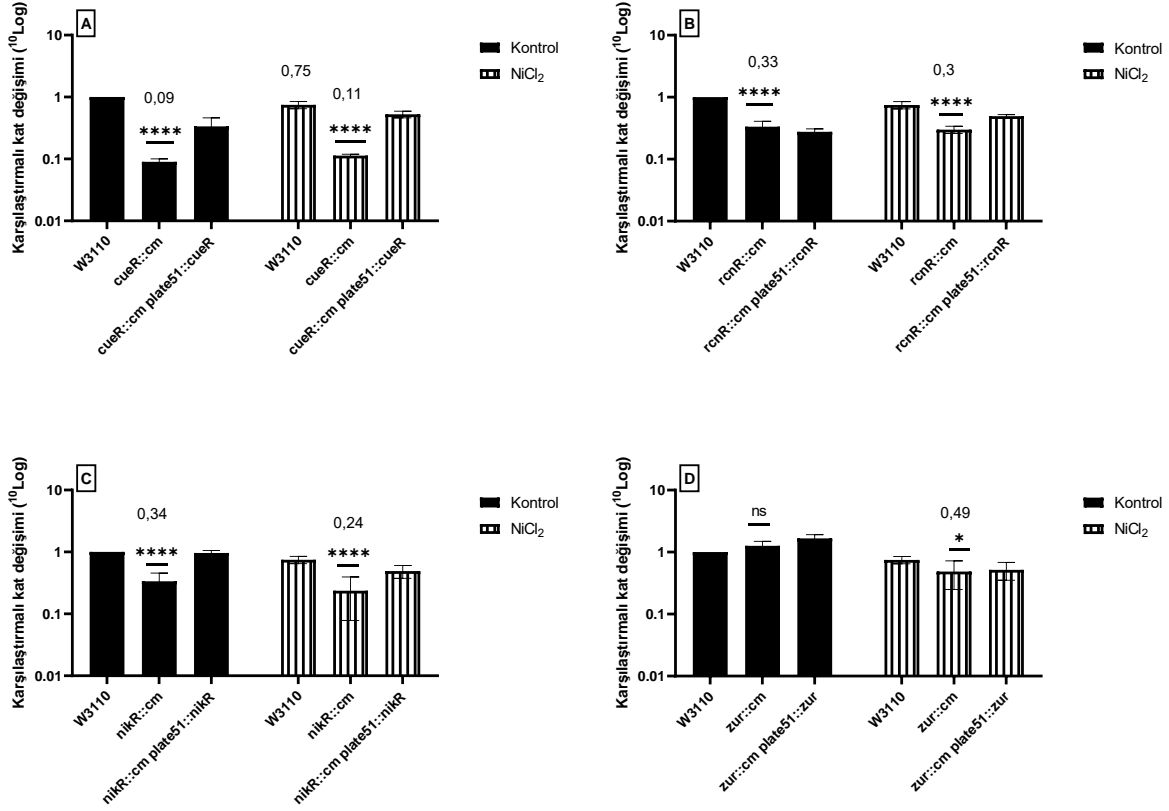


Şekil 4.66. Ni iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompC* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

4.1.6.3.3. *ompF* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabancı tip *E. coli* W3110'da ortama nikel iyonlarının ilave edilmesinin *ompF* (0,75) geninde anlamlı bir değişim neden olmadığı belirlendi. Nikel iyonlarının ilave edilmesi ile mutantlarda görülen *ompF* geninin sentezindeki değişim, *ompC* genindeki ile benzer sonuçlar verdi. Nikel varlığında yabancı tip *E. coli* W3110'da belirlenen *ompF* geninin ifadesi, *cueR* (0,11), *rcnR* (0,3), *nikR* (0,24) ve *zur* (0,49) genlerinin nakavt edilmesi durumunda önemli derecede azalmaktadır. Ancak *cueR* (0,09), *rcnR* (0,33) ve *nikR* (0,34) genlerinin yokluğu ile de *ompF* geninin ifadesinin baskılandığı, *zur* mutantında ise *ompF* geninin ifadesinin değişmediği Şekil 4.67'de görülmektedir. Bu durumda, Ni varlığında *ompF*'nin ifadesi üzerinde *CueR*, *RcnR* ve *NikR* proteinlerinin rolü olmadığı, *Zur* proteininin ise ifadesini kısmen arttırmada rolü olduğu tespit edildi. *ompC* geninde olduğu gibi, *ompF*'nin ifadesini de farklı bir düzenleyicinin kontrol ettiğini söyleyebiliriz.

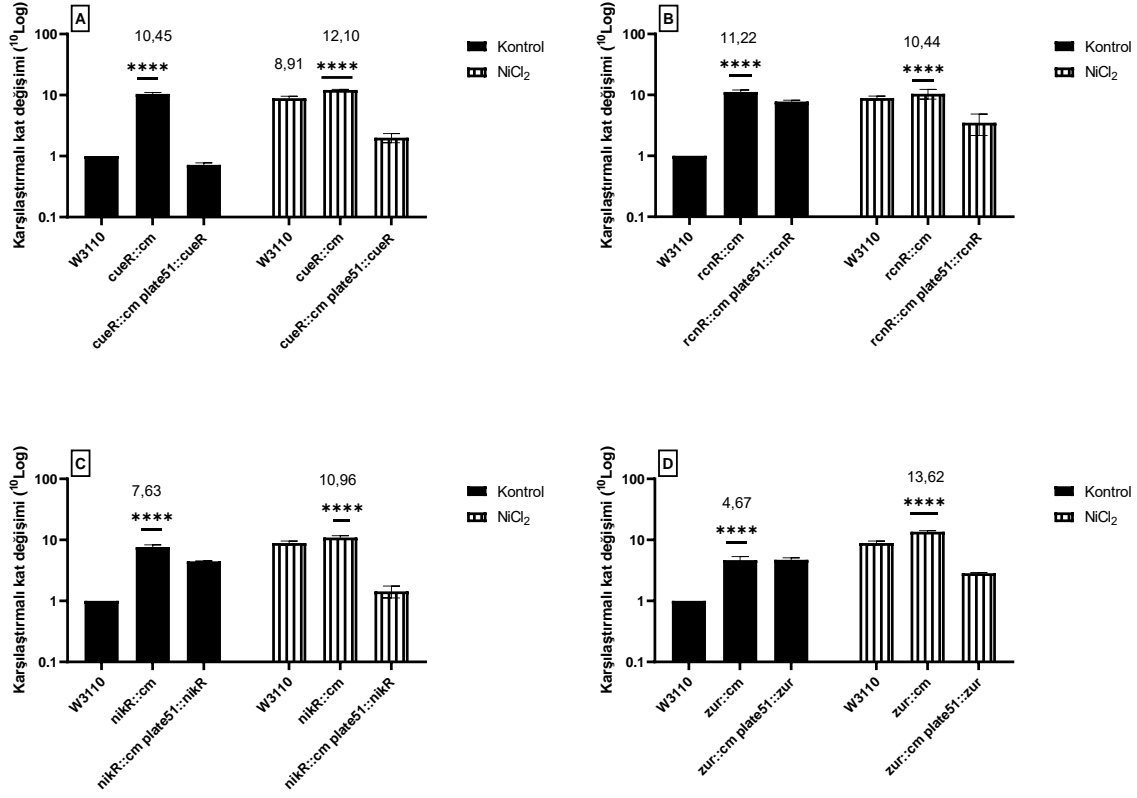


Şekil 4.67. Ni iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompF* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

4.1.6.3.4. *ompG* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Çalışmada uygulanan Ni stresi varlığında, yabani tip *E. coli* W3110'da en fazla sentezlenen porin geninin *ompG* (8,91) olduğu belirlendi. Nikel varlığında yabani tip *E. coli* W3110'da *ompG* geninin sentezindeki ~9 kat artış, *cueR* (10,45'den 12,10'a), *rcnR* (11,22'den 10,44'e), *nikR* (7,63'den 10,96'ya) *zur* (4,67'den 13,62'ye) mutantlarında görülmedi. Bu durum, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin Ni varlığında önemli oranda artış gösteren *ompG*'nin ifadesi üzerinde rollerinin olmadığı ve bu proteinlerin dışında farklı bir düzenleyici proteinin *ompG*'yi kontrol ettiği söylenebilir.

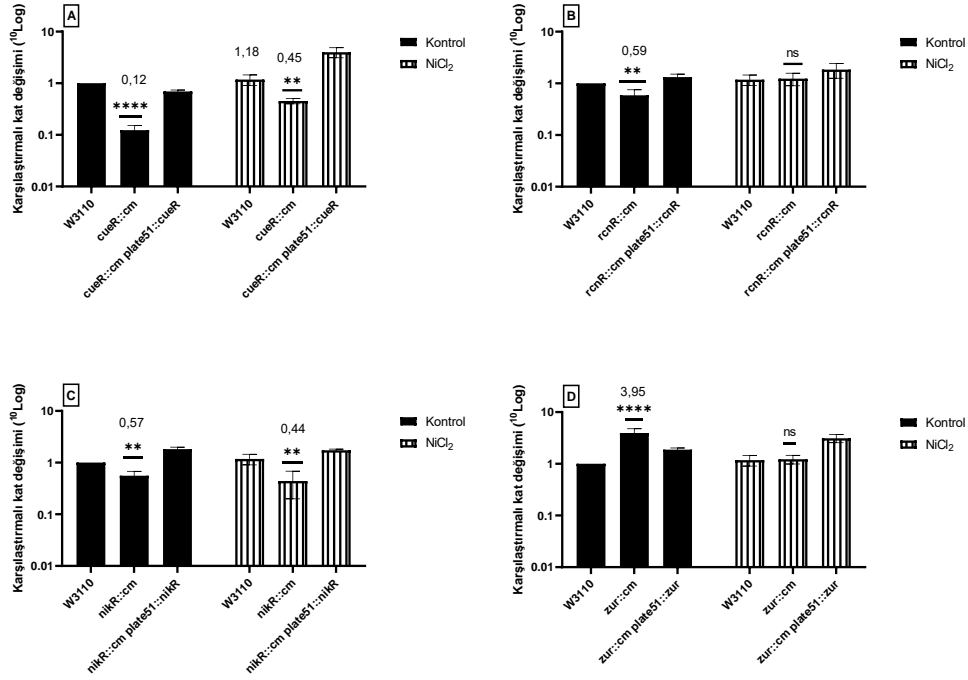


Şekil 4.68. Ni iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompG* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.6.3.5. *ompT* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da nikel metali varlığında sentezlenen *ompT*'nin (1,18), metelsiz ortamda sentezlenenden (1,0) farklı olmadığı bulundu. Ni metali eklenen ortamda büyütülen *rcnR* ve *zur* nakavt edilmiş hücrelerde sentezlenen *ompT*'nin miktarı, yabani tip *E. coli* W3110 ile benzerlik gösterdi. *cueR* (0,45) ve *nikR* (0,44) mutant hücrelerde sentezlenen *ompT* miktarlarının, yabani tip *E. coli* W3110'a göre ~2,5 kat azaldığı belirlendi (Şekil 4.69). Ancak, *cueR* ve *nikR* mutant hücrelerde metal içermeyen ortamda sentezlenen *ompT* miktarının da yabani tip *E. coli* W3110'a göre azaldığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin metal içermeyen ortamda *ompT*'nin ifadesini düzenlediği, Ni varlığında ise herhangi bir rolünün olmadığı görüldü.

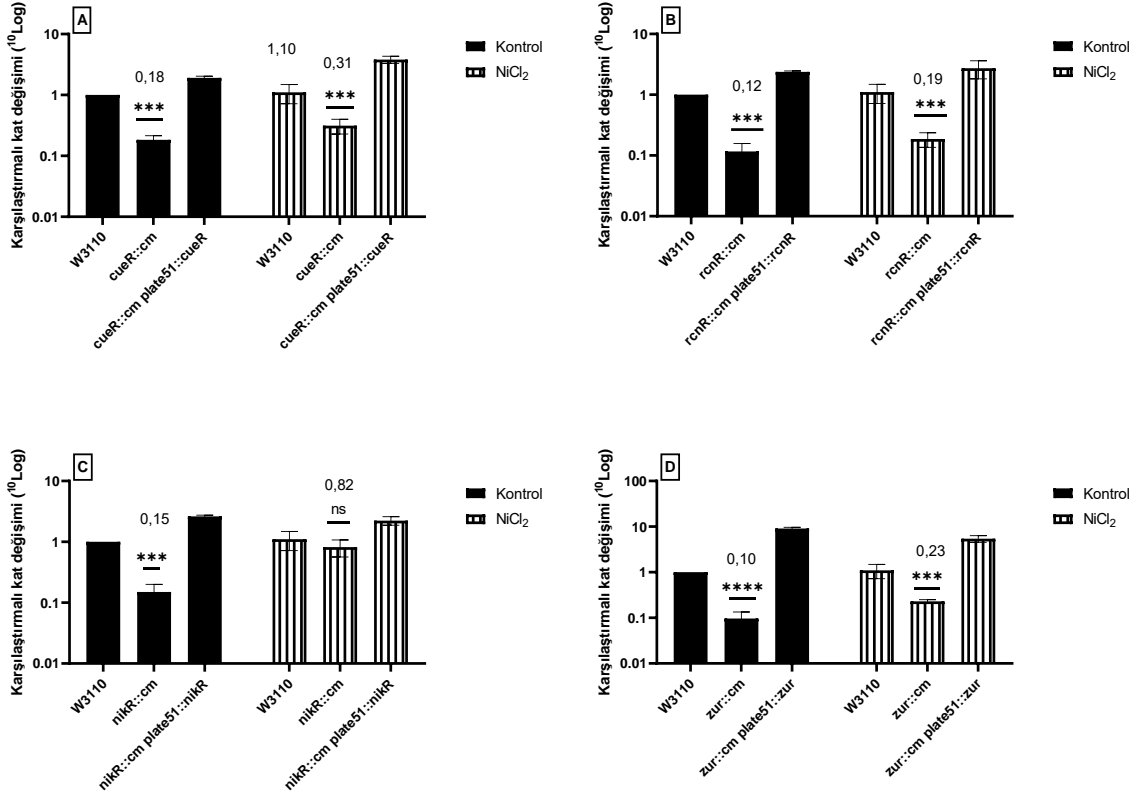


Şekil 4.69. Ni iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompT* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(**A:** *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* **B:** *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* **C:** *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* **D:** *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.6.3.6. *lamB* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da nikel metali varlığında *lamB* geninin sentezinde, metalsiz ortama göre, önemli bir değişim olmamasına rağmen, *cueR* (0,31), *rcnR* (0,19) ve *zur* (0,23) nakavt edilmiş hücrelerde önemli derecede (~4 kat) baskılandığı belirlendi. *nikR* (0,82) mutantına bakıldığında, Ni varlığında sentezlenen *lamB* miktarı yabani tip *E. coli* W3110'a benzer olduğu görüldü (Şekil 4.70). Bu sonuçlara göre, Ni varlığında *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur* proteinlerinin *lamB*'nin ifadesini düzenleyici herhangi bir rolü olmadığını söyleyebiliriz.

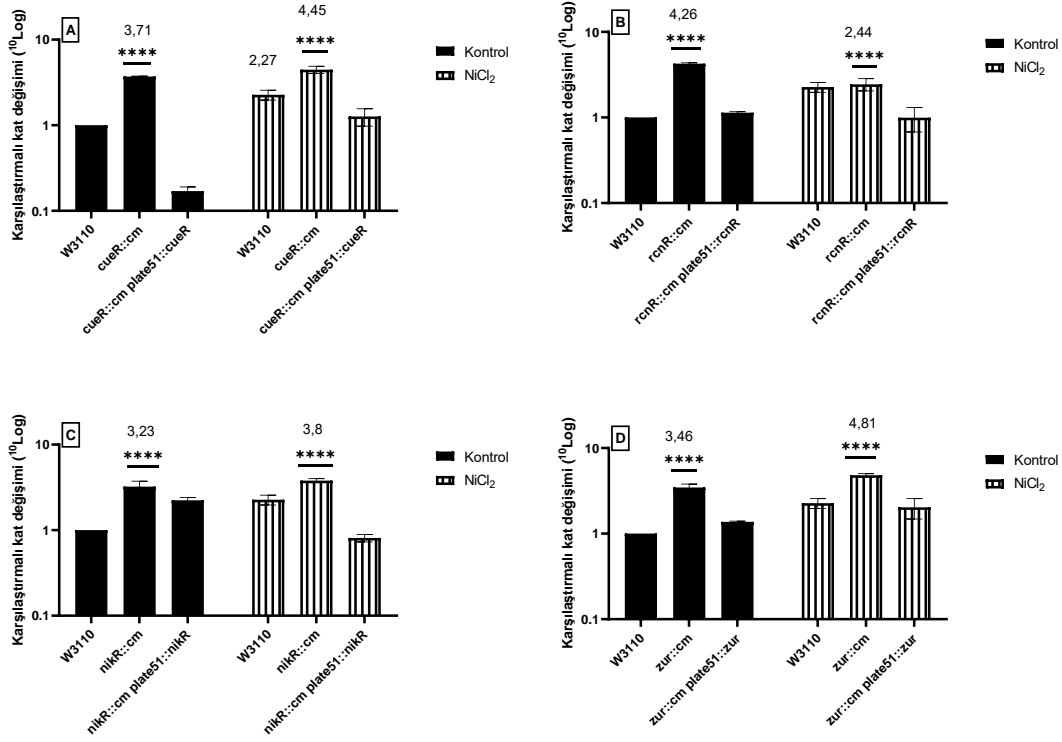


Şekil 4.70. Ni iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *lamB* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

4.1.6.3.7. *phoE* geninin sentezinde CueR, RcnR, NikR ve Zur'un rolü

Nikel varlığında ve yokluğunda büyütülen yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinde sentezlenen *phoE* geninin miktarı karşılaştırıldığında, nikelin etkisi ile *phoE*'nin ifadesinin ~2 kat (2,27) arttığı tespit edildi. Yabani tip *E. coli* W3110'da meydana gelen bu artışın, *cueR* (4,45), *nikR* (3,8) ve *zur* (4,81) genlerinin yokluğunda da gerçekleşmesine rağmen, *rcnR* (2,44) geninin yokluğunda gerçekleşmediği tespit edildi. Ayrıca metal içermeyen ortamda, *cueR* (3,71), *nikR* (3,23) ve *zur* (3,46) genlerinin yokluğunda da *phoE*'nin ifadesinin arttığı görüldü (Şekil 4.71). Bu durum, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin *phoE*'nin ifadesi üzerindeki baskılayıcı rolünün metalden bağımsız olduğunu ortaya koymaktadır.

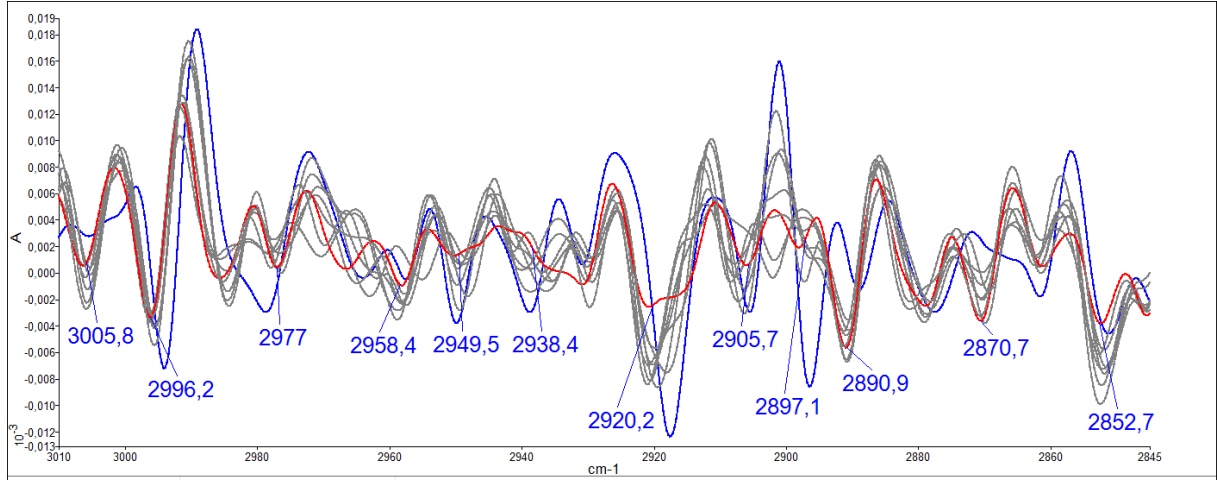


Şekil 4.71. Ni iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *phoE* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

4.1.6.4. Ni metalinin porin mutantlarında (*ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE*) meydana getirdiği biyomoleküler değişiklikler

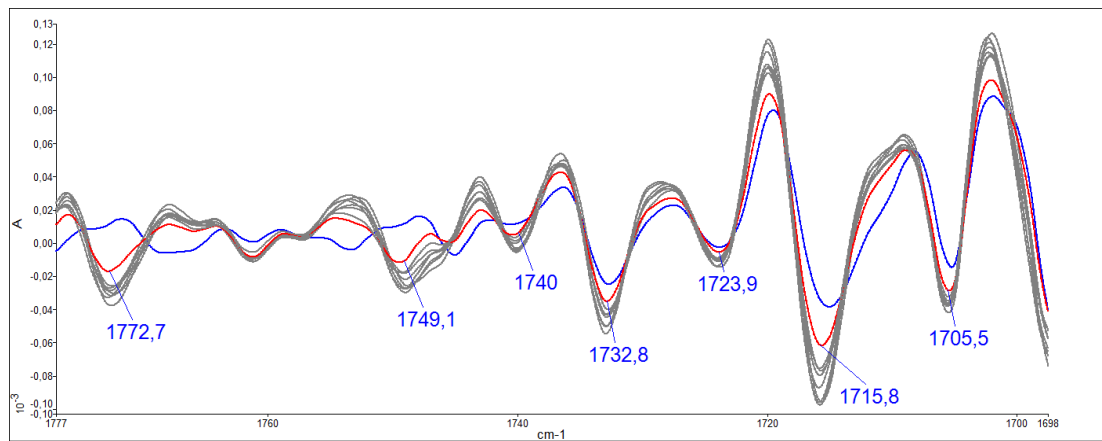
Membran lipidleri (3100-2800 cm⁻¹); Şekil 4.72’de görüldüğü gibi, bu bölgede 12 adet spektral bant değerlendirildi. Metal ilave edilmeyen ve nikel ilave edilen yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarda genel anlamda moleküllerin yapısında değişimlerin olduğu ve miktar bakımından ise azalmaların olduğu belirlendi. Sadece Ni ilave edilen hücrelerde bulunan 3005 cm⁻¹ spektral bant, doymamış yağ asitleri ile ilişkili CH gruplarını temsil etmektedir. Ni iyonlarının etkisi ile hem yabani tip *E. coli* W3110’da hem de porin mutantlarında 2996, 2949, 2938, 2920, 2905 ve 2897 cm⁻¹ spektral bantlarını temsil eden total lipid moleküllerinde önemli miktarda azalma olduğu belirlendi. Bununla birlikte, Ni iyonlarının varlığında belirlenen, 2870 cm⁻¹ (CH₃ simetrik germe) spektral bandını temsil eden moleküllerin miktarı porin mutantlarında azalırken, 2852 cm⁻¹ (Lipitlerin Açıl zincirlerinin CH₂'sinin simetrik gerilme titreşimi) spektral bandını temsil eden moleküllerin ise artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.72).



Şekil 4.72. 3100-2800 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Ni iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Ni iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

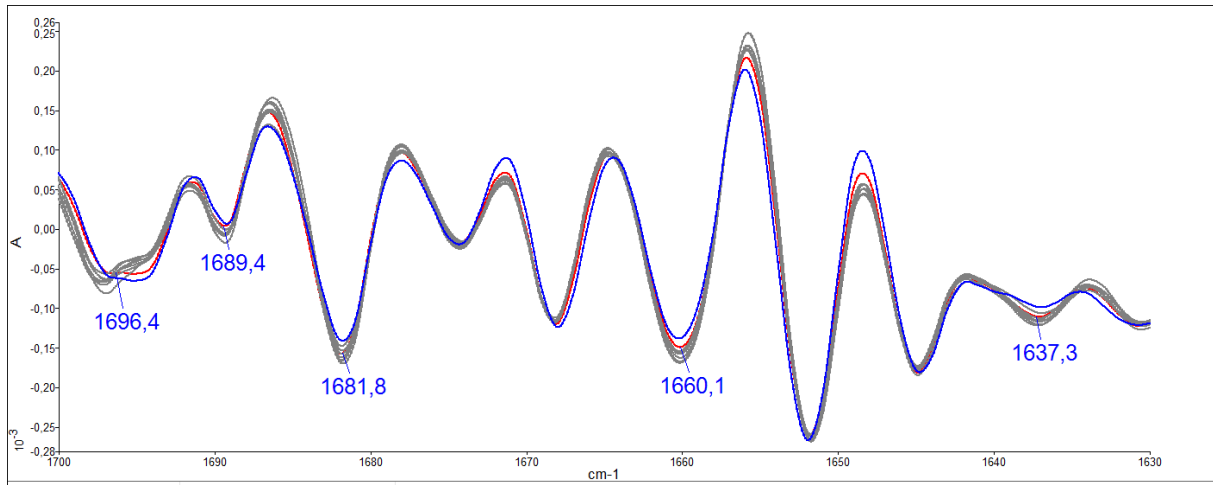
Bakteriyel yağ asitleri (1800-1700 cm^{-1}); Bu bölgede belirlenen 7 spektral bantı temsil eden moleküllerin hem metal stresinden hem de mutant oluşundan kaynaklı yoğunlukları bakımından farklılıklar olduğu bulundu. Genel olarak, Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110'da belirlenen 1773 (Esneme N-H), 1749 (lipitler, yağ asitleri), 1740 (fosfolipitler), 1733 (lipit esterlerinin), 1724 (polyester depolayan bileşikler), 1716 (fosfolipitlerin C=O gerilmesi) ve 1706 cm^{-1} (C=O timin) konumlarındaki moleküllerin yoğunluklarının, metalsiz ortamdakine göre arttığı gözlemlendi. Bu alanda belirlenen artışın, porin genlerinin yokluğunun etkisiyle daha da arttığı tespit edildi (Şekil 4.73).



Şekil 4.73. 1800-1700 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Ni iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Ni iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

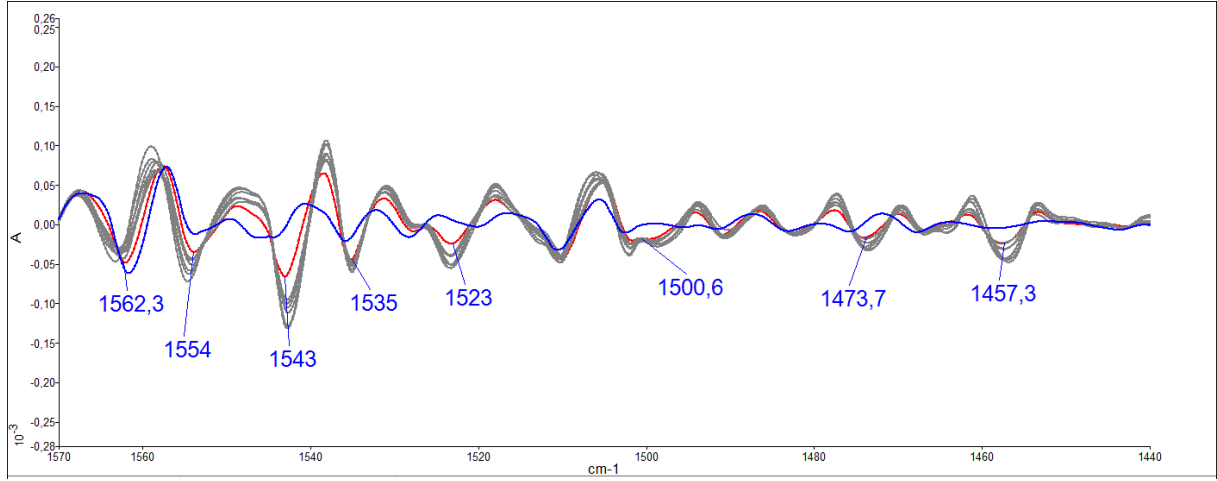
Bakteriyel proteinler Amid I Bölgesi (1700-1600 cm^{-1}); Ni iyonlarının varlığında ve yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110 hücreleri bu alanda benzer spektral bant profili sergiledi. Ni iyonlarının varlığında ise porin mutantları ile yabancı tip *E. coli* W3110 karşılaştırıldığında, 1696 cm^{-1} spektral bandında kayma olduğu ve bu kaymanın, proteinlerin amid I β -tabakalarında meydana gelen yapısal değişimi işaret ettiği belirlendi. Bununla birlikte, Ni iyonlarının etkisi ile porin mutantlarında 1989 (nükleik asitlerin baz-şeker arasındaki bağ), 1682(Adenin), 1660 (amid I bandı) ve 1637 (β -tabaka yapıları) cm^{-1} spektral bantlarını temsil eden moleküllerde artış gözlemlendi (Şekil 4.74).



Şekil 4.74. 1700-1600 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Ni iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Ni iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Ni iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel proteinler Amid II Bölgesi (1600-1400 cm^{-1}); Bu alanda belirlenen 1554 (Amid II α -sarmal yapı), 1543 (Amid II bandı), 1535 ile 1523 (C=C, C=N germe titreşimi), 1501 (Fenil halkalarından düzlem içi CH bükülme titreşimi), 1473 (Lipitlerde metilen zincirlerinin CH₂ bükülmesi) ve 1457 cm^{-1} (proteinlerin ve lipitlerin ve amid gruplarının metil ve metilen gruplarının titreşim) spektral bantların yoğunlukları nikel iyonlarının etkisi ile hem yabancı tip *E. coli* W3110'da hem de porin mutantlarında artarken, yalnızca 1562 cm^{-1} 'deki bandını gösteren ve aromatik halkalardan uzanan C-C yapılarının azaldığı tespit edildi. Ni iyonları varlığında yabancı tip *E. coli* W3110'da görülen bantlardaki bu değişimin, porinlerin mutant olduğu durumlarda daha da arttığı belirlendi (Şekil 4.75).

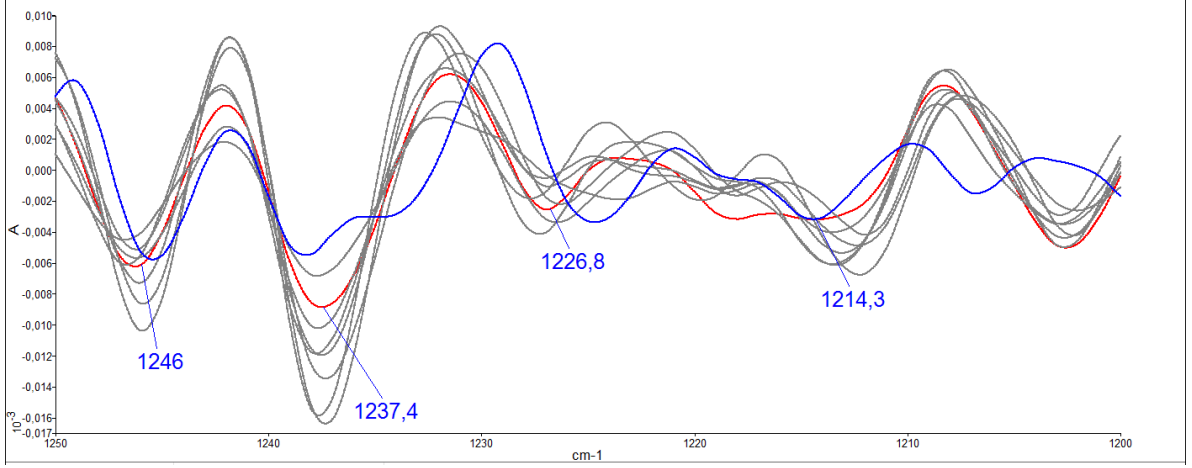


Şekil 4.75. 1600-1400 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Ni iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Ni iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

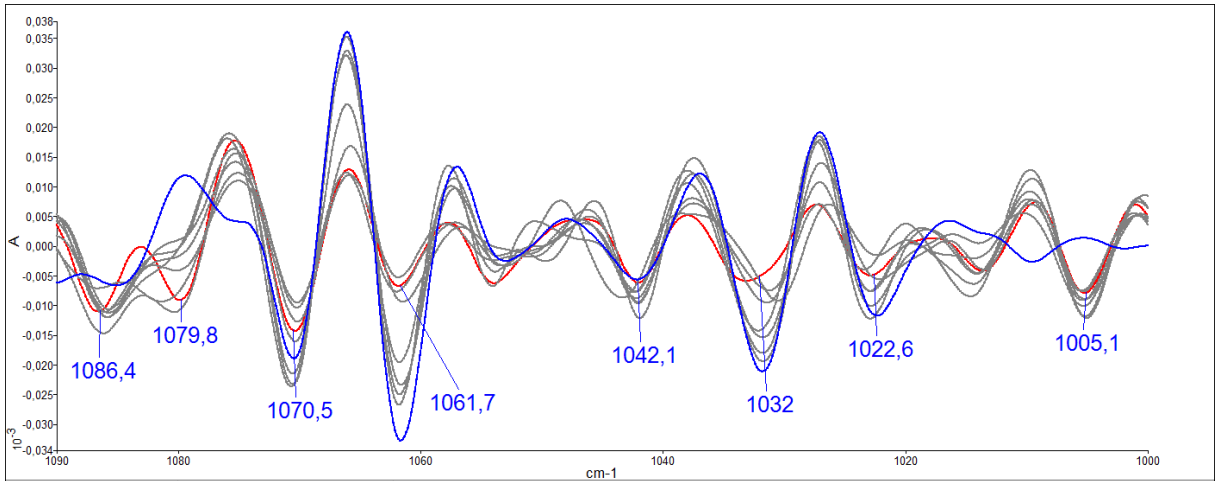
Nükleik asit bölgesi (1250-1200 cm^{-1}); Yabani tip *E. coli* W3110'da nikel iyonları varlığında, farklı DNA formlarını temsil eden bantlarda kaymalar meydana geldiği gözlemlendi. Nikel iyonlarına maruz kalan yabani tip *E. coli* W3110'da metale maruz kalmayan yabani tip *E. coli* W3110'a göre 1214 cm^{-1} (DNA'nın Z formu) spektral bandını gösteren moleküllerde değişim gözlenmezken, 1246 (gerilen PO_2^- simetrik titreşim, Fosfat I) ve 1237 cm^{-1} (PO_2^- anti simetrik esneyen, DNA'nın A formu) spektral bandını gösteren moleküllerde artış, 1227 cm^{-1} (DNA ve RNA'daki fosfodiester bağlantılarının fosfat gruplarının asimetrik gerilmesi) bandı simgeleyen moleküllerde ise azalış tespit edildi. Nikel iyonlarına maruz kalan yabani tip *E. coli* W3110'a göre, porin mutantlarında 1246 ve 1214 cm^{-1} spektral bantlarını gösteren moleküllerde daha fazla artış görülürken, 1237 ve 1226 cm^{-1} spektral bantlarını gösteren moleküllerde ise daha fazla azalma olduğu görüldü (Şekil 4.76).

Bakteriyel Polisakkaritler (1100-1000 cm^{-1}); Bu bölgede, metal bulunmayan ortamda büyütülen yabani tip *E. coli* W3110'da bulunmayan, ama nikel ilavesi ile ortaya çıkan, 1079 (Selüloz), 1086 ve 1005 cm^{-1} (arabinoz)'de konumlanan 3 farklı spektral bant tespit edildi. Ni iyonlarının varlığında, yabani tip *E. coli* W3110'a göre, porin mutantlarında 1079 cm^{-1} bant ile temsil edilen selüloz moleküllerinin azaldığı, 1086 ve 1005 cm^{-1} bantlarının temsil ettiği arabinoz moleküllerinin ise arttığı bulundu (Şekil 4.77). Ni metaline maruz kalmayan ve kalan yabani tip *E. coli* W3110 hücreleri karşılaştırıldığında ise, 1071 (Mannoz ve mannoz-6-fosfat), 1061(C-O germe), 1032 (kolajen) ve 1023 cm^{-1} (Glikojen) bantlarını gösteren moleküllerde azalma gözlemlendi (Şekil 4.77).



Şekil 4.76. 1250-1200 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Ni iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Ni iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları



Şekil 4.77. 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Ni iyonlarının yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Ni iyonlarının varlığında yabani tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Ni iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

4.1.7. Çinko (Zn) stresi

4.1.7.1. Zn metalinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimal sidal konsantrasyon (MSK) değerleri

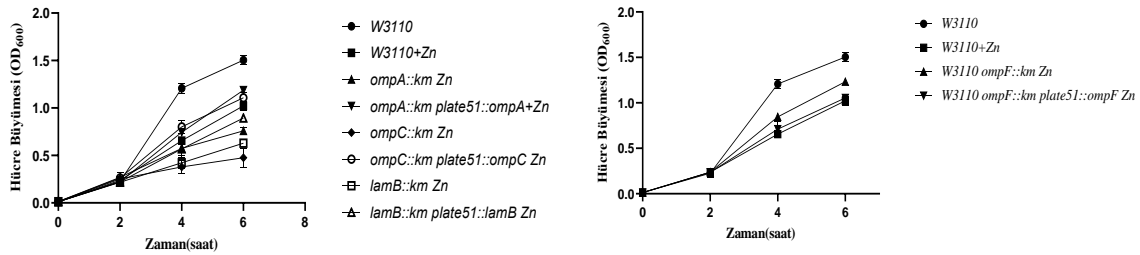
Yabani tip *E. coli* W3110'da Zn metali ile elde edilen MİK değerine (539,16 µg/ml) göre, *ompT* ve *phoE* mutant suşları hariç *ompA* (359,44 µg/ml), *ompC* (269,58 µg/ml), *ompF* (359,44 µg/ml), *ompG* (269,58 µg/ml) ve *lamB* (269,58 µg/ml) genleri nakavt edilmiş suşlarının çinko metaline daha duyarlı olduğu belirlendi (Tablo 4.5). Çinko metalinin MSK değerleri karşılaştırıldığında ise *ompG* (1078,31 µg/ml) ve *phoE* (1078,31 µg/ml) mutant hücrelerinin yabani tip *E. coli* W3110'a göre daha dirençli olduğu belirlendi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *E. coli* W3110, porin mutantlarının ve bu mutantların komplement hücrelerinin üzerine çinko metalinin MİK ve MSK değerleri

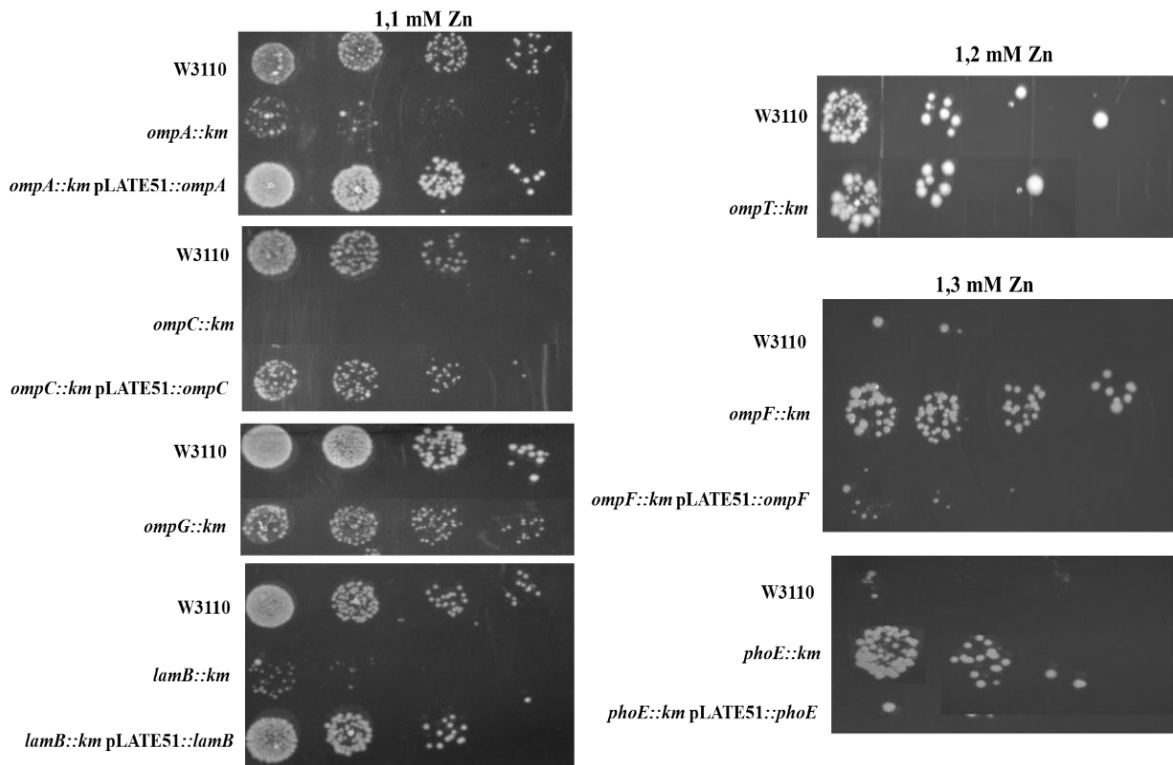
	Suşlar	MİK (µg/ml)	MSK (µg/ml)
	ZnSO₄*7H₂O	W3110	539,16
<i>ompA::km</i>		359,44	539,16
<i>ompA::km</i> pLATE51:: <i>ompA</i>		539,16	539,16
<i>ompC::km</i>		269,58	539,16
<i>ompC::km</i> pLATE51:: <i>ompC</i>		539,16	539,16
<i>ompF::km</i>		359,44	539,16
<i>ompF::km</i> pLATE51:: <i>ompF</i>		539,16	539,16
<i>ompG::km</i>		269,58	1078,31
<i>ompG::km</i> pLATE51:: <i>ompG</i>		539,16	539,16
<i>ompT::km</i>		539,16	539,16
<i>ompT::km</i> pLATE51:: <i>ompT</i>		539,16	539,16
<i>lamB::km</i>		269,58	539,16
<i>lamB::km</i> pLATE51:: <i>lamB</i>		539,16	539,16
<i>phoE::km</i>		539,16	1078,31
<i>phoE::km</i> pLATE51:: <i>phoE</i>		539,16	539,16

4.1.7.2. Çinko metalinin büyüme üzerine etkisi

Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin geni bakımında mutant hücrelerin, çinko metalinin varlığında gerçekleştirilen büyüme deneyleri sonuçlarına göre, *ompA* ve *ompC* genlerinin yokluğunda suşların çinko iyonlarına daha duyarlı, *ompF* geninin yokluğunda ise daha dirençli olduğu belirlendi (Şekil 4.78). Farklı konsantrasyonlarda çinko ilave edilerek uygulanan petri yaşam deneylerine göre, *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant suşlarının daha yavaş çoğalması ve *ompF* geni nakavt edilmiş suşun ise yabani tip *E. coli* W3110'a göre daha fazla çoğalması metali büyüme deneylerindeki sonuçları desteklemektedir. (Şekil 4.79).



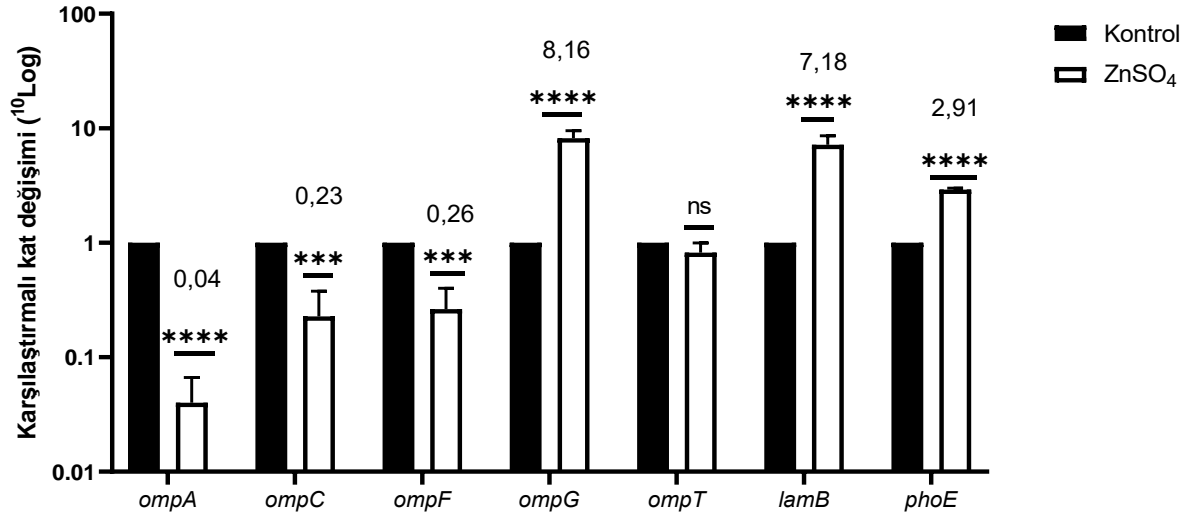
Şekil 4.78. Yabani tip *E. coli* W3110, *ompA*, *ompC*, *ompF* ve *lamB* mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Zn metalinin varlığında büyüme grafiği



Şekil 4.79. Yabani tip *E. coli* W3110, porin mutant suşların ve bu mutantların komplement hücrelerinin Zn metalinin varlığında petride yaşam deneyi

4.1.7.3. Zn metali varlığında metali varlığında porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyesi

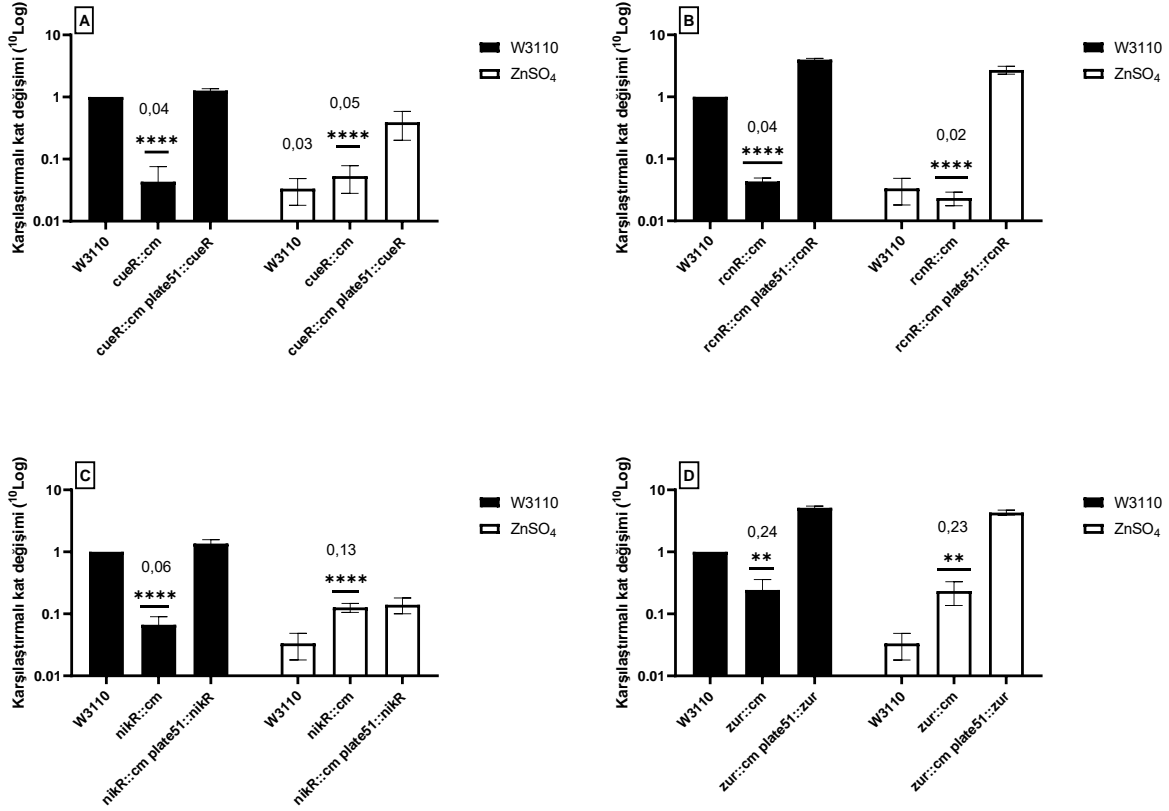
Çalışmada çinko iyonlarının porin genleri ifadesi üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için çinko varlığında ve yokluğunda büyütülen yabancı tip *E. coli* W3110'daki porin genlerinin transkripsiyonel sentez seviyeleri gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. Şekil 4.80'de görüldüğü gibi, *ompT* hariç bütün porin genlerinin Zn varlığındaki değişimleri istatistiksel olarak önemli bulundu. Çinko iyonlarına maruz kalmayan (kontrol) yabancı tip *E. coli* W3110 (1,0) ile karşılaştırıldığında, çinko iyonlarına maruz kalan yabancı tip *E. coli* W3110'daki *ompA* (0,04), *ompC* (0,23), ve *ompF* (0,26) genlerinin sentezinin azaldığı, *ompG* (8,16), *lamB* (7,18) ve *phoE* (2,91) genlerinin sentezinin ise önemli derecede artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.80).



Şekil 4.80. Çinko stresine maruz kalan ve kalmayan (kontrol) yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde porin genlerinin sentez seviyesi

4.1.7.3.1. *ompA* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Ortama ilave edilen çinkonun etkisi ile yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde en fazla azalan genin *ompA* (1,0'dan 0,04'e) olduğu belirlendi. Bu azalma, *cueR* (0,05) ve *rcnR* (0,02) nakavt edilmiş hücrelerde görülmezken, *nikR* (0,13) ve *zur* (0,23) mutantlarında artış görüldü (Şekil 4.81). Yabancı tip *E. coli* W3110'da çinko iyonları varlığında *ompA* geninin sentezinde meydana gelen 25 kat azalmada, *CueR* ve *RcnR* proteinlerinin rolü bulunmazken, *NikR* ve *Zur* proteinlerinin önemli rolü olduğu belirlendi.

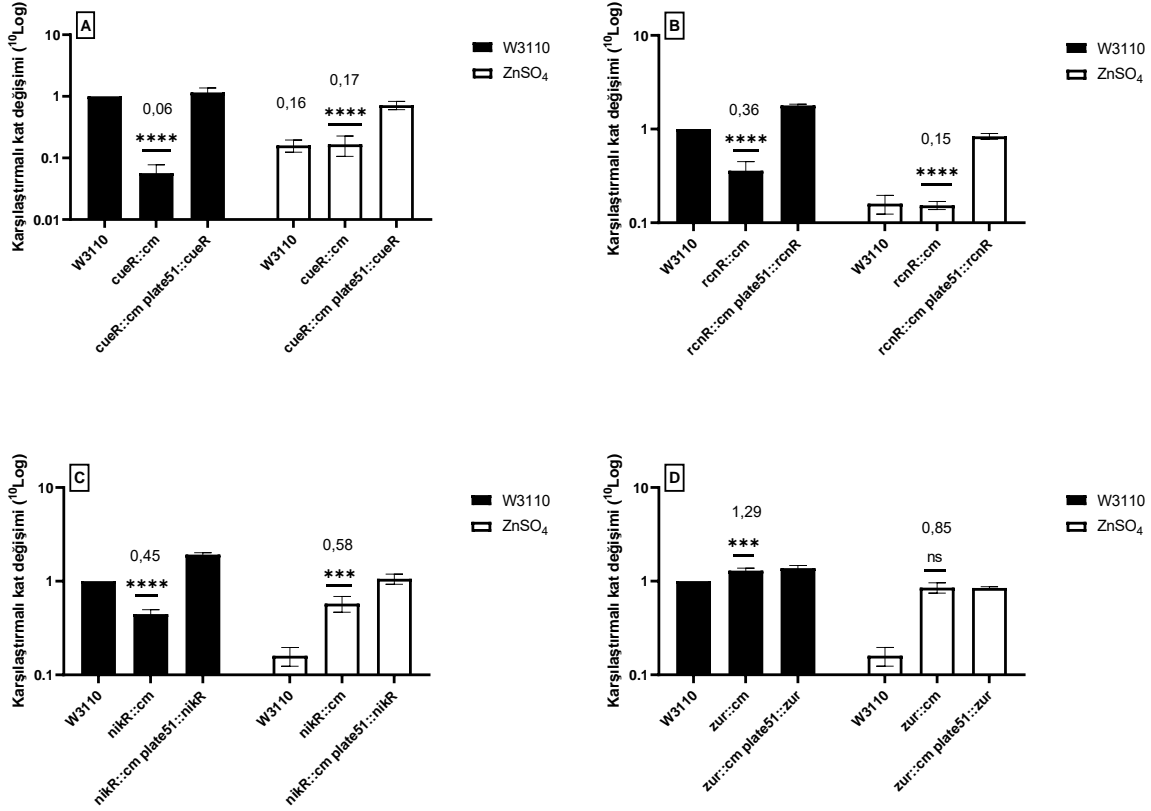


Şekil 4.81. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompA* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm pLATE51::cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm pLATE51::rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm pLATE51::nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm pLATE51::zur*)

4.1.7.3.2. *ompC* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da metelsiz ortama çinko iyonlarının ilavesi ile *ompC* geninin sentezinin **~4,5 kat (0,23)** azaldığı belirlendi. Bu azalmayı kontrol eden proteini bulmak için elde edilen *cueR* (0,17) ve *rcnR* (0,15) mutant hücrelerinde çinkonun ilavesi *ompC*'nin ifadesini değiştirmediği, *nikR* (0,58) ve *zur* (0,85) mutantlarında ise ifadenin arttığı tespit edildi (Şekil 4.82). Bu sonuçlara göre, çinko varlığında, *ompC*'nin ifadesi üzerinde *CueR* ve *RcnR* proteinlerinin rolünün bulunmadığı, *NikR* ve *Zur* proteinlerinin ise önemli bir rolü olduğu söylenebilir.

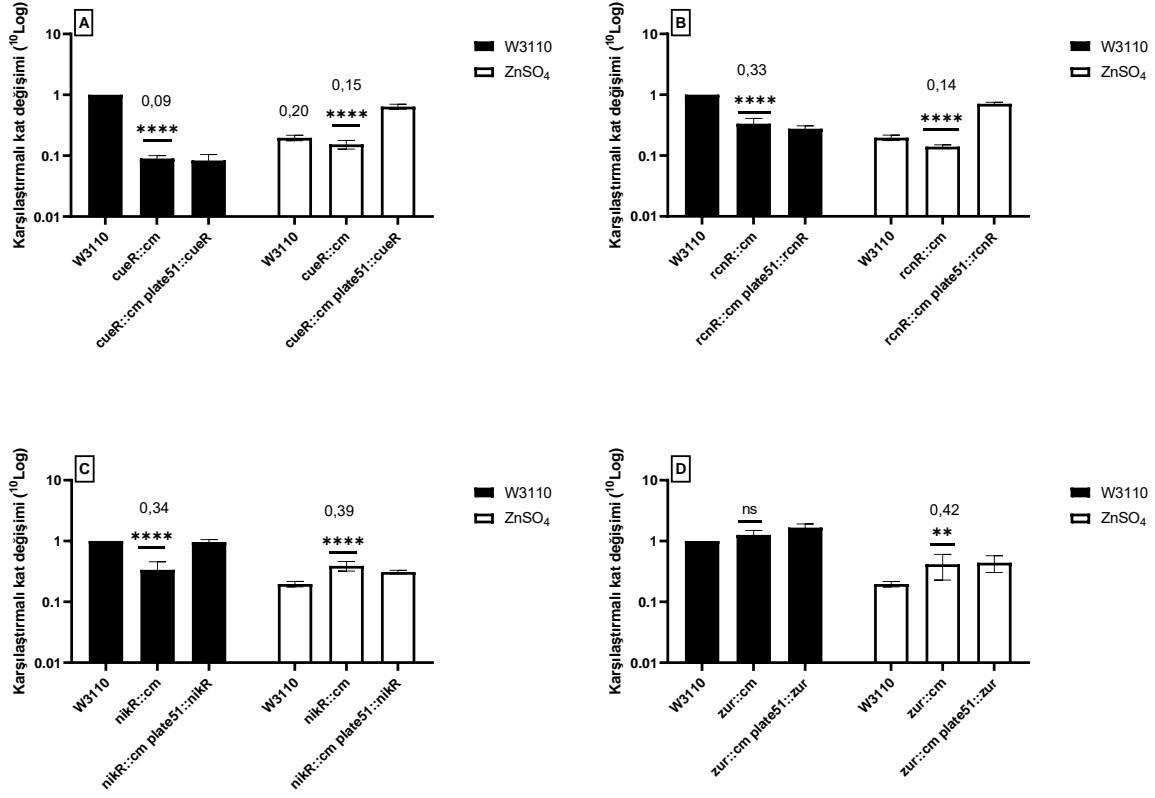


Şekil 4.82. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompC* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.7.3.3. *ompF* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da metelsiz ortamda sentezlenen *ompF*'nin (1,0) miktarına göre, çinko eklenen ortamdaki *ompF*'nin (0,20) önemli derecede azaldığı tespit edildi. Yabani tip *E. coli* W3110'da çinko iyonu ilavesi ile sentezlenen *ompF* miktarı ile, *cueR* (0,15), *rcnR* (0,14), *nikR* (0,39) ve *zur* (0,42) genlerinin olmadığı durumda sentezlenen *ompF* miktarları karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.83). Bu durum, çinko varlığında *ompF* ifadesinin azalmasından, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinden farklı bir düzenleyici proteinin sorumlu olduğunu gösterir.

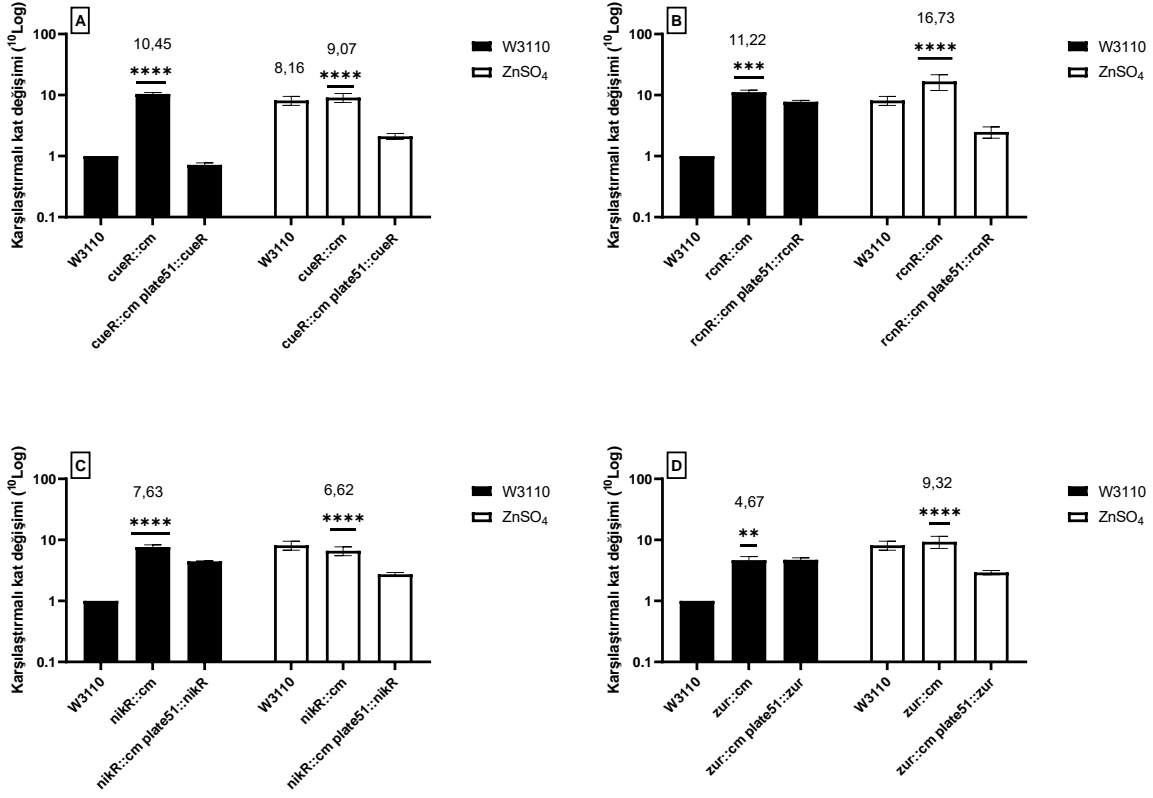


Şekil 4.83. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompF* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri.

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.7.3.4. *ompG* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da, çinko metali varlığında en fazla artış gösteren porin *ompG* (8,16)'dir. Mutant hücrelerde, çinko iyonları varlığında ve yokluğunda sentezlenen *ompG* miktarı karşılaştırıldığında, metal içermeyen ortamda sentezlenen *ompG* miktarı, yabani tip *E. coli* W3110'a göre önemli ölçüde artış gösterirken, bu artış, ortama çinko ilave edildiğinde görülmedi. Çinko varlığında sentezlenen *ompG* miktarı, *cueR*'de 9,07, *rcnR*'de 16,73, *nikR*'de 6,62 ve *zur*'da ise 9,32 olarak belirlendi (Şekil 4.84). Böylece, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin çinko metalinden bağımsız olarak *ompG*'nin sentezini baskılamakla görevli olduğu, ancak bu proteinlerin çinko varlığında bir rolleri olmadığı ortaya koyuldu.

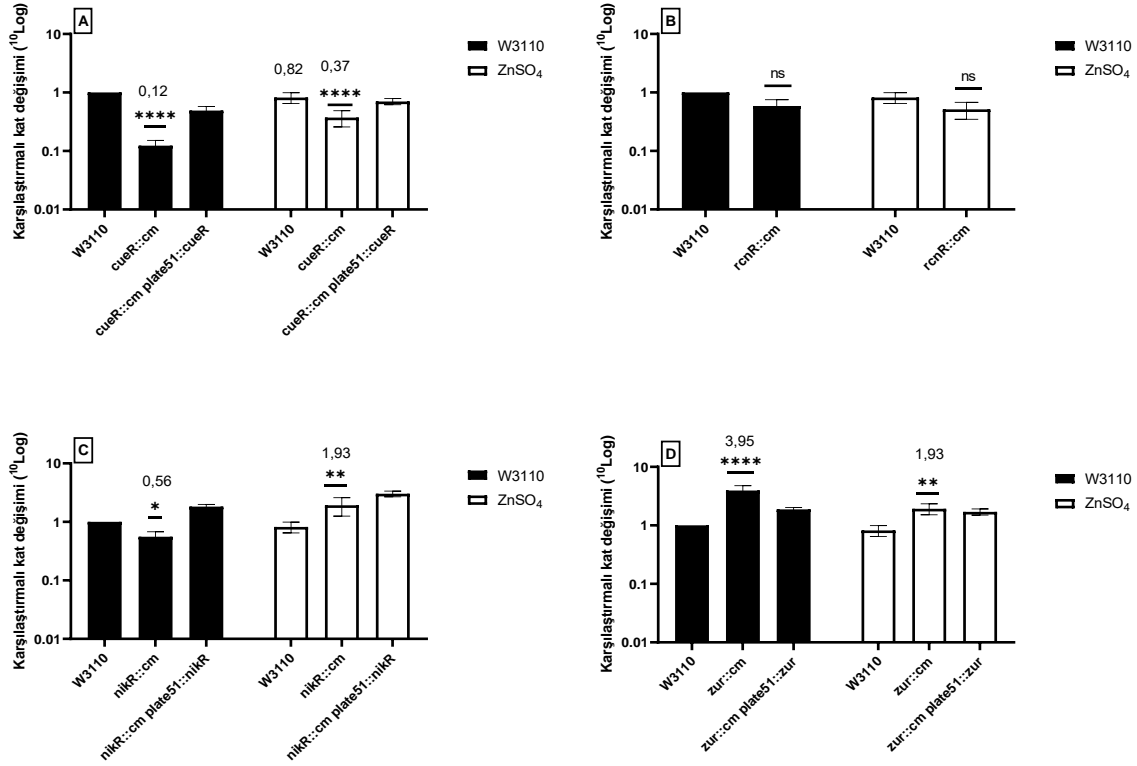


Şekil 4.84. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompG* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.7.3.5. *ompT* geninin sentezinde CueR, RcnR, NikR ve Zur'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da *ompT* geninin sentezi (0,82), çinko iyonlarının ilave edilmesi sonucunda anlamlı bir değişim göstermedi. *rcnR* nakavt edilmiş hücrede hem çinko iyonları varlığında hem de yokluğundaki *ompT* geninin sentezinin, yabani tip *E. coli* W3110'a benzer olduğu belirlendi. Böylece *ompT*'nin ifadesi üzerinde, RcnR proteinin herhangi bir rolü olmadığı belirlendi. Çinko ilave edilen ortamda ifade edilen *ompT* genine bakıldığında, *cueR* (0,37) mutantında azalma, *nikR* (1,93) ve *zur* (1,93) mutantlarında ise artış tespit edildi. Ancak, çinko varlığında belirlenen *cueR* ve *zur* mutantlarındaki *ompT*'nin ifadesindeki değişimin, metal içermeyen durumda da görülmesi, bu proteinlerin *ompT* üzerindeki rolünün metalden bağımsız olduğunu gösterir. *nikR* mutantındaki sonuçlara göre, çinko varlığında *ompT* ifadesinin artış göstermesi, NikR proteinin çinko varlığında görülen *ompT*'nin kısmen baskılanmasından sorumlu olduğunu gösterir.

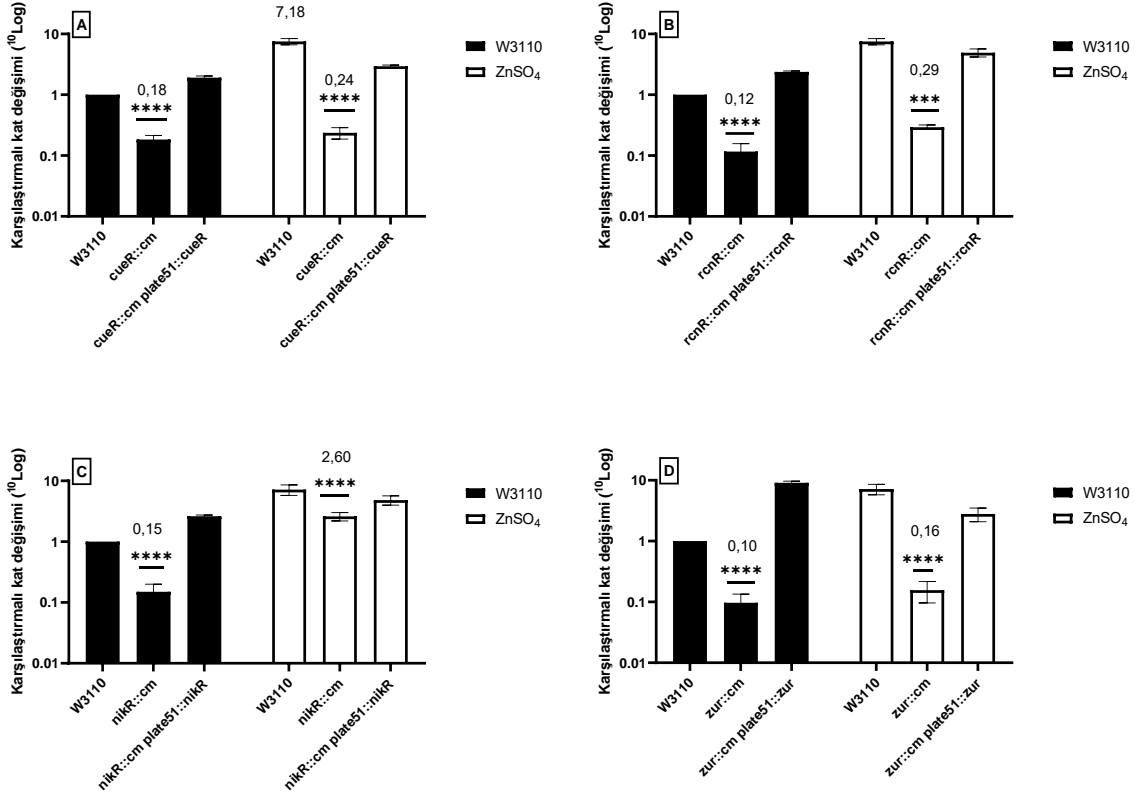


Şekil 4.85. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *ompT* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR*::cm ve onun komplement hücresi *cueR*::cm pLATE51::*cueR* B: *rcnR*::cm ve onun komplement hücresi *rcnR*::cm pLATE51::*rcnR* C: *nikR*::cm ve onun komplement hücresi *nikR*::cm pLATE51::*nikR* D: *zur*::cm ve onun komplement hücresi *zur*::cm pLATE51::*zur*)

4.1.7.3.6. *lamB* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da *lamB* geni çinko varlığında ~7 kat (7,18) artış göstermiştir. Yabani tip *E. coli* W3110'da meydana gelen *lamB* geninin sentezindeki bu artışın, *cueR* (0,24), *rcnR* (0,29), *nikR* (2,60) ve *zur* (0,16) nakavt suşlarda önemli oranda düştüğü tespit edildi. Benzer durum, mutant suşlarda çinko yokluğunda belirlenen *lamB* ifadesinde de görüldü (Şekil 4.86). Bu sonuçlara göre, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin, *lamB* geninin sentezinden metalden bağımsız olarak sorumlu olduğu ve çinko varlığında farklı bir düzenleyici tarafından ifadesinin arttırıldığı söylenebilir.

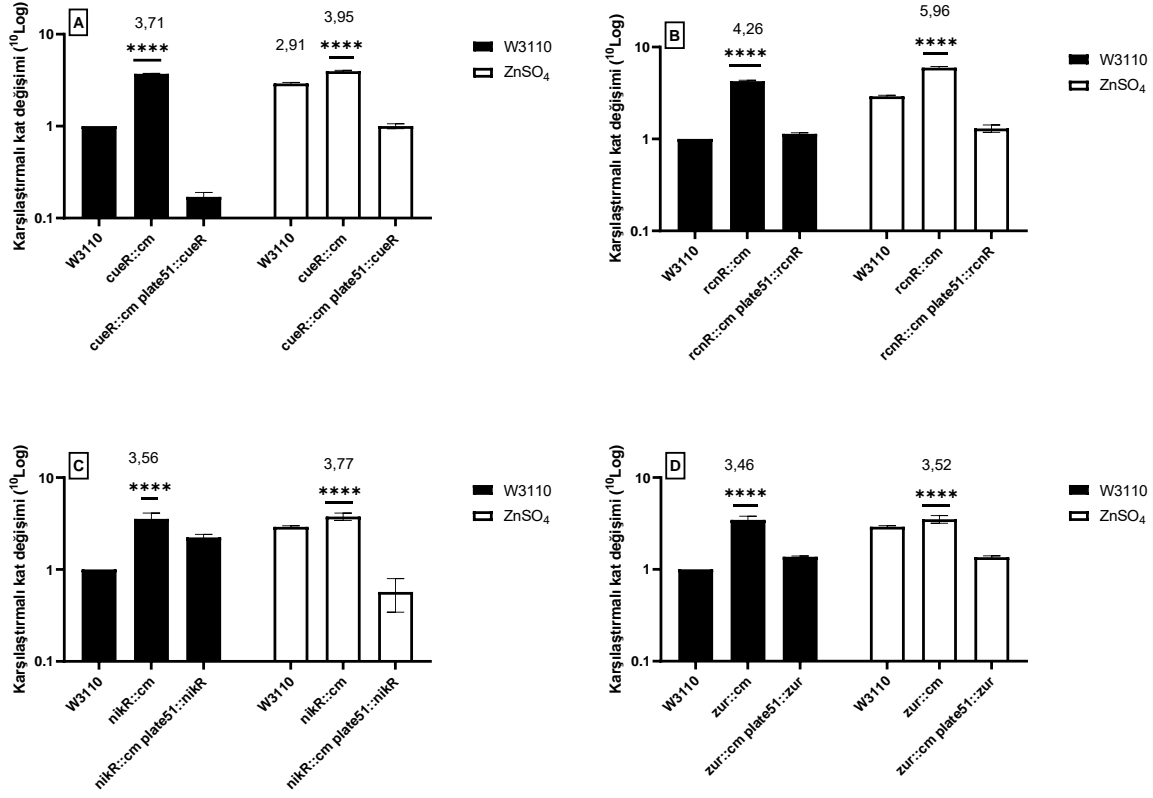


Şekil 4.86. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *lamB* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(**A:** *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* **B:** *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* **C:** *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* **D:** *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

4.1.7.3.7. *phoE* geninin sentezinde *CueR*, *RcnR*, *NikR* ve *Zur*'un rolü

Yabani tip *E. coli* W3110'da metalsiz ortamda *phoE* geninin sentezinin (1,0), çinko metali ilavesi ile **2,91'e** kadar arttığı görüldü. Çinko ilavesi sonucunda, yabani tip *E. coli* W3110'da belirlenen *phoE*'nin ~3 katlık artışı, *cueR* (**3,95**), *nikR* (**3,77**) ve *zur* (**3,52**) mutantlarında gözlenmezken, yalnızca *rcnR* mutantında ~2 kat (**5,96**) artışın olduğu belirlendi (Şekil 4.87). Ancak, çinko iyonları varlığında *phoE*'nin ifadesindeki bu artışın metalsiz ortamda da görülmesi, RcnR proteininin *phoE* üzerindeki rolünün çinko metalinden bağımsız olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, *cueR*, *nikR* ve *zur* genlerinin yokluğunda, çinko ilavesi ile *phoE*'nin ifadesinde yabani tip *E. coli* W3110'a göre anlamlı bir değişim olmaması, *phoE* geninin sentezini arttırmada farklı bir düzenleyici proteinin sorumlu olduğunu gösterdi.



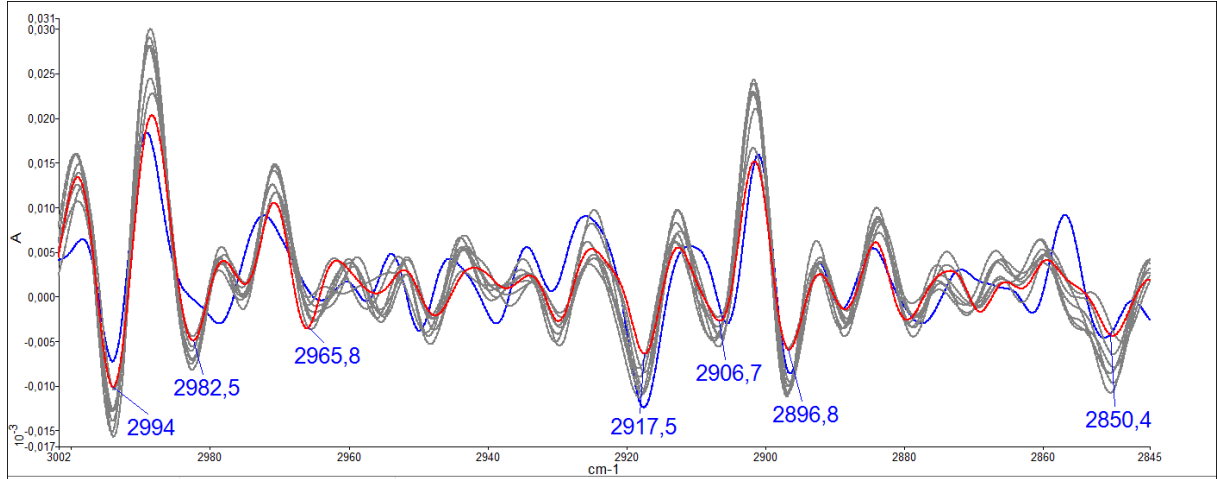
Şekil 4.87. Zn iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarında *phoE* geninin transkripsiyonel sentez seviyeleri

(A: *cueR::cm* ve onun komplement hücresi *cueR::cm* pLATE51::*cueR* B: *rcnR::cm* ve onun komplement hücresi *rcnR::cm* pLATE51::*rcnR* C: *nikR::cm* ve onun komplement hücresi *nikR::cm* pLATE51::*nikR* D: *zur::cm* ve onun komplement hücresi *zur::cm* pLATE51::*zur*)

4.1.7.4. Zn metalinin porin mutantlarında (*ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE*) meydana getirdiği biyomoleküler değişiklikler

Membran lipidleri (3100-2800 cm⁻¹); Çinko metalinin bu bölgede meydana getirdiği bant profilleri karşılaştırıldığında, belirgin farklılık gösteren 7 spektral bant belirlendi. Çinko iyonu varlığında ve yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110'da oluşan bantların analizi yapıldığında, 2907 (tek bağ NH₃⁺ etkileşimlerine) ve 2850 cm⁻¹ (C H germe bantları) spektral bantlarını simgeleyen moleküllerin miktarlarının benzer olduğu, ancak çinko metaline maruz kalan porin mutantlarında ise artma olduğu tespit edildi. Yabani tip *E. coli* W3110'un metale maruz bırakılmayan hücrelere göre, çinko metaline maruz kalmış yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinde, 2897 (C-H Esname) ve 2917 cm⁻¹ (kolesterol ester) spektral bantlarını tanımlayan moleküllerin miktarı azalsa da porin mutantlarında moleküllerin miktarları tekrardan artmaktadır. 2994 (CH germe) ve 2982 cm⁻¹ (CH grupları) spektral bantlarını

temsil eden moleküllerin, Cd iyonlarının varlığında belirlendiği gibi Zn iyonlarının etkisine bağlı olarak miktarlarının arttığı tespit edildi. Bu artış, porin mutantlarında daha fazladır. 2965 cm^{-1} spektral bandını simgeleyen yağ asitlerinin miktarı, çinko iyonlarının etkisi ile yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde artış göstermiş olmasına rağmen, çinko metali maruz kalan porin mutantlarında tekrardan azalış gözlemlendi (Şekil 4.88).



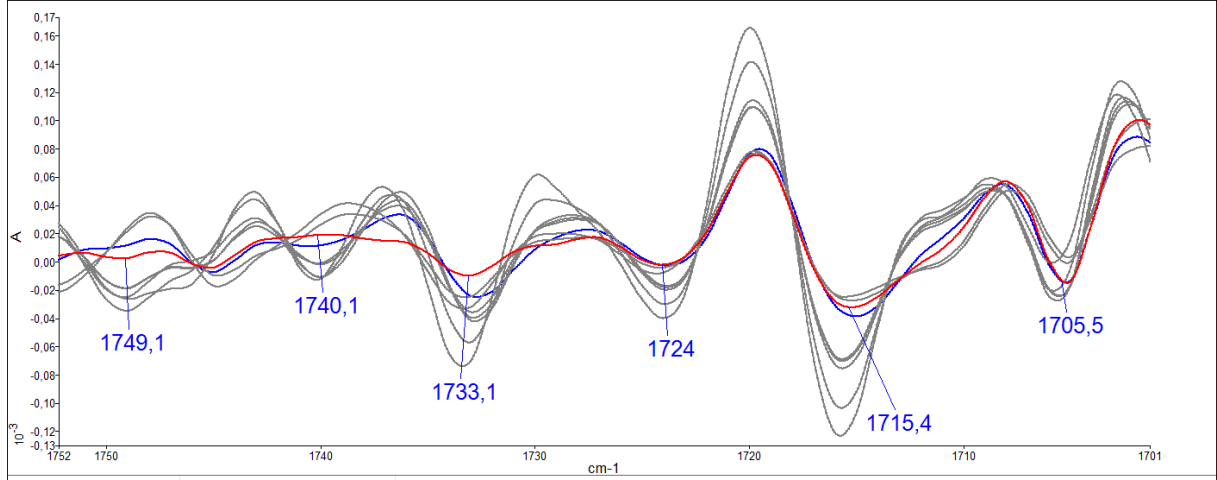
Şekil 4.88. 3100-2800 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Zn iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Zn iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel yağ asitleri (1800-1700 cm^{-1}); Yabancı tip *E. coli* W3110'da bu bölgede belirlenen 1733 cm^{-1} (lipit esterlerinin) bandının haricindeki 1749 (lipitler, yağ asitleri), 1740 (fosfolipitler), 1724 (polyester depolayan bileşikler), 1715 (fosfolipitlerin C=O gerilmesi) ve 1706 cm^{-1} (C=O timin) spektral bantlarının üzerinde çinko iyonlarının etkisi bulunmadı. Çinko iyonlarının etkisiyle yabancı tip *E. coli* W3110'da azalış gösteren lipit esterlerinin, porinlerin mutant olması durumunda artış gösterdiği belirlendi. Ayrıca, çinko iyonları varlığında porin gen mutantlarında, yabancı tip *E. coli* W3110'a göre, fosfolipit ve yağ asitlerini temsil eden moleküllerin yoğunluğunun belirgin şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.89).

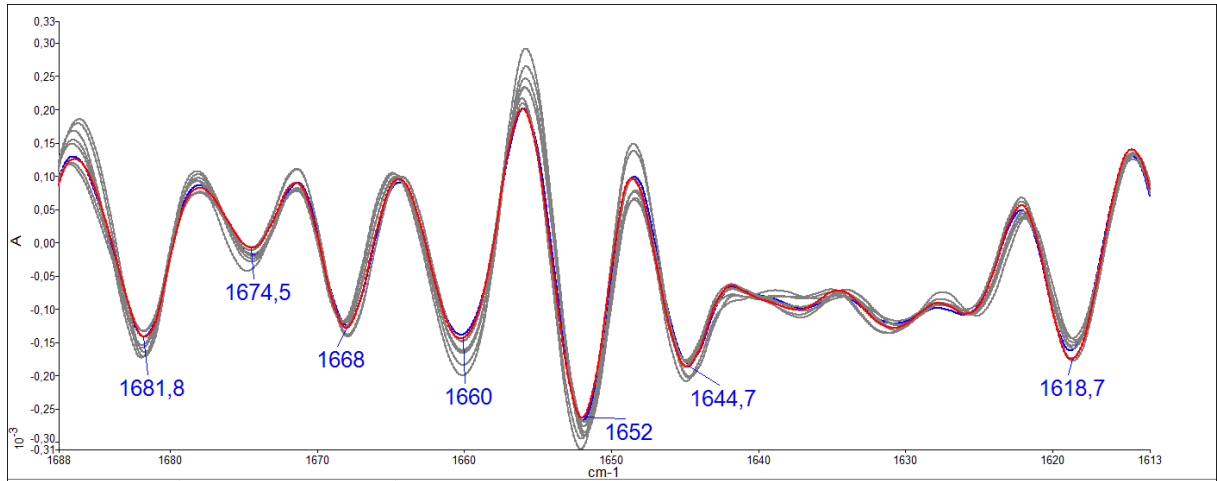
Bakteriyel proteinler Amid I Bölgesi (1700-1600 cm^{-1}); Yabancı tip *E. coli* W3110 hücrelerinde belirlenen bu alandaki 1682 (Adenin), 1675 (karbonil grupları), 1668 (Proteinlerin amid I β -tabakaları), 1645, 1660 ile 1652 (amid I bandı) ve 1619 cm^{-1} (Fenil halkasının C-C gerilmesi) spektral bantlarını simgeleyen moleküllerde çinko iyonlarının bir etkisi belirlenmedi. Çinko metali varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ile karşılaştırılan porin

mutantlarında sadece 1619 cm^{-1} spektral bant ile temsil edilen β -tabakaları arası H-bağlarının miktarında azalma bulundu (Şekil 4.90).



Şekil 4.89. $1800\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Zn iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Zn iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

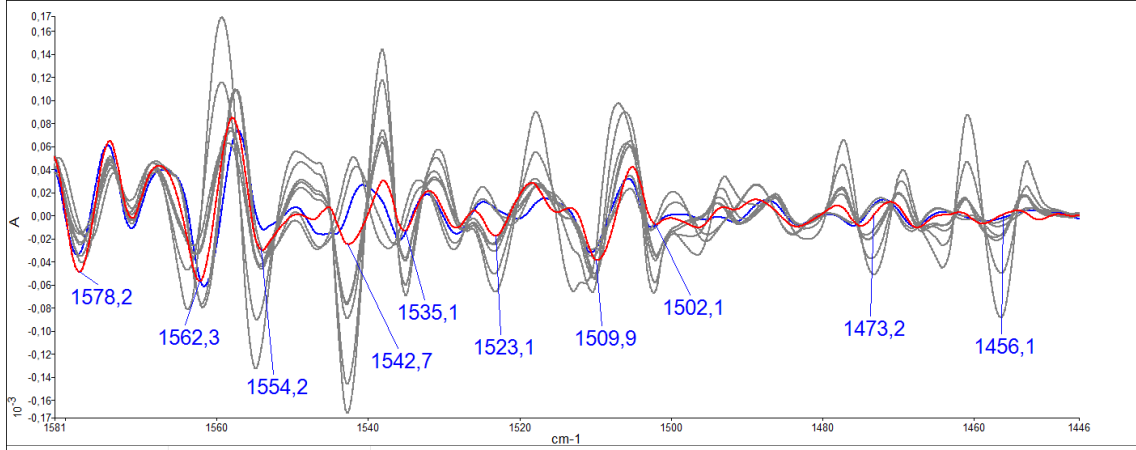


Şekil 4.90. $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Zn iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Zn iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel proteinler Amid II Bölgesi ($1600\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$); Yabancı tip *E. coli* W3110'da, çinko varlığında ve yokluğunda belirlenen spektral bantları temsil eden moleküllerin yoğunluklarının genel olarak değişmediği görüldü. Çinko iyonları varlığında, porinlerin mutant olmasının etkisine bakıldığında ise, sadece 1578 (Fenil halkasının C-C

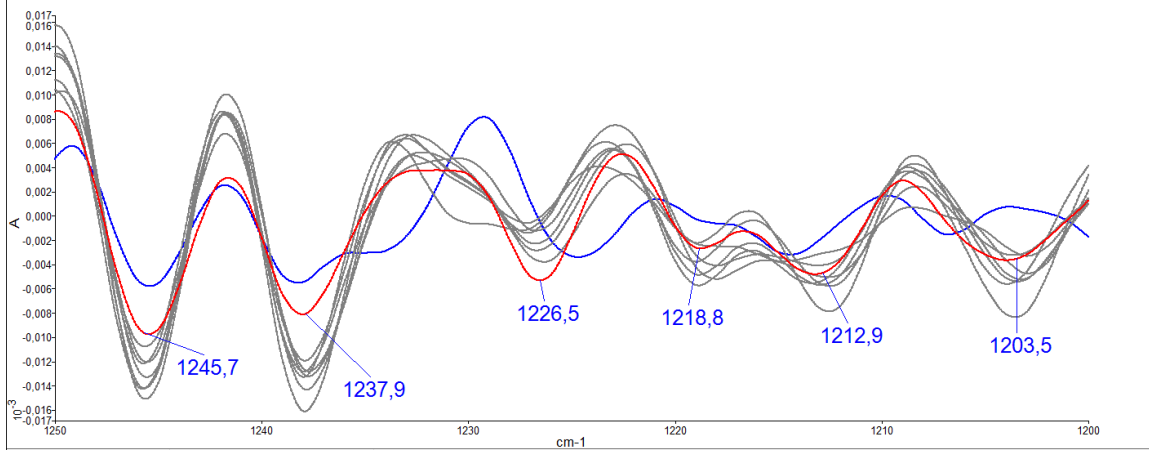
gerilmesi) ve 1562 cm^{-1} (aromatik halkalardan uzanan C-C) spektral bantlarını temsil eden moleküllerde azalma, 1554 (Amid II α -sarmal yapı), 1542 (Amid II bandı), 1535 ile 1523 (C=C, C=N germe titreşimi), 1510 (Fenil halkalarının CH bükülme titreşimi), 1502 (Fenil halkalarının CH bükülme titreşimi), 1473 (Lipitlerde metilen zincirlerinin CH_2 bükülmesi) ve 1456 cm^{-1} (proteinlerin ve lipitlerin ve amid gruplarının metil ve metilen gruplarının titreşim) spektral bantlarını gösteren moleküllerde ise artış tespit edildi (Şekil 4.91).



Şekil 4.91. $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Zn iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Zn iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

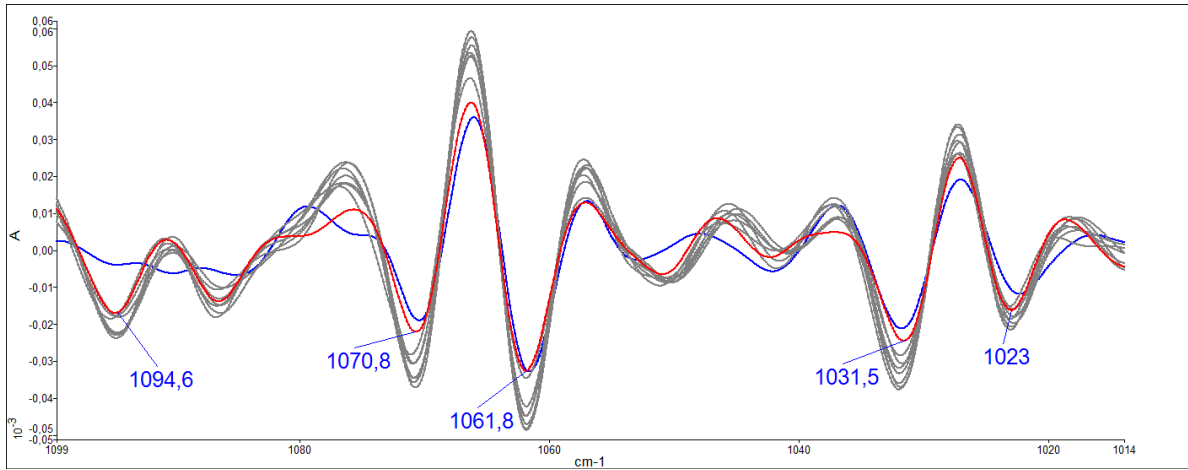
Nükleik asit bölgesi ($1250\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$); Çinko iyonlarının etkisi ile yabancı tip *E. coli* W3110'da belirlenen spektral bant profilinde nikel iyonlarına benzer bir durum görüldü. Çinko iyonlarının etkisi ile, PO_2^- asimetric (Fosfat I) molekülünü temsil eden, 1218 cm^{-1} konumunda ve ayrıca, polisakaritlerdeki C-O-P, P-O-P'nin halka titreşimlerini temsil eden 1203 cm^{-1} konumunda, fazladan iki spektral bant belirlendi. Çinko ilavesi ile elde edilen bu ekstra bantları gösteren moleküllerin miktarının porin mutantlarında önemli şekilde arttığı gözlemlendi. Yabancı tip *E. coli* W3110'da çinko iyonlarının etkisi ile oluşan bütün spektral bantları temsil eden moleküllerde artış belirlendi. Ancak çinko iyonları varlığında belirlenen bu artış, porinlerin mutant olduğu durumda, 1246 (gerilen PO_2^- simetric titreşim, Fosfat I), 1238 (PO_2^- anti simetric esneyen, DNA'nın A formu), 1219 (PO_2^- asimetric (Fosfat I)), 1213 (DNA'nın Z formu) ve 1204 cm^{-1} (polisakaritlerdeki C-O-P, P-O-P'nin halka titreşimlerini) konumundaki bantlarını temsil eden moleküllerde daha fazla artışa neden olurken, 1227 cm^{-1} (DNA ve RNA'daki fosfodiester bağlantılarının fosfat gruplarının asimetric gerilmesi) konumundaki moleküllerde ise önemli miktarda azalışa sebep olduğu gözlemlendi (Şekil 4.92).



Şekil 4.92. 1250-1200 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Zn iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Zn iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

Bakteriyel Polisakkaritler (1100-1000 cm^{-1}); Metale maruz kalmayan yabancı tip *E. coli* W3110'da bulunmayan ama Cd metali varlığında belirlenen 1094 cm^{-1} spektral bandı temsil eden selüloz molekülerinin, hem *E. coli* W3110'da hem de porin mutantlarında arttığı tespit edildi. Belirlenen 1071 (Mannoz ve mannoz-6-fosfat), 1062 (C-O germe) ve 1023 cm^{-1} (Glikojen) spektral bantlarını temsil eden moleküllerin miktarının, çinko iyonlarının etkisi ile hem yabancı tip *E. coli* W3110'da hem de porin mutantlarında arttığı belirlendi (Şekil 4.93).



Şekil 4.93. 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki spektral bantlar için, Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının ortalama ikinci türev spektrumları.

Mavi çizgi: Zn iyonlarının yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110. Kırmızı çizgi: Zn iyonlarının varlığında yabancı tip *E. coli* W3110. Gri çizgiler: Zn iyonlarının varlığında farklı *E. coli* porin mutantları

4.2. Tartışma

Bu çalışmada *E. coli*'nin dış membran kanal proteinlerinin (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB, ve PhoE) kobalt, bakır, çinko, kadmiyum ve nikel metal streslerindeki rolleri belirlendi. Daha sonra, metal stresinde rolü olduğu tespit edilen porin proteinlerinin sentezinin kontrolü üzerinde, metal homeostazında görevli olan CueR, RcnR, NikR, Zur, CusSR ve CpxAR proteinlerinin rolleri araştırıldı.

Çalışmamızda ilk olarak, deneylerde kullanılacak olan yabancı tip *E. coli* W3110 ve elde ettiğimiz mutant suşların koloni PZR ile kontrolü sağlandı. Daha sonra bu suşların optimum koşullar altında (LB besiyeri, 37 °C ve 160 rpm'de) 6 saatlik çoğalmaları izlendi. Böylece, çalışmada kullanılan *E. coli* W3110 mutant suşların optimum koşullar altında çoğalmaları bakımından yabancı tip *E. coli* W3110'dan farklı olmadığı belirlendi. Birçok çalışmada, farklı *E. coli* suşlarından elde edilmiş *ompC* ve *ompF* porin mutantlarının yabancı tip ile optimum koşullar altında çoğalmaları karşılaştırılmış ve yabancı tipten farklı olmadığı belirtilmiştir (Canil vd., 2019; Chang vd., 2018; Darcan vd., 2003). Ayrıca *E. coli* BW25113 mutant suşların alındığı keio koleksiyonun çoğalma absorbans değerleri incelendiğinde ilgili genlerin mutant edilmesinde, normal şartlar altında, LB besiyerinde çoğalmada yabancı tipe göre bir fark oluşturulmadığı görüldü (https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec_w3110/) (Baba vd., 2006). Özellikle son zamanlarda yapılan çalışmalarda, uygulanan stres şartlarında *E. coli*'de nakavt edilen porin mutantlarının ve yabancı tip hücrelerin çoğalma grafikleri karşılaştırılmış olmasına rağmen, normal koşullar altındaki çoğalma grafikleri gösterilmemiştir (Doranga & Conway, 2023; Luo vd., 2023; Monteiro vd., 2023). Çalışmalarda stres faktörü uygulanmadan önce mutantlar ile yabancı tipin optimum koşullar altında çoğalmalarının karşılaştırılması önem arz etmektedir. Çünkü belirlenen stres şartlarında rolü olduğu görülen proteinlerin rolünün, gerçekten bu stres şartına bağlı olup olmadığına göre görülebilmesi için mutant ile yabancı tipin normal koşullar altında çoğalma testlerinin yapılması gerekir. Bu nedenle, çalışmamızda ilk olarak metal stresi uygulamadan önce, elde ettiğimiz mutant ve komplement hücrelerin normal koşullar altındaki çoğalmaları izlendi. Sonuç olarak, porin genleri nakavt edilen hücrelerin nakavt edilme işleminden sonra, çoğalma bakımından yabancı tip ile karşılaştırıldığında bir fark olmadığı görüldü.

Metal stresinde porinlerin önemini göstermek için, yabancı tip *E. coli* W3110 ve *E. coli* porin mutantlarının üzerine metallerin MİK ve MSK değerleri belirlendi. Çalışmada kullanılan yabancı tip *E. coli* W3110'da belirlenen MİK/MSK değerleri (mg/L), sırasıyla Cd için 288,57/769,51; Co için 297,41/ 446,12; Cu için 936,38/1248,50; Ni için 594,15/>7129,80

ve Zn için 539,16/539,16 olarak belirlendi. Çalışmada kullandığımız porin mutantlarında belirlenen metallerin MİK ve MSK değerleri, yabani tip *E. coli* W3110 ile karşılaştırıldığında, *ompA* ve *ompC* mutantlarının Cd'ye daha duyarlı; *ompF*, *ompT* ve *phoE* mutantlarının Co'ya daha dirençli; *ompC* mutanti Cu'ya daha duyarlıyken, *ompF* mutantının daha dirençli; *ompA* mutantının Ni'ye daha duyarlı; son olarak *ompG* ve *phoE* mutantlarının ise Zn'ye daha dirençli olduğu görüldü. Ranquet ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, LB brotta *E. coli* MG1655 suşunun, CoCl₂ MİK değeri 0,7 mM (166,6 mg/ L) olarak belirlenmiştir (Ranquet vd., 2007a). *E. coli* K12 MG1655 suşuyla yapılan farklı bir çalışmada, LB besiyerinde, Cu ve Zn metallerinin MİK değerleri sırasıyla 410,63 ve 135,55 mg/ L olarak tespit edilmiştir (Zhang vd., 2018). Bhardwaj ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, nütrient brot (NB) besiyerinde hem *E. coli* ATCC 25922 suşunda hem de Yamuna nehrinden elde edilen su örneklerinden saflaştırılan farklı *E. coli* izolatlarında Cu, Ni, Zn ve Cd metallerinin MİK değerleri belirlenmiştir. Yabani tip *E. coli* ATCC 25922'da MİK değerleri metallere göre sırasıyla 39, 36, 8 ve 14 mg/ L olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, Yamuna nehrinden farklı aylarda toplanan su örneklerinden elde edilen *E. coli* izolatlarında belirlenen MİK değerleri Cu için 56-72, Ni için 39-58, Zn için 29-57 ve Cd için ise 20-30 mg/ L aralıklarında değiştiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, farklı *E. coli* izolatlarında belirlenen MİK değerlerinin Cu için 59-69, Ni için 40-60, Zn için 33-55 ve Cd için ise 22-29 mg/ L aralıklarında değiştiği bildirilmiştir (Bhardwaj vd., 2018). Literatürde farklı çalışmalarda belirlenen MİK ve MSK değerleri çalışmada bulduğumuz değerlerden farklılık göstermektedir. Bu durum, kullanılan farklı besiyerlerinden, kullanılan metallerin farklı formlarından, farklı suşlardan ya da aynı suş olsa bile farklı pasajların kullanılmasından kaynaklı olabilir. Literatürü incelediğimizde, birçok çalışmada yabani tip *E. coli*'ye metallerin etkisinin MİK ve MSK değerleri belirlenmesine rağmen, porin mutantları üzerine metallerin MİK ve MSK değerlerinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, *E. coli*'nin porin mutantlarında metallerin MİK ve MSK değerleri ilk kez belirlenmiştir.

Daha sonra, porin genleri nakavt edilmiş hücrelerin yaşamı üzerine metal stresinin etkisinin belirlenebilmesi için, yabani tip *E. coli* W3110'da belirlenen MİK değerinin ¾'ü kadar metal içeren sıvı besiyerinde çoğalma ve petride LB agarda yaşam deneyleri gerçekleştirildi. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar ile, hangi metalde hangi porin proteinin rolü olduğu belirlendi. Metalin varlığında porin mutantlarının duyarlı ya da dirençli olması o proteinin rolünü göstermektedir.

Cd metal stresi: Kadmiyum stresi uygulanan porin genleri nakavt edilmiş hücrelerin aynı strese maruz bırakılan yabani tip *E. coli* W3110 ile büyümeleri karşılaştırıldığında, *ompA* ve *ompC* mutant hücrelerinin Cd'a daha duyarlı olduğu, *ompG* ve *lamB* mutantlarının ise daha dirençli olduğu belirlendi. Mejare ve arkadaşları (1998) tarafından yayınlanan bir derlemede, OmpA ve LamB'nin Cd⁺² bağlayıcı peptitlere sahip olduğu vurgulanmaktadır. OmpA'nın Cd metal bağlayıcı heksapeptit (HSQKVF) sayesinde hücreleri Cd'nin toksik etkisinden koruduğu (Mejare vd., 1998), LamB'nin ise heksahistidin peptidi sayesinde hücre içinde Cd birikiminde beş kat artışa sebep olduğu (Pazirandeh vd., 1998) farklı çalışmalarda belirlenmiştir. Egler ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *ompC* mutant olan *E. coli* hücrelerinin Cd direncinin azaldığı belirtilmiştir (Egler vd., 2005). *ompA*, *ompC* ve *lamB* 'nin Cd ile ilişkisini içeren verilerimiz de literatürü desteklemektedir. Literatürde Cd stresinde OmpG'nin rolü hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile, ilk kez OmpG proteininin yokluğunda Cd'ye olan direncin arttığı belirlendi. OmpG, monomerik bir yapıda olan 900 kDa'ya kadar iyonların ve moleküllerin geçişine izin veren spesifik olmayan bir porindir (Conlan ve Bayley, 2003; Mari vd., 2010). Büyük por çapına sahip olan OmpG proteini, Cd iyonlarının da hücreye girişinde rol oynayabilir. Çalışmamızda belirlediğimiz gibi, OmpG proteininin yokluğunda Cd'nin hücre içerisine girişi engellenmiş ve böylece hücrenin Cd'a karşı direnci artmış olabilir.

Çalışmamızda, yabani tip *E. coli* W3110 hücresine CdSO₄ ilavesi sonucunda porin genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim incelendi. Bunun sonucunda, porin genlerinden *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompT* ve *lamB* genlerinin sentezinde azalma; *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezinde ise artış görüldü. Yapılan bir çalışmada, Cd stresi uygulanan yabani tip *E. coli* hücrelerinde *ompA* ve *ompC* genlerinin sentezinin azaldığı belirlenmiştir (Egler vd., 2005). Benzer şekilde başka bir çalışmada da Cd'ye maruz kalan *E. coli* hücrelerinde, *ompA* geninin sentezinde 3,5 kat, *ompC* geninin sentezinde ise 6 kat bir azalma olduğu belirlenmiştir (Brocklehurst & Morby, 2000) Isarankura-Na-Ayudhya ve arkadaşları, (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise *ompA* ve *ompC* genlerinin yanında, Cd varlığında *ompF* geninin sentezinin de azaldığı belirlenmiştir (Isarankura-Na-Ayudhya vd., 2018). Literatürde, Cd stresi varlığında *E. coli* hücrelerinde *lamB* geninin sentezi ile alakalı çalışma olmasa da Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Enterobacter cloacae*'nin farklı suşları üzerinde yapılan bir çalışmada Cd stresi varlığında *ompA*, *ompC* ve *lamB* genlerinin baskılandığı belirlenmiştir (Chuanboon vd., 2019). Amaral ve çalışma arkadaşları (2014) tarafından yapılan derlemede ise, metale karşı dirençli Gram negatif suşlarda bileşiklerin hücreye

girmesine izin veren porin genlerinin ekspresyonunun genel anlamda azaldığı vurgulanmıştır (Amaral vd., 2014). Çalışmamızda, yabancı tip *E. coli* W3110'da Cd iyonları varlığında transkripsiyonel seviyede en fazla azalış gösteren porin *ompT* iken, en fazla artış gösterenlerin *ompG* ve *phoE* olduğu görüldü. Ancak, literatürde OmpT, OmpG ve PhoE proteinlerinin Cd ile ilişkisini gösteren herhangi makaleye rastlanılmamıştır. OmpT, antimikrobiyal peptidleri (AMP'leri) hızlıca ayırarak etkisiz hale getiren ve dış zar proteaz ailesinin (OmpT) bir üyesi olan dış zar enzimidir (Desloges vd., 2019). Bununla birlikte, OmpT, serin peptidaz ailesinin bir üyesi olarak da sınıflandırılmıştır (Kramer vd., 2000). Yapılan bir çalışmada, Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} ilavesi inhibitör aktiviteyi artırırken, diğer metal iyonları, sürfaktanlar ve oksidanların, proteaz inhibitörünün inhibitör aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak bizim verilerimizde bu çalışmayı desteklemektedir. Ancak literatürde *ompT* sentezinin kontrolü ile ilişkili çok az çalışmaya rastlanılmıştır ve tam olarak Cd metali ile ilişkinin anlaşılması için daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada, *E. coli*'nin kadmiyuma karşı transkripsiyonel tepkilerinin önemli ölçüde pH'tan etkilendiği belirlenmiştir ve Cd varlığında, hem asidik şartlarda eksprese edilen genlerin hem de metallerin taşınmasında sorumlu genlerin sentezlerinin arttığı gösterilmiştir (Worden vd., 2009). Geniş gözenek çapına sahip OmpG proteini, pH'a bağlı olarak farklı yapısal formlara dönüşmektedir (Mari vd., 2010). Ayrıca, asidik şartlarda *E. coli*'de *ompG*'nin ekspresyon seviyesinin 2 ile 6,5 kat arttığı tespit edilmiştir (Wu vd., 2023). Çalışmamızda, Cd^{2+} iyonlarının varlığında *ompG*'nin ekspresyonunun arttığı bulunması literatürü destekler niteliktedir. *E. coli*'de PhoE porini, OmpC ve OmpF ile birçok özelliği paylaşırsa da fosfatlar, polifosfatlar, sülfatlar ve klorürler dahil olmak üzere pozitif yüklü lizin kalıntılarının varlığından kaynaklanan anyonik maddeler için genel bir seçicilik gösterir (Benz vd., 1984; Hancock vd., 1986; Bauerzb vd., 1989) Çalışmamızda Cd'nin sülfatlı formu kullanıldığından, $CdSO_4$ sulu solüsyonda Cd^{+2} ve SO_4^{-2} iyonlarına ayrılması sonucunda ortamda artan sülfatların hücreye taşınmasına *phoE* genin aracılık ettiği söylenebilir.

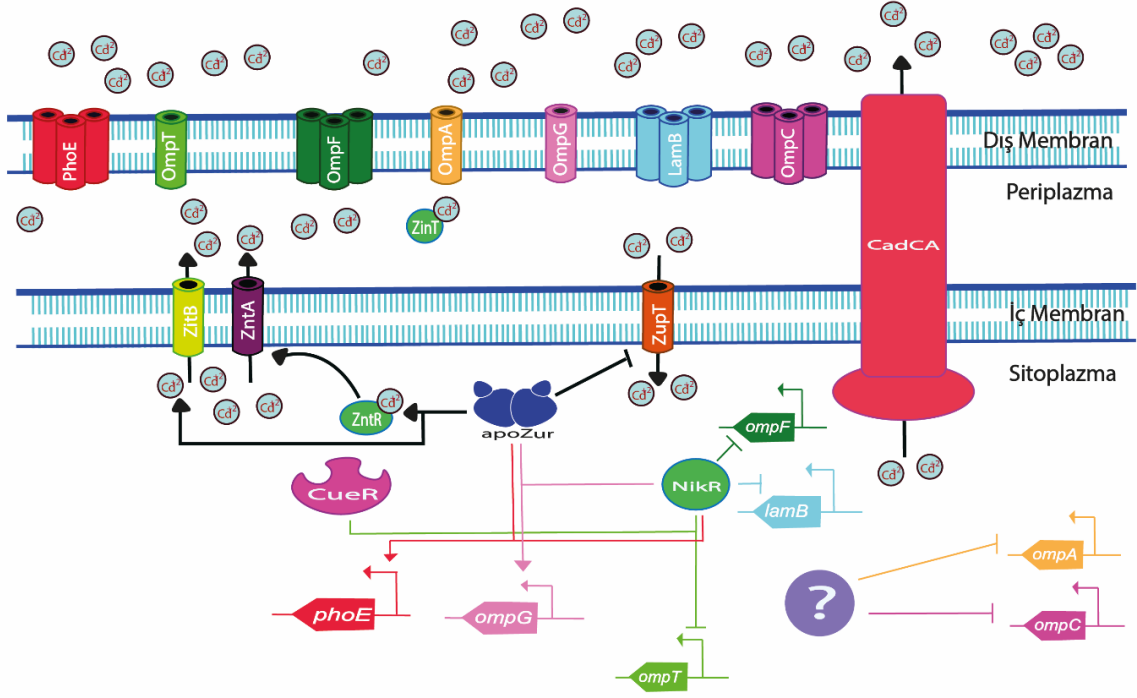
Çalışmamızda yabancı tip *E. coli* W3110'a (1,00) göre belirlenen porin genlerindeki değişimden, metal hemostazında rol oynayan temel genlerin kodladığı CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinden hangisinin rolü olduğu araştırıldı.

Cd varlığında yabancı tip *E. coli* W3110'da *ompA* geninin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Çalışmada belirlenen *ompA*'nin az miktardaki baskılanmadan CueR, RcnR ve Zur proteinlerinin sorumlu olmadığı ve bu proteinlerin Cd'den bağımsız olarak *ompA* geninin sentezini arttırdığı tespit edildi. *ompC* geninin sentezi yabancı tip *E. coli*

W3110'da Cd metali varlığında yaklaşık 4,5 kat azalış gösterdi. Çalışmada, bu azalmayı sağlayan geni bulmak için *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantları kullanıldı. Sonuç olarak, CueR, RcnR ve Zur proteinlerinin Cd varlığında *ompC*'nin azalmasında rolü olmadığı ancak **NikR** proteininin rolü olduğu görüldü. *ompF* geninin Cd varlığındaki değişimine bakıldığında, yabancı tip *E. coli*'de ~2 kat azalma tespit edildi. Cd varlığında, *ompF* geninin sentezindeki değişimde **NikR** proteininin iki şekilde etkisi bulunmaktadır. NikR proteini metal içermeyen durumda *ompF* geninin sentezinin artışından sorumlu olduğu, Cd varlığında ise baskılamada rolü olduğu görüldü. CueR'nin metalsiz ortamda *ompF* geninin sentezinin artışından sorumlu olduğu, Cd içeren ortamda ise *ompF*'nin sentezinin farklı bir protein tarafından kontrol edildiği yapılan çalışma ile tespit edildi. *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezi Cd varlığında yabancı tipte sırasıyla, ~6 kat ve ~2 kat olacak şekilde arttı. *ompG* ve *phoE*'nin Cd varlığındaki artışından, **NikR ve Zur** proteinlerinin sorumlu olduğu tespit edildi. Cd varlığından yabancı tip *E. coli*'de en fazla baskılanan *ompT* (~7,5 kat) geni üzerinde ise **CueR ve NikR** proteinlerinin rolü bulunurken, Zur proteinin metalden bağımsız olarak *ompT*'nin baskılanmasında rolü olduğu tespit edildi. Son olarak yabancı tip *E. coli*'de, *lamB*'nin Cd varlığında ~2,5 kat azalış gösterdiği belirlendi. Bu azalmadan sorumlu proteinin özellikle **NikR** proteini olduğu görüldü. Literatürde, Cd varlığında veya yokluğunda, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin porin genlerinin sentezi ile ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Genel olarak literatürdeki çalışmalarda her metal düzenleyicinin kendine spesifik olan genlerinin rolleri araştırılmıştır. CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin genel olarak farklı metallere karşı korumada görevli olduğu bazı çalışmalarda belirtilmiştir. Metal düzenleyici MerR ailesinin bir üyesi olan CueR'nin, affinitesi düşükte olsa Cd iyonlarını bağlayıcı alanlara sahip olduğu belirlenmiştir (Jancsó vd., 2012). Metal düzenleyiciler (Fur, MntR, CueR, Zur gibi), ortamda bir metal eksik olduğunda, alım sistemlerinin ekspresyonunu artırır ve bu metallerin fazlalığında, alım sistemlerini baskılayıcı olarak görev alırlar. Böylece bakteri hücrelerinin metal toksisitesinden korunmasını sağlar (Porcheron vd., 2013). Bu durumda, sitoplazmadaki Cd varlığında CueR proteini, Cd'nin içeriye girişinden sorumlu olan porin genlerinin sentezi üzerinde baskılayıcı bir rol oynayabilir. Zur, sitoplazmada Zn^{2+} birikimi ile aktifleşerek iyon girişi engelleyici genlerin sentezini düzenler (Pater & Hantke, 1998). Outten ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada, Zur'un Zn'ye bağlı formları üzerinde biyokimyasal ve spektroskopik analizler yapılmış ve sonuçta Zur'un iki farklı metal bağlama bölgesine sahip olduğu gösterilmiş ve ilk bölgesine güçlü şekilde Zn iyonlarının bağlandığı ve ikinci bölgesine ise Zn veya Co'nun bağlandığı belirlenmiştir (Outten vd., 2001). Co gibi Cd iyonları da Zur'un ikincil bölgesine bağlanma özelliği

gösterebilir. *E. coli*'de olmasa da Gram negatif bir bakteri olan *Alcaligenes eutrophus*'da bulunan membrana bağlı CzcCBA protein kompleksi, aktif bir katyon akış mekanizması ile ağır metal direncine aracılık eder. Yapılan başka bir çalışmada, CzcC proteini, Zn²⁺'nin yanında Co²⁺ ve Cd²⁺'ye de affinite göstermiştir (Dietfuch & Nies, 1992). Bu durum, Zn iyonlarına spesifik olan alanlara, Cd iyonlarının da bağlanabileceğini gösterir. RcnR ve NikR proteinlerinin Cd ile ilişkisi olduğunu gösteren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. NikR ve RcnR, nikel ABC tipi taşıyıcı NikABCDE'nin Ni kaynaklı baskılanmasından sorumlu proteinlerdir. Böylece periplazmada bulunan fazla Ni iyonlarının sitoplazmaya geçişini engellemektedir (Macomber & Hausinger, 2011). Gault ve arkadaşları (2016) 'nın (2016) önemli bulgularından biri, Ni stresinin, aşırı Fe ve Cu'ya karşı savunmada yer alan sistemleri de harekete geçirdiğinin belirlenmesidir (Gault vd., 2016). Bu durumda NikR, Fe ve Cu gibi Cd toksisitesinden sorumlu genlerin sentezini düzenleyerek dolaylı yoldan porin genlerinin sentezi üzerinde rolü olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışma sonucunda, Cd iyonlarının metal homeostazından sorumlu olan CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerini uyararak porin genlerinin sentezi üzerindeki rolü literatüre ilk defa kazandırıldı.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler literatürde bilinenler ile analiz edildiğinde, yabancı tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin kadmiyum (Cd) homeostazındaki tahmini sentez mekanizması Şekil 4.94'de şematize edilerek özetlenmiştir. Cd metali varlığında *ompF* ve *lamB* genlerinin baskılanmasından NikR'nin, *ompT*'nin baskılanmasından CueR ve NikR'nin, *phoE* ve *ompG*'nin artışından ise NikR ve Zur'un rol oynadığı belirlendi. Belirlenen bu verilere ait literatürde bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 4.94. Kadmiyum (Cd) stresine karşı Yabani tip *E. coli* W3110’da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması

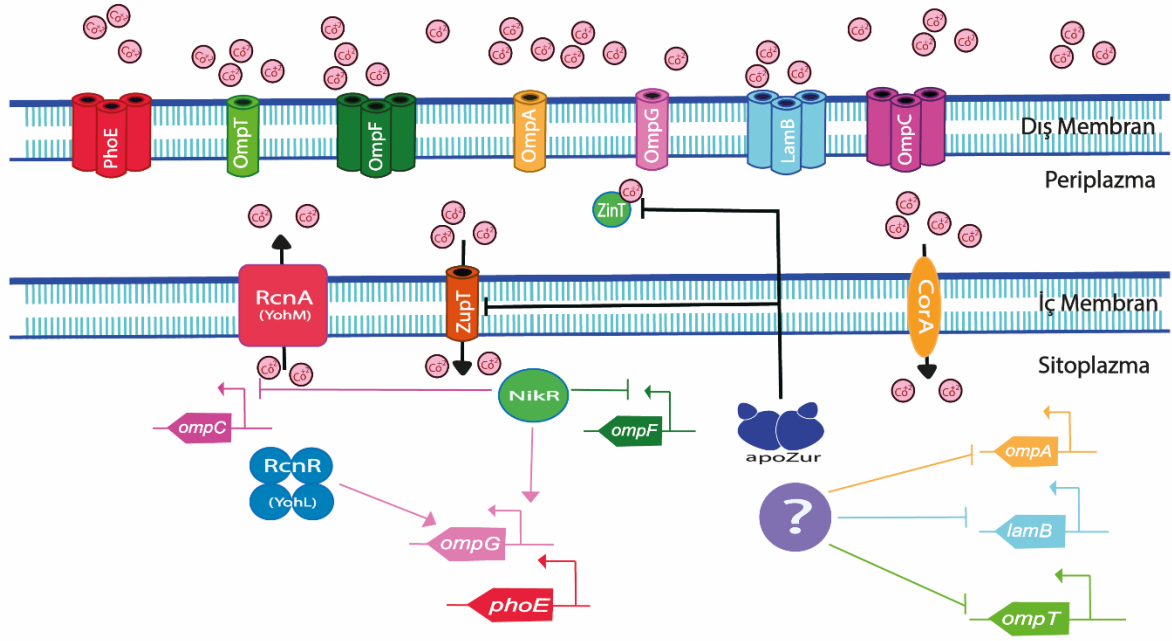
Co metal stresi: Kobalt stresi altındaki yabani tip *E. coli* W3110’nun MSK (446,12 µg/ml) değerine göre, *ompF* (1784,48 µg/ml) ve *phoE* (892,24 µg/ml) mutant hücrelerinin Co’ya karşı daha dirençli olduğu belirlendi. OmpF, boyutu itibarıyla spesifik olmayan geniş por çapına sahip bir porindir. Yapılan bir çalışmada, iki değerlikli katyonların *ompF* proteini ile spesifik etkileşimde bulunduğu öne sürülmüştür (García-Gimenez vd., 2012). Başka bir çalışmada Co gibi divalent katyonların büyük kanallara bağlanmasının, porinler aracılığı ile moleküllerin taşınması için önemli olduğu belirtilmiştir (Marshall ve Piddock, 1994). Bu durumda, çalışmamız sonucunda OmpF proteini yokluğunun, Co iyonlarının hücreye girişini azaltarak metalin zararlı etkisini engellediğini söyleyebiliriz. Böylece *ompF* mutantlarının yabani tip *E. coli*’ye göre kobalta karşı daha dirençli olması literatürü desteklemektedir. Literatürde, kobalt ile PhoE proteininin ilişkisini gösteren herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Yapılan bir çalışmada, *E. coli*’de, çoğu molekülün dış zardan geçişi spesifik olmayan OmpC ve OmpF ile fosfoporin PhoE’den gerçekleştiği vurgulanmıştır (Chimento vd., 2004). Bu durumda hücreye kobalt taşınmasında bu proteinlerin görevli olabileceği, dolayısıyla PhoE proteininin hücrede bulunmamasının, kobaltın hücre içine geçişini azalttığı ve hücreye direnç kazandırdığı ifade edilebilir.

Çalışmamızda, yabancı tip *E. coli* W3110'a CoCl₂ ilavesi sonucunda porin genlerinin sentezindeki değişim incelendi. Sonuç olarak, *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompT* ve *lamB* porin genlerinin sentezinde azalış; *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezinde ise artış gözlemlendi. Kobalt varlığında porin genlerinin sentezinin nasıl değiştiği hakkında literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ama genel olarak literatürde kobalt iyonlarının, dış zar boyunca porinler veya TonB'ye bağlı taşıyıcılar (TBDT) tarafından taşındığı belirtilmiştir (Osman vd., 2021). Bu nedenle, özellikle besin alımında görevli olan *OmpC*, *OmpF*, *LamB* ve *PhoE* proteinlerinin (Chimento vd., 2004), Co varlığında sentezlerinin azalması anlamlı bir sonuç olarak değerlendirilmektedir. Literatürdeki farklı çalışmaların incelenmesi sonucunda, porinlerin kobalt ile doğrudan değil de dolaylı bir ilişkisi olabileceği gösterilmiştir. Demir ve kobalt hem büyüklük hem de yük bakımından benzerdir (Ranquet vd., 2007b). *E. coli* hücrelerine kobalt ilave edildiğinde, demir alım genlerinin ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Ranquet vd., 2007a). Çevresel stresin artması ile birlikte *ompC* ve *ompF* genlerinin ekspresyonu, Fur (demir homeostaz regülatörü) tarafından kontrol edilir (De La Cruz & Calva, 2010). Kobaltın, demir düzenleyici protein olan Fur'un metal bağlama bölgesine bağlanarak aktivitesinin önemli ölçüde bozulduğu gösterilmiştir (Thorgersen & Downs, 2007). Gerken vd., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, Fur'un *ompA*, *ompC* ve *ompF* genlerinin sentezinde etkili olduğu vurgulanmıştır (Gerken vd., 2020a). *Vibrio cholerae* üzerinde yapılan bir çalışmada Fur'un *ompT*'nin sentezini arttırıcı yönde düzenlediği belirtilmiştir (Craig vd., 2011). Bu durumda Co iyonları Fur'un aktivitesini bozarak *ompA*, *ompC*, *ompF* ve *ompT* genlerinin baskılanmasından sorumlu olabilir. Monomerik ve geniş por çapına sahip bir porin olan *OmpG*'nin, genel bir iyon kanalı olduğu belirtilmiştir (Naturwissenschaften & Große, 2011). *OmpG*, spesifik olmayan diğer *OmpC* ve *OmpF*'den farklı olarak kanallarını daraltan büyük dış döngü L3'ten yoksundur (Fajardo vd., 1998). Bu nedenle de geniş por çapından dolayı Co iyonlarının hücre içerisine geçişi bu porin aracılığı ile olabilir.

Yapılan bir çalışmada, yabancı tip *E. coli* W3110'da Co etkisi ile porin genlerinin sentezindeki değişimde CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin rolü araştırıldı. Kobalt metali varlığında, en fazla baskılanan *ompA* genidir. Bu genin Co varlığında baskılanmasında CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin rolü olmadığı, ancak Co yokluğunda CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin *ompA* sentezinin artışında rol oynadığı görüldü. Bu duruma göre, kobalt varlığında farklı bir düzenleyici tarafından *ompA*'nın sentezinin baskılandığı sonucuna varıldı. *ompC* ve *ompF*'nin sentezlerinin kobalt varlığında azalmasından NikR proteininin sorumlu

olduğu tespit edildi. Kobalt metali varlığında yabancı tip *E. coli*'de artış görülen porinler *ompG* ve *phoE*'dir. Bu genlerin sentezindeki artıştan RcnR ve NikR proteinlerinin önemli rolleri olduğu tespit edildi. *ompT* ve *lamB* genlerinin sentezinin kobalt varlığında azalmasında CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin rolü olmadığı, farklı bir protein tarafından baskılandığı belirlendi. Literatürde, CueR'nin doğrudan ya da dolaylı olarak kobalt ile ilişkisi olduğuna dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamasına rağmen, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin hücredeki Co dengesinin sağlanmasında rolü olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. RcnR tarafından düzenlenen RcnA'nın, Ni(II) ve Co(II) metalleri için bir dışa atım sistemi olduğu gösterilmektedir (Rodrigue vd., 2005). *rcnA* gen ekspresyonunun düzenlenmesi, nikel, kobalt ve demir homeostazı tarafından sağlanır. Regülatör Fur ve RcnR bu süreçte yer alır ve her biri metale bağlı düzenleme için gereklidir (Koch vd., 2007). Çeşitli çalışmalarda, kobalt metalinin taşınmasında ve sırasıyla demir ve nikel alımında yer alan *feoB* ve *nikA*'nın sentezlerinin kobalt varlığında azaldığı bulunmuştur (Kammler vd., 1993; Navarro vd., 1993; Marlovits vd., 2002). Bununla birlikte, periplazmik nikel bağlayıcı protein olan NikA'nın, kobalt dahil diğer metalleri de bağlayabildiği bilinmektedir (Pina vd., 1995). Fantino vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, fazla miktarda bulunduğu, kobaltın hücreye girmek için demir ve nikel ile rekabet etmesinin muhtemel olduğu ve NikABC ve FeoAB sistemlerinin ekspresyonlarının azalmasının kobalt alımını önleyeceği sonucuna varılmıştır (Fantino vd., 2010). Gram-negatif bakterilerde katyonların dış zardan difüzyonu, çoğunlukla OmpC ve OmpF porinleri aracılığıyla gerçekleşir (Sebbane vd., 2002). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, kobaltın hücreye girişini engellemek için *ompC* ve *ompF* genlerinin baskılanması literatürü desteklerken, bu porinlerin baskılanmasında NikR proteininin rolü olduğu ilk kez belirlendi. Bununla birlikte, literatüre kobalt varlığında RcnR ve NikR'nin *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezini arttırdığına dair ilk bulgular da bu çalışma ile kazandırıldı.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler literatürde bilinenler ile analiz edildiğinde, yabancı tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin kobalt (Co) homeostazındaki tahmini sentez mekanizması Şekil 4.95'de şematize edilerek özetlenmiştir. Co varlığında *ompC* ve *ompF* genlerinin baskılanmasından NikR'nin, *ompG* ve *phoE*'nin artışından ise NikR ve RcnR'nin rol oynadığı belirlendi.



Şekil 4.95. Kobalt (Co) stresine karşı Yabani tip *E. coli* W3110’da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması

Cu metal stresi: Bakır stresi altındaki yabani tip *E. coli* W3110’a göre, *ompA* ve *ompC* mutant hücreleri Cu iyonlarına karşı daha duyarlı, *ompF* ve *lamB* mutant hücrelerinin ise daha dirençli olduğu belirlendi. Uzun zamandır, OmpC ve OmpF proteinlerinin düşük moleküler ağırlıklı hidrofilik bileşiklerin, özellikle yüksüz veya katyonik olanların giriş mekanizması olduğu bilinmektedir (Nikaido, 2003). Ayrıca Cu^{2+} gibi metal iyonları için de bir giriş yolu sağlarlar (Lutkenhaus, 1977). Bakır metali transferinde porinler arasında en etkili görünen OmpF proteindir. OmpF gözeneklerinin OmpC gözeneklerine kıyasla biraz daha büyük olması (Nikaido & Vaara2, 1985) ve normal koşullar altında OmpF gözeneklerinin daha yüksek oranda açık olmasından kaynaklanır. *ompA* ve *ompC* mutantlarının bakır iyonlarına daha duyarlı olması *ompF* mutantının ise daha dirençli olduğu bulgumuz literatür ile de desteklenmektedir (Goodson, 1986). Maltoporin (LamB) ve peptidoglikanla ilişkili lipoprotein ile birleşmiş sistein ve glisin kalıntıları açısından zengin bazı metal bağlayıcı peptitler, *E. coli*’de gelişmiş bir biyosorpsiyon yeteneğine yol açar (Janeena vd., 2023). Bu durumda *lamB* geninin yokluğunda hücrenin direnç kazanması, Cu iyonlarının hücre içerisine girişinin engellenmesinden kaynaklanabilir.

Cu iyonları varlığı ve yokluğunda yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinde sentezlenen porin genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda, *ompT* geninin değişimi

istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, *ompA*, *ompC* ve *ompF* genlerinin sentezinin baskılandığı, *ompG*, *lamB* ve *phoE* genlerinin ise sentezinin arttığı tespit edildi. Sonuç olarak, OmpT proteini hariç diğer porin proteinlerinin bakır homeostazında görevli olduğu bulundu. OmpA'nın, *E. coli*'deki başlıca dış zar proteinlerinden biri olarak tanımlandığı ve dış zarın bütünlüğünün korunmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Ayrıca, F-pilus aracılı konjugasyonda, kolikin duyarlılığında ve bir bakteriyofaj reseptörü olarak görev aldığı gösterilmiştir (Hallt & Silhavy~, 1981; Lugtenberg & Peters, 1976; Osborn & Wu, 1980). OmpA, düşük geçirgenliğe sahip spesifik olmayan difüzyon kanalları üretir (Arora vd., 2000; Zakharian & Reusch, 2005). Bu durum, bakır metalinin toksisitesinden kendini korumak için *ompA* sentezinin azalması beklenen bir sonuçtur. Xu vd, (2022) tarafından yapılan çalışmada bakır ve çinko ağır metallerine maruz kalan *E. coli* hücrelerinde *ompC* geninin sentezinin azaldığı belirlenmiştir (Y. Xu vd., 2022). Bizim çalışmamızın sonuçları da bu çalışmayı desteklemektedir. OmpC ve OmpF, bakteri hücre duvarlarında yüksek seviyelerde ifade edilen homolog porinlerdir. OmpC, OmpF'den daha küçük gözenek boyutuyla daha seçicidir (Baslé vd., 2006; Koebnik vd., 2000). Özellikle, safra tuzları ve sefalosporinler gibi toksinler, OmpF'den, OmpC'ye göre daha kolay geçer. Bu gözlemlere dayanarak, bakır iyonlarının geçişini azaltmak için *ompF* geninin sentezini azaltması muhtemeldir. Farklı büyüme ortamlarının bileşenlerinin ağır metal iyonlarını bağlayabildiği ve sonuç olarak bu iyonların mikroorganizmalar ile etkileşimini etkileyebildiği iyi bilinmektedir (Ramamoorthy & Kushner, 1975). *E. coli* DH5 α suşu üzerinde yapılan bir çalışmada, farklı karbon kaynakları (mannitol, fruktoz, laktoz ve maltoz) kullanılmış ve bu karbon kaynaklarında büyütülen hücrelerde bakır birikimi olduğunu belirlemişlerdir. Bunun sonucunda maltoz içeren hücrelerde bakır birikiminin yabancı tipe göre önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. LamB'nin (veya maltoporinin) şekere özgü bir bağlanma bölgesine sahip olduğu ve böylece seçici bir kanal oluşturduğu çok eskiden bilinmektedir (Benzl vd., 1987). Bu durumda, bakır iyonları şeker moleküllerine bağlanarak *lamB* kanalından kolaylıkla geçebilmektedir. Bu durumda bu kanalın bakır alımında rolü olduğu söylenebilir. OmpG, porinlerde bulunan en geniş gözenek çaplarından birini sergileyen, spesifik olmayan porinler arasında monomer yapıdaki tek porindir (Yıldız vd., 2006). Ayrıca, OmpG, iki asidik ve iki bazik bölgeden oluşan merkezi bir halka barındırır. Bu halka yapısının pH'a bağlı olarak değişmesi, porinin katyon seçiciliği ve şeker taşınması üzerindeki rolünü etkiler (Schmitt vd., 2019). Genel olarak az sentezlenen *ompG* geninin sentezinin, *ompF* geninin eksikliğinde artış gösterdiği literatürde bilinmektedir (Damaghi vd., 2010). Bu çalışmada bakır varlığında *ompC* ve *ompF*'nin baskılanması, hücreye madde alımının spesifik olmayan *ompG* tarafından gerçekleşmesi nedeni ile

sentezinde artış olmuş olabilir. OmpF ve OmpC eksikliğinin, genellikle fosfat sınırlayıcı koşullar altında eksprese edilen bir porin olan *phoE*'nin ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (Korteland vd., 1982). Fosfoporin olarak bilinmesine rağmen, PhoE gözenğinde difüzyon, sadece anyonlarla sınırlı değildir (Benz vd., 1985) ve OmpC ve OmpF yokluğunda bakır iyonlarının difüzyonunu kolaylaştırmasının muhtemelen PhoE aracılığıyla olabileceği vurgulanmıştır (Speer vd., 2013). Çalışmada, bakır varlığında azalan *ompC* ve *ompF* genlerinin görevini üstlenen *phoE*'nin hücreye madde alımında görev aldığı için sentezi artmış olabilir.

Cu iyonları varlığında yabani tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin sentezinde meydana gelen değişimde CueR, RcnR, NikR, Zur, CusS, CusR, CpxA ve CpxR proteinlerinin rolleri araştırıldı. *E. coli*'de, *copA*, CueR tarafından pozitif olarak kontrol edilir ve böylece sitoplazmadaki fazla bakırın periplazmaya aktarılmasını sağlar (Rensing & Grass, 2003; Stoyanov vd., 2001). Bakır homeostazında en önemli proteinlerden biri olan CueR'nin, bakır varlığında yabani tip *E. coli*'nin *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompG*, *ompT*, *lamB* ve *phoE* genlerinin sentezi üzerinde bir rolünün olmadığı bu çalışma ile belirlendi. RcnA, *E. coli*'de Ni ve Co detoksifikasyonundan sorumlu bir akış pompasıdır. *rcnA*'nın ifadesi, Ni ve Co tarafından uyarılan metal-düzenleyicisi RcnR yoluyla düzenlenir (Blaha vd., 2011). Metal iyon dengesini korumak için, RcnA pompası ile birlikte çalışan periplazmik protein RcnB (YohN)'nin bir Ni/Co akış sisteminde yer alan Cu-bağlayıcı protein olduğu belirlenmiştir (Blériot vd., 2014). Bakırın hücre içi dengesinin ayarlanmasında rolü olan RcnR'nin çalışılan porin genleri içerisinde sadece *phoE* geninin bakır varlığında sentezini arttırmada rolü olduğu tespit edildi. Böylece, RcnR'nin *phoE* geninin sentezi üzerindeki rolünü gösteren ilk bulgular, bu çalışmanın sonucunda literatüre kazandırıldı. Bakır varlığında, yabani tip *E. coli*'de *ompF* geninin sentezinin azalmasından, *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezinin ise artışından NikR proteinin rolü olduğu görüldü. Transkripsiyonel düzenleyici olan NikR'nin, her zaman nikelle özgü olmadığı, aslında bakır ve kobalt metallerini de sıkı şekilde bağlayabildiği literatürde bilinmektedir (Bloom, 2004). Ancak NikR'nin bakır varlığında *ompF*, *ompG* ve *phoE* genlerinin sentezi üzerine bir rolü olduğu literatürde bulunamamıştır. Bakırın hücre içerisine alımı spesifik olmayan porin kanalları aracılığıyla olmaktadır (Chivers vd., 2012). Bu durumda, bakır varlığında *ompF* sentezinin azaltılmasında ve azalan *ompF*'nin yerine benzer rolleri üstlenen *ompG* ve *phoE* genlerinin artışında NikR proteininin rolü olduğunu söyleyebiliriz. Çinko homeostazında yer alan Zur, Zn açlığında, çinko alım genlerinin regülasyonundan sorumludur (Patzner & Hantke, 1998). Son zamanlarda farklı metal

homeostatik yolların etkileşimi ve bunların bakteri fizyolojisine ve stres adaptasyonuna katkısı üzerine çalışmalar yapılmaktadır. 2019 yılında yapılan bir çalışmada, Zn fazlalığında *E. coli* 'de Zn, Fe ve Cu homeostatik yolların birbirlerinin çapraz düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir (Xu vd., 2019). *E. coli* hücrelerinin Zn ile aşırı yüklenmesi, Fe homeostaz düzenleyicisi Fur'un geçici düzensizliğine ve sonuç olarak Fe-alım genlerinin ve Fe-depolama genlerinin üzerindeki baskısının azalarak hücrede Fe'nin aşırı yüklenmesine neden olmuştur. Bu koşul altında artan oksidatif stresle birleşen yüksek Fe, birincil Cu detoksifikasyonun transkripsiyon düzenleyicisi CueR'yi baskılayarak CopA ve CueO'nun ekspresyonunun azalmasına neden oldu. Bu durumda, *E. coli* hücreleri, hücre içi Cu içeriğini düşürmek için CusRS sinyal iletim yolu aracılığıyla ikincil Cu detoksifikasyon sistemi CusCFBA'yı aktive ettiği belirtilmiştir. Farklı bir çalışmada, *E. coli*'de ZnuA'nın bir çinko (II) taşıyıcısı olduğu bilinmesine rağmen, diğer metal iyonları (Co(II), Ni(II), Cd(II), Cu(II)) ile etkileşime girebileceğine dair bazı kanıtlar da vardır (Hecel vd., 2020; Yatsunyk vd., 2008). Bu çalışmalar gösteriyor ki, Zur proteini Zn haricinde Cu iyonlarını da taşıyabilir. Literatürde de Gram pozitif bir bakteri olan *Enterococcus faecalis*'te yapılan bir çalışmada, Zur'da bulunan iki metal bağlayıcı bölgesinin bir tarafına Zn bağlanırken diğer alanına bakır iyonlarının bağlanarak bir dizi genin regülasyonunu sağlayarak fazla bakırın hücreye alınmasını engellediği belirtilmiştir (Latorre vd., 2015). Çalışmamız sonucunda Zur proteininin bakır varlığında, *ompT* ve *phoE*'nin sentezinin artışından sorumlu olduğu ilk kez belirlendi. Literatürde Zur proteininin *ompT* ve *phoE* genlerinin sentezi üzerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak yukarıda belirtilen çalışmalardan yola çıkarak, Cu varlığında aktifleşen Zur'un hücreyi artan oksidatif stresten korumak için *ompT* geninin sentezinin artışından sorumlu olabileceği ifade edilebilir. *phoE*'nin ifadesi, fosfat açlığı altında indüklendiğinden durağan fazda sentezi genel olarak artmaktadır (Yoon vd., 2003). Ortamda bulunan fazla metal katyonlarının hücre içerisine geçişleri, fosfatlar ile oluşturdukları kompleks aracılığıyla kolaylaşmaktadır (Van Veen, 'j vd., 1994). Burada Zur proteininin *phoE* üzerindeki rolü ile ilişkili ilk veriler ortaya konulmuş, ancak nasıl bir bağlantı olacağına dair daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

İki bileşenli sistemler, bakterilerin çevreyi algılamak ve ona tepki vermek için kullandığı başlıca sinyal iletim yoludur. Bakır homeostazında görevli olan temel iki bileşenli sistemlerden olan CpxAR ve CusSR'nin bakır metali varlığında, porin genlerinin sentezi üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bakır iyonlarının varlığında, CpxAR iki bileşenli sisteminin porin genleri üzerindeki etkisinin incelenmesi sonucunda, CpxA proteininin,

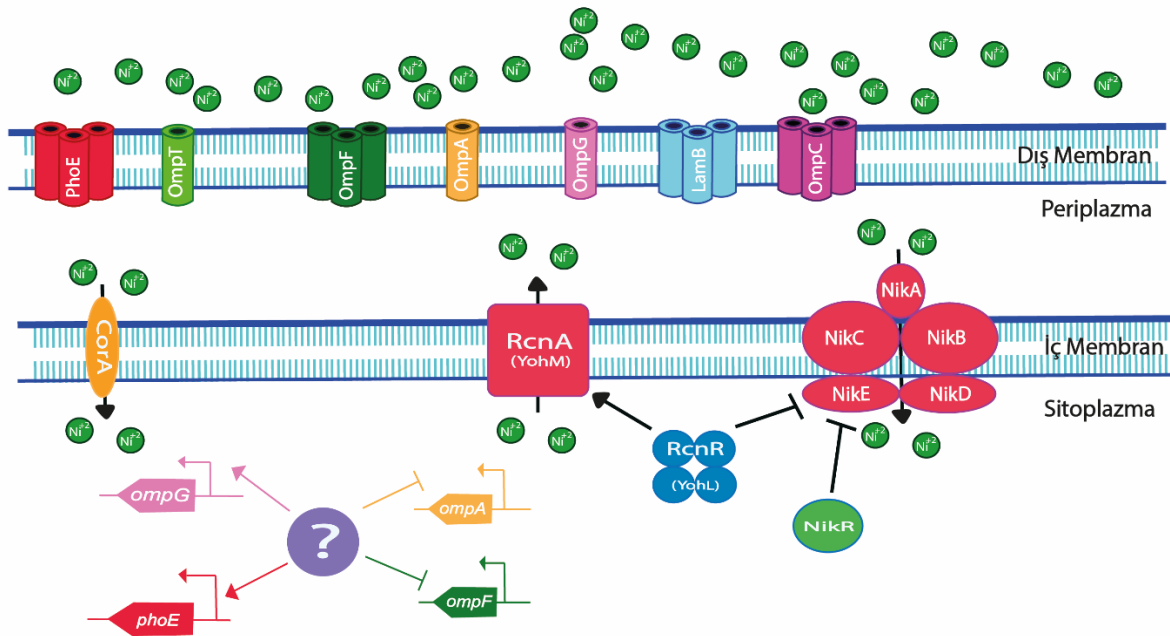
araştırılan tüm porin genlerinin sentezi üzerinde herhangi bir rolü olmadığı, CpxR'nin ise sadece *ompA*'nın baskılanmasında rolü olduğu belirlendi. Ma ve Wood (2009) tarafından yapılan bir çalışmada *E. coli*'de, yüzeylerde biyofilm oluşumunda görev alan OmpA'nın biyofilm oluşumunun yüzeye bağlı bir şekilde etkilendiği (plastikte biyofilm oluşumunu artırırken camda biyofilm oluşumunu azaltır) tespit edilmiştir (Q. Ma & Wood, 2009). Aynı çalışmada, biyofilm oluşumunda OmpA'nın aşırı üretimi sonucunda CpxAR sisteminin aktive edildiği ve hidrofilik yapısından dolayı selüloz üretiminin, *ompA*'nın silinmesi sonucu arttığını ve bunun da yüzeye bağlı biyofilm oluşumuna yol açtığını belirlemişlerdir. CpxAR stres yanıt sistemi yoluyla, selüloz üretimini inhibe eder ve selülozdaki bu azalma, hidrofobik yüzeylerde biyofilm oluşumunu artırır (Cho vd., 2023; Y. Ma vd., 2009). Çalışmamızda bakır varlığında CpxR'nin *ompA*'nın baskılanmasında rolü olduğu ilk kez belirlendi. Literatürde bakır stresine maruz kalan *E. coli*'de artan oksidatif stres sonucunda *ompA* ve *ompF*'nin sentezlerinin azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen *cpxR*'nin *ompA* geninin sentezi üzerindeki etkisi, doğrudan değil de dolaylı yoldan bakır iyonlarının etkisi ile meydana gelen oksidatif stresten kaynaklı olabilir. Zarf stresi meydana geldiğinde CpxAR sisteminin, *ompC* geninin sentezinin artışında, *ompF* geninin ise sentezinin baskılanmasında görevli olduğu bilinmektedir (Batchelor vd., 2005). Diğer taraftan, bakır metali varlığında *ompC* geninin artışında EnvZ/OmpR sisteminin rolü olduğu belirlenmiştir (Kershaw, 2005). Bu çalışma da ise *ompC* ve *ompF* genlerinin sentezinin baskılandığı belirlendi. Diğer çalışmaların bu çalışmadan farkı, kullanılan suşun *E. coli* K12 MG1655 ve kullanılan besiyerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızda bakır varlığında belirlenen bir diğer sonuç, CusSR sistemlerinin, *ompA*, *ompC* ve *ompF* genlerinin sentezlerinin azalmasından, *ompG*, *lamB* ve *phoE* genlerinin sentezlerinin artışından CusSR sistemlerinin sorumlu olmasıdır. Literatürde, OmpC proteinine bakır bağlayıcı özellik gösteren peptitlerin bağlanması ve bu kompleksin bir CusSR iki bileşenli sistemin kontrolü altında ifade edilmesinin sağlandığı çalışmalar (Ravikumar vd., 2011, 2012) bulunmasına rağmen, doğrudan bakır varlığında porin genlerinin sentezi üzerinde CusSR sistemlerinin rolüne dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak farklı metaller ile ilgili birkaç çalışma literatürde tespit edilmiştir. Randall vd., (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. coli*'de *ompR* ve *cusS*'deki mutasyonların, sırasıyla OmpC/F porinlerinin kaybını ve CusCFBA akış taşıyıcısının baskılanmasının kalkmasını sağladığı; her iki durumda hücre içi gümüş birikiminin azalmasıyla bağlantılı olan değişimler olduğu belirlenmiştir (Randall vd., 2014). Son yıllarda yapılan bir çalışmada da *Klebsiella pneumoniae*'deki CusS mutantları, artan gümüş konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında hücrelerde *ompC* ekspresyon seviyesinin düştüğü belirlenmiştir (Woolley vd., 2022).

genellikle nikel komplekslerinin alımı, TonB'ye bağlı taşıyıcılar (TBDT'ler) aracılığıyla dış zar boyunca gerçekleşmektedir (Zeer-Wanklyn & Zamble, 2017). Nikelin ayrıca dış zardaki düşük afiniteli porinler yoluyla da periplazmaya ulaşabileceği düşünülse de literatürde bu konu hakkında bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *E. coli*, fazla miktarda nikel maruz kaldığında, hayatta kalabilmek için biyofilm oluşturduğu ve biyofilm oluşumu sırasında OmpA proteininin aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir (Orme vd., 2006). Ancak laboratuvarımızda farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, *ompA*'nın mutant olması hem normal koşullar altında hem de nikel varlığında yabani tip *E. coli* W3110'un aksine biyofilm oluşturulduğu gözlemlenmiştir (Yayınlanmamış çalışma). Yapılan bir çalışmada, OmpA'nın Cd metal bağlayıcı heksapeptit (HSQKVF) sayesinde hücreleri Cd'nin toksik etkisinden koruduğu ve peptitlerin, çinko, bakır ve nikel gibi diğer ağır metalleri de kompleksleştirdiği için kadmiyuma özgü olmadığı belirtilmiştir (Mejare vd., 1998). Çalışmamız sonucunda *ompA*'nın nakavt edilmesi ile hücrenin nikel karşı daha duyarlı hale gelmesinin sebebi, heksapeptitlerin yokluğu nedeniyle hücreye nikel girişinin engellenmemiş olmasından kaynaklı olabilir.

Çalışmamızda, metal içermeyen ortamda büyütülen yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerindeki porin genlerinin sentez seviyesi ile nikel stresi uygulanan yabani tip *E. coli* W3110 hücrelerinde sentezlenen porin genlerinin sentez seviyesi karşılaştırıldığında, *ompA*'nın sentezinde azalma ve *ompG* ve *phoE*'de ise artış olduğu belirlendi. Bununla birlikte nikel varlığında *ompC*, *ompF*, *ompT* ve *lamB*'nin sentezinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi. *E. coli* hücreleri, nikelinde aralarında bulunduğu 9 farklı ağır metal ile muamele edilmiş ve metallerin antimikrobiyal özellikleri araştırılmıştır. Bunun sonucunda TEM görüntüleri ile metal birikiminin, bakterilerin hücre duvarını ve diğer hücresel bileşenlerin bozulmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Yasuyuki vd., 2010). OmpA'nın periplazmada yer alan C terminal domaini peptidoglikana bağlanarak dış zarın yapısal bütünlüğünü sağlamaktadır (Samsudin vd., 2016). Bu durumda hem kanal proteini hem de yapısal bir protein olan *ompA*'nın nikel varlığında sentezinin azalmasının nedeni bozulan hücre duvar yapısı olabilir. Bununla birlikte, nikel tuzlarına maruz bırakılan *E. coli* hücrelerinde BaeSR sisteminin uyarıldığı (Leblanc vd., 2011) ve stres şartları ile uyarılan BaeR'nin ise *ompA*'nın baskılanmasında rol oynadığı (S. Wang vd., 2021) literatürde bilinmektedir. Bu durumda nikel varlığında *ompA* geninin baskılanmasında BaeSR sisteminin de rolü olabilir.

Yabani tip *E. coli*'de nikel iyonları etkisi ile değişen porin genlerinin sentezi üzerinde metal homeostazında görev alan CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin rolü olup olmadığı gerçek zamanlı PZR kullanılarak araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, nikel varlığında porin genlerinde meydana gelen değişimde CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin sorumlu olmadığı belirlendi. Bu çalışma, nikel varlığında meydana gelen porin sentezlerindeki değişimin farklı protein ya da proteinler tarafından düzenlendiğini göstermektedir. Yukarıda da belirtildiği gibi *ompA* geninin nikel varlığında azalmasında BaeSR sisteminin rolü olması muhtemeldir. Nikel varlığında önemli derecede artış görülen *ompG* ve *phoE* genlerinin regülasyonunda doğrudan ya da dolaylı olarak hangi proteinlerin görev alabileceğine dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamız *ompG* ve *phoE* genlerinin nikel ile ilişkisini gösteren ilk veriler olup bu genlerin kontrolünden hangi protein ya da proteinlerin rol oynadığının belirlenebilmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, literatürde bilinenler ile analiz edildiğinde, yabani tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin nikel (Ni) homeostazındaki tahmini sentez mekanizması Şekil 4.97'de şematize edilerek gösterilmiştir. Ni varlığında porin genlerinin kontrolünde farklı bir mekanizmanın rol oynadığı ve çalışılan genlerin nikel ile ilişkili olarak porin genlerinin sentezi üzerinde bir rolü olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.97. Nikel (Ni) stresine karşı Yabani tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması

Zn metal stresi: Çinko metali uygulanan yabani tip *E. coli* W3110 ile porin genleri nakavt edilmiş hücrelerin yaşam deney sonuçları karşılaştırıldığında, *ompA*, *ompC* ve *lamB* nakavt hücrelerin Zn'ye daha duyarlı olduğu, *ompF* ve *phoE* nakavt hücrelerin daha dirençli olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda, *ompA* geninin nakavt edildiği hücrelerin stres şartlarına karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Sigdel vd., 2006; Y. Wang, 2002). Laboratuvarımızda farklı araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada, *ompA*'nın mutant olması normal koşullar altında yabani tip *E. coli* W3110'un aksine biyofilm oluşturduğu, çinko varlığında ise biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir (Yayınlanmamış çalışma). Bu çalışma sonucunda tespit edilen çinko varlığında *ompA*'nın yokluğu ile hücrenin daha duyarlı olmasının nedeni, toksik bileşenlerin hücre içerisine girişini engelleyen biyofilm tabakasını oluşturamamasından kaynaklı olabilir. Egler vd., 2005 yılında yapılan çalışmada, *E. coli*'de çinko varlığında *ompC* nakavt suşun daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Egler vd., 2005). *E. coli* üzerinde yapılan farklı bir çalışmada da çinko varlığında OmpC'nin yokluğu, hücreyi Zn'ya karşı daha duyarlı hale getirdiği görülmüştür. Çalışmamızda belirlenen Zn varlığında OmpC'nin rolü literatür ile paralellik göstermektedir. Birçok çalışmada, OmpA, OmpC ve LamB proteinlerinin metal bağlayıcı peptitler içerdiği ve bu yapılar sayesinde hücreyi metal iyonlarının toksik etkilerinden koruduğu belirtilmiştir (Maruthamuthu vd., 2018; Mejare vd., 1998; Li & Tao, 2015; Łoboda vd., 2018; Sousa vd., 1998). Burada, çinko varlığında OmpA, OmpC ve LamB proteinlerinin yokluğunda, hücrelerin yabani tipe göre daha duyarlı olmasının tespit edilmesi, literatür ile de desteklenmektedir. Bununla birlikte, çinko varlığında *ompF* ve *phoE* genlerinin *E. coli*'nin yaşamı üzerindeki önemi ilk kez bu çalışma ile belirlendi. Önceden de belirtildiği gibi, *ompF*'nin, besin ve katyon iyonlarının hücre içerisine alımında rol oynayan spesifik olmayan bir porin olması, OmpF'nin yokluğunda hücrenin çinkoya karşı daha dirençli hale gelmesinin nedeni olabilir.

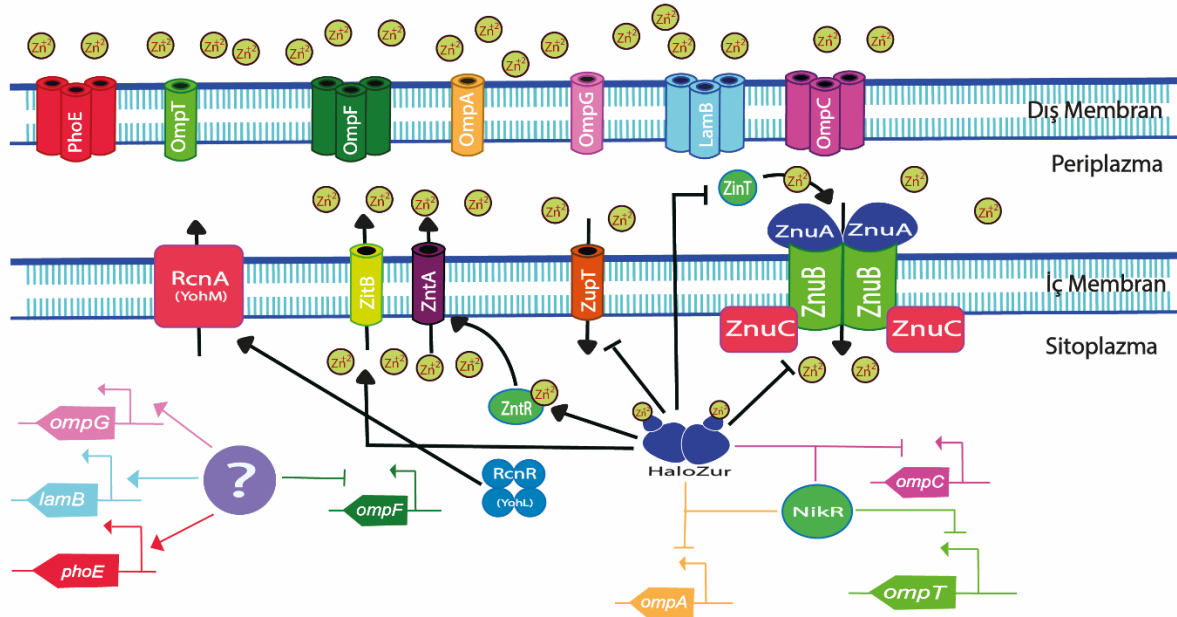
Çalışmamızda çinko metalinin etkisi ile yabani tip *E. coli* W3110'da meydana gelen porin genlerinin sentezindeki değişim karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Zn varlığında yabani tip *E. coli* W3110'da *ompA*, *ompC* ve *ompF* genlerinin sentezinde azalma görülürken *ompG*, *lamB* ve *phoE* genlerinde ise önemli derecede bir artış gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada, *E. coli* proteomunun Zn(II) stresine nasıl tepki verdiği araştırılırken zamanın önemli bir faktör olduğunu ve *ompF*'nin sadece ilk 30 dk'lık zaman diliminde arttığı sonrasında azaldığı tespit edilmiştir (Laake, 1990). Bu durum beklenen bir sonuçtur. Çünkü hücre ilk olarak çoğalmayı sağlayabilmek için *ompF*'nin sentezini artırarak ortamdaki besin alımını sağlamış ve daha sonra hücreye giren toksik miktardaki çinkonun etkisi ile *ompF*'nin

sentezi baskılanmış olabilir. Bu çalışmada belirlenen *ompF*'nin sentezindeki azalmanın literatür ile benzer olmasının nedeni çinkoya daha fazla süre (yaklaşık 2 saat) maruz kalmasından kaynaklı olabilir. Egler vd. (2005) tarafından yapılan ve Zn varlığında *ompF* ve *ompA* genlerinin sentezinin azaldığını gösteren çalışma (Egler vd., 2005), bizim sonuçlarımızı da desteklemektedir. Bir başka çalışmada, Zn varlığında *ompA* sentezinin azaldığının belirtilmesi (Brocklehurst & Morby, 2000), sonuçlarımızı desteklemektedir. Çalışmamız sonucunda elde edilen çinko varlığında artan *ompG*, *lamB* ve *phoE* genlerine ait literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda son olarak, çinko varlığında sentezinin değiştiği tespit edilen porin genlerinin kontrolünde, CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin hangisinin rolü olduğu belirlenmeye çalışıldı. Bunun için çinko varlığında ve yokluğunda yabancı tip *E. coli* W3110 ve *cueR*, *rcnR*, *nikR* ve *zur* mutantlarında porin genlerinin sentez miktarları gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. Yabancı tip *E. coli* W3110 ile mutantlarda sentezlenen porin miktarlarının karşılaştırılması sonucunda, *ompF*'nin azalmasında ve *ompG*, *lamB* ve *phoE*'nin artışında belirlemiş olduğumuz CueR, RcnR, NikR ve Zur proteinlerinin rolü olmadığı, farklı bir protein ya da proteinler tarafından kontrol edilebileceği belirlendi. Bununla birlikte, *ompA* ve *ompC* genlerinin baskılanmasında NikR ve Zur proteinlerinin rolü olduğu belirlendi. Bu proteinlerin çinko varlığında ve yokluğunda *ompA* ve *ompC* genlerinin sentezi üzerinde rol oynadığına dair bir çalışmaya literatürde karşılaşılmamıştır. Ancak NikR ve Zur proteinlerinin hücredeki çinko varlığını algıladığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Gilston vd., 2014; Higgins vd., 2012; Outten vd., 2001; S. C. Wang vd., 2004). *E. coli*'de NikR, bir nikel iyonu taşıyıcısının ifadesini düzenleyen, nikel duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür. Metal analizi yapılan çalışmada, NikR'nin Ni(II), Cu(II), Zn(II), Co(II) ve Cd(II) dahil olmak üzere çeşitli iki değerlikli geçiş metalleri bağlayabildiğini ortaya koymaktadır (Higgins vd., 2012; S. C. Wang vd., 2004). *E. coli* Zur proteini, Zn(II) alım sistemlerinin ifadesini düzenleyen bir Fur homologudur. Çinko yüklü Zur formunun DNA'yı bağlamasını ve *znuABC* genlerinin transkripsiyonunu baskılamaktadır (Gilston vd., 2014; Outten vd., 2001). Zur (çinko alım düzenleyicisi) tarafından düzenlenen *ykgM* ve *zinT*'nin, çinko kıtlığı sırasında yüksek oranda indüklendiği ve bunun biyofilm oluşturabilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir. Farklı bir çalışmada *ykgM* veya *zinT* genlerindeki bir mutasyonun biyofilm biyosentezinin inhibisyonuna yol açtığını bildirmektedir. Bu çalışmalardan yola çıkarak, Zur'un aşırı çinko varlığını hissetmesi ve *zinT* genini baskılayarak biyofilmde görev alan *ompA*'nın sentezinin azalması sonucu biyofilmi engellemiş olabileceği söylenebilir. Yapılan bir çalışmada, çinko

(Zn) fazlalığının *E. coli*'de demir (Fe) ve bakır (Cu) homeostazını bozarak hücrede Fe'nin artmasına ve Cu seviyelerinin düşmesine neden olduğu belirlenmiştir. İlâveten yapılan gen ekspresyon analizi sonucunda ise, Zn fazlalığının geçici olarak Fur'un aktifleşerek hücre içinde artan metale bağlı olarak Fe alım genlerini baskıladığı belirlenmiştir (Z. Xu vd., 2019). Bu durumda hücre içerisine demir alımında görevli olan *ompC* geninin (Gerken vd., 2020b) sentezinin artan çinko varlığında Fur'un homoloğu olan Zur tarafından baskılanmış olabilir. Çalışmamız sonucunda belirlenen NikR'nin *ompA* ve *ompC* genlerinin sentezi nikel varlığında baskıladığına dair literatürde bir çalışma görülmemiştir. NikR'nin porin genleri üzerindeki düzenleyici rolünün anlaşılması için daha çok veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler literatürde bilinenler ile analiz edildiğinde, yabancı tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin çinko (Zn) homeostazındaki tahmini sentez mekanizması Şekil 4.98'de şematize edilerek özetlenmiştir. Zn varlığında, *ompA* ve *ompC*'nin baskılanmasından NikR ve Zur, *ompF* ve *ompT*'nin baskılanmasından ve *ompG*'nin sentezinin artmasından NikR'nin sorumlu olduğu tespit edildi. Belirlenen bu verilere ait literatürde bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 4.98. Çinko (Zn) stresine karşı Yabancı tip *E. coli* W3110'da porin genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin tahmini sentez mekanizması

4.3. Öneriler

E. coli, metal varlığını algılamada ve hücre içerisindeki dengeyi korumada çok karmaşık bir mekanizmaya sahiptir. Metallerin periplazmaya ve hücre dışına aktarım mekanizmaları hakkında çok şey bilinmesine rağmen, metallerin hücreye alım mekanizmalarının daha çok aydınlatılması gerekmektedir. *E. coli*'de dış zar, metallerin hücreye girmesini engelleyici ilk bariyerdir. Çalışmamız sonucunda dış zar geçirgenliğinde görev alan porin proteinlerinin metal iyonlarının hücre içine taşınmasında önemli rol oynadığı belirlendi. Ancak porin genlerinin metal varlığında hangi proteinlerin kontrolü altında olduğunun tam olarak açıklanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez kapsamında metal içermeyen ortamda yapılan çalışmalarda *E. coli*'de metal homeostazında görevli olan CueR, RcnR, NikR, Zur, CpxA, CpxR, CusS ve CusR proteinlerinin porin genlerinin sentezi üzerinde önemli rolleri olduğu belirlendi. Metalden bağımsız olarak bu proteinlerin porin genleri üzerindeki etkisinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Cd homeostazında, önemli rolü olduğu belirlenen *ompC* ve *phoE* genlerinin sentezini düzenleyen çalışmada araştırılan proteinlerin haricinde farklı protein veya proteinlerin olduğu belirlenmiştir. Co homeostazında *ompA*, *ompT* ve *lamB* genlerinin; Ni homeostazında *ompA*, *ompG* ve *phoE* genlerinin ve Zn homeostazında ise *ompF*, *ompG*, *lamB* ve *phoE* genlerinin farklı protein veya proteinler tarafından regüle edildiği tespit edildi. Henüz bilinmeyen bu proteinlerin ve metal homeostazdaki porin proteinlerini regüle etme mekanizmalarının daha da aydınlatılması gereklidir.

Yabani tip *E. coli* ve porin mutant suşların eksikliği olan mutant suşlarının lipitleri, proteinleri, yağ asitleri, nükleik asitleri ve polisakkaritlerindeki değişiklikler, kızılötesi spektroskopik analizlerle metal iyonlarının varlığında ve yokluğunda tanımlandı. Tüm porin mutantlarında biyomoleküllerin hem yapısal hem de miktarları bakımından oldukça farklılıklar gözlemlendi. Özellikle Co ve Zn metalleri varlığında porin mutantları arasında da önemli farklılıklar tespit edildi. Ancak genel olarak belirlenen bu farklılıkların kızılötesi spektroskopisi sonucunda elde edilen her bir spektrum tek tek analiz edilmelidir.

Bakteriler, çeşitli stres koşulları altında zardaki porin proteinlerinin sayısını ve gözenek boyutunu değiştirmektedirler. Böylece hücreler, zararlı moleküllere karşı kendilerini korurlar. Bu çalışma, porin genlerinin çalışılan metal stresi ile ilişkili olduğu belirlenmiş olup gelecekteki metal homeostazındaki mekanizmasının tam olarak açıklanması için yapılan

çalışmalara temel olacaktır. Ayrıca ortamdaki Cu, Ni, Cd, Zn ve Co metallerrinin detoksifikasyon verimliliğinin karakterize edilmesine ve biyoremediasyon için aktif canlı hücrelerin elde edilmesinde yol gsterici olabilir.

KAYNAKÇA

- Amaral, L., Martins, A., Spengler, G., & Molnar, J.** (2014). Efflux pumps of Gram-negative bacteria: What they do, how they do it, with what and how to deal with them. İçinde *Frontiers in Pharmacology: C. 4 JAN*. Frontiers Research Foundation.
- Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G., & Tamm, L. K.** (2000). Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1594-1600.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H.** (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Baslé, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J. P., & Schirmer, T.** (2006). Crystal Structure of Osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *Journal of Molecular Biology*, 362(5), 933-942.
- Bauerzb, K., Struyveli, M., Boschll, D., Benzsii, R., & Tommassenn, J.** (1989). One Single Lysine Residue is Responsible for the Special Interaction between Polyphosphate and the Outer Membrane Porin PhoE of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* (C. 264, Sayı 28).
- Benz, R., Darveau, R. P., & Hancock, R. E. W.** (1984). Outer-membrane protein PhoE from *Escherichia coli* forms anion-selective pores in lipid-bilayer membranes. *European Journal of Biochemistry*, 140(2), 319-324.
- Benz, R., Schmidt, A., & Vos-Scheperkeuter, G. H.** (1987). Mechanism of Sugar Transport through the Sugar-Specific LamB Channel of *Escherichia coli* Outer Membrane. *J. Membrane Biol* (C. 00).
- Bhardwaj, R., Gupta, A., & Garg, J. K.** (2018). Impact of heavy metals on inhibitory concentration of *Escherichia coli*—a case study of river Yamuna system, Delhi, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(11).
- Blah, D., Arous, S., Blériot, C., Dorel, C., Mandrand-Berthelot, M. A., & Rodrigue, A.** (2011). The *Escherichia coli* metallo-regulator RcnR represses rcnA and rcnR transcription through binding on a shared operator site: Insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt. *Biochimie*, 93(3), 434-439.
- Blériot, C., Gault, M., Gueguen, E., Arnoux, P., Pignol, D., Mandrand-Berthelot, M. A., & Rodrigue, A.** (2014). Cu binding by the *Escherichia coli* metal-efflux accessory protein RcnB. *Metallomics*, 6(8), 1400-1409.
- Bloom, S. L.** (2004). Metal specificity of the transcriptional repressor NikR in *Escherichia coli*. *National Library of Canada = Bibliothèque nationale du Canada*.
- Brocklehurst, K. R., & Morby, A. P.** (2000). Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. İçinde *Microbiology* (C. 146).

- Canil, A., Saleh, N., & Chan, J.** (2019). Knockout of OmpF and OmpC does not affect kanamycin susceptibility in two different strains of *Escherichia coli* K-12. İçinde *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology (UJEMI)* (C. 24).
- Chang, C. C., Yan, C. W., Onal, R., & Zhang, Y.** (2018). Genetic characterization and investigation of kanamycin susceptibility of *ompC* and *ompF* single gene deletion mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 22(August).
- Chimento, D. P., Goldberg, J. B., & Nakamoto, R. K.** (2004). *The Structure and Functional Analysis of the Cobalamin Receptor of Escherichia coli*.
- Chivers, P. T., Benanti, E. L., Heil-Chapdelaine, V., Iwig, J. S., & Rowe, J. L.** (2012). Identification of Ni-(1-His)₂ as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in *Escherichia coli*. *Metallomics*, 4(10), 1043-1050.
- Cho, S. H., Dekoninck, K., & Collet, J. F.** (2023). Envelope-Stress Sensing Mechanism of Rcs and Cpx Signaling Pathways in Gram-Negative Bacteria. İçinde *Journal of Microbiology*. The Korean Society for Microbiology / The Korean Society of Virology.
- Chuanboon, K., Nakorn, P. N., Pannengetch, S., Laengsri, V., Nuchnoi, P., Isarankura-Na-Ayudhya, C., & Isarankura-Na-Ayudhya, P.** (2019). Proteomics and bioinformatics analysis reveal potential roles of cadmium-binding proteins in cadmium tolerance and accumulation of *Enterobacter cloacae*. *PeerJ*, 2019(9).
- Craig, S. A., Carpenter, C. D., Mey, A. R., Wyckoff, E. E., & Payne, S. M.** (2011). Positive regulation of the *Vibrio cholerae* porin OmpT by Iron and Fur. *Journal of Bacteriology*, 193(23), 6505-6511.
- Damaghi, M., Bippes, C., Köster, S., Yildiz, Ö., Mari, S. A., Kühlbrandt, W., & Muller, D. J.** (2010). pH-dependent interactions guide the folding and gate the transmembrane pore of the β -barrel membrane protein OmpG. *Journal of Molecular Biology*, 397(4), 878-882.
- Darcan, C., Özkanca, R., & Flint, K. P.** (2003). Survival of nonspecific porin-deficient mutants of *Escherichia coli* in black sea water. *Letters in Applied Microbiology*, 37(5), 380-385.
- De La Cruz, M. Á., & Calva, E.** (2010). The complexities of porin genetic regulation. İçinde *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (C. 18, Sayı 1, ss. 24-36).
- Desloges, I., Taylor, J. A., Leclerc, J. M., Brannon, J. R., Portt, A., Spencer, J. D., Dewar, K., Marczynski, G. T., Manges, A., Gruenheid, S., Le Moual, H., & Thomassin, J. L.** (2019). Identification and characterization of OmpT-like proteases in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. *MicrobiologyOpen*, 8(11).
- Dietfuch, H. :, & Nies.** (1992). Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc, and Nickel in Microbes.

- Doranga, S., & Conway, T.** (2023). OmpC-Dependent Bile Tolerance Contributes to *E. coli* Colonization of the Mammalian Intestine. *Microbiology Spectrum*, *11*(3).
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G., & Nies, D. H.** (2005). Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(7), 2297-2307.
- Fajardo, D. A., Cheung, J., Ito, C., Sugawara, E., Nikaido, H., & Misra, R.** (1998). Biochemistry and Regulation of a Novel *Escherichia coli* K-12 Porin Protein, OmpG, Which Produces Unusually Large Channels. İçinde *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (C. 180, Sayı 19).
- Fantino, J. R., Py, B., Fontecave, M., & Barras, F.** (2010). A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. *Environmental Microbiology*, *12*(10), 2846-2857. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02265.x>
- Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Della Pepa, M. E., D'oriano, V., & Galdiero, M.** (2012). *Send Orders of Reprints at bspsaif@emirates.net.ae* *Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins*.
- Gault, M., Effantin, G., & Rodrigue, A.** (2016). Ni exposure impacts the pool of free Fe and modifies DNA supercoiling via metal-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Free Radical Biology and Medicine*, *97*, 351-361.
- Gerken, H., Vuong, P., Soparkar, K., & Misra, R.** (2020). Roles of the ENVZ/OMPR two-component system and porins in iron acquisition in *Escherichia coli*. *mBio*, *11*(3), 1-18.
- Gilston, B. A., Wang, S., Marcus, M. D., Canalizo-Hernández, M. A., Swindell, E. P., Xue, Y., Mondragón, A., & O'Halloran, T. V.** (2014). Structural and Mechanistic Basis of Zinc Regulation Across the *E. coli* Zur Regulon. *PLoS Biology*, *12*(11).
- Goodson, M.** (1986). Copper sensitivity in an envelope mutant of *Escherichia coli* and its suppression by ColV, I-K94. İçinde *Letters in Applied Microbiology* (C. 3).
- Hallt, M. N., & Silhavy, T. J.** (1981). The *ompB* Locus and the Regulation of the Major Outer Membrane Porin Proteins of *Escherichia coli* K12. İçinde *J. Mol. Biol* (C. 146).
- Hancock, R. E. W., Schmidt, A., Bauer, K., & Benz, R.** (1986). Role of lysines in ion selectivity of bacterial outer membrane porins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *860*(2), 263-267.
- Hecel, A., Kola, A., Valensin, D., Kozłowski, H., & Rowinska-Zyrek, M.** (2020). Metal Complexes of Two Specific Regions of ZnuA, a Periplasmic Zinc(II) Transporter from *Escherichia coli*. *Inorganic Chemistry*, *59*(3), 1947-1958.
- Higgins, K. A., Chivers, P. T., & Maroney, M. J.** (2012). Role of the N-terminus in Determining Metal-Specific Responses in the *E. coli* Ni- and Co-Responsive Metalloregulator, RcnR. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(16), 7081-7093.

- Isarankura-Na-Ayudhya, P., Thippakorn, C., Pannengetch, S., Roytrakul, S., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Bunmee, N., Sawangnual, S., & Prachayasittikul, V.** (2018). Metal complexation by histidine-rich peptides confers protective roles against cadmium stress in *Escherichia coli* as revealed by proteomics analysis. *PeerJ*, 2018(7).
- Jancsó, A., Gyurcsik, B., Szunyogh, D., Hemmingsen, L., Thulstrup, P. W., Larsen, F. H., Niels, ;, & Christensen, J.** (2012). Oligopeptide Sequences of The Metal Binding Domain of CueR Metalloregulatory Proteins As Candidates For Toxic Metal Ion CAPTURE.
- Janeena, A., Nagabalaji, V., Suresh, P., Ramudu, K. N., Srinivasan, S. V., Shanmugam, G., & Ayyadurai, N.** (2023). Engineering microbial cells with metal chelating hydroxylated unnatural amino acids for removable of synthetic pollutants from water. *Chemosphere*, 311.
- Kammler, M., Schon, C., & Hantke, K.** (1993). Characterization of the Ferrous Iron Uptake System of *Escherichia coli*. İçinde *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (C. 175, Sayı 19).
- Kershaw, C. J.** (2005). The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology*, 151(4), 1187-1198.
- Koch, D., Nies, D. H., & Grass, G.** (2007). The RcnRA (YohLM) system of *Escherichia coli*: A connection between nickel, cobalt and iron homeostasis. *BioMetals*, 20(5), 759-771.
- Koebnik, R., Locher, K. P., & Van Gelder, P.** (2000). MicroReview Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. İçinde *Molecular Microbiology* (C. 37, Sayı 2).
- Korteland, J., Tommassen, J., & Lugtenberg, B.** (1982). PhoE protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K12 is a particularly efficient channel for organic and inorganic phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 690(2), 282-289.
- Laake, I. R.** (1990). The Norwegian Women's Public Health Association. *World health forum*, 11(3), 332-335.
- Latorre, M., Low, M., Gárate, E., Reyes-Jara, A., Murray, B. E., Cambiazo, V., & González, M.** (2015). Interplay between copper and zinc homeostasis through the transcriptional regulator Zur in *Enterococcus faecalis*. *Metallomics*, 7(7), 1137-1145.
- Leblanc, S. K. D., Oates, C. W., & Raivio, T. L.** (2011). Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 193(13), 3367-3375.
- Lugtenberg, E. J. J., & Peters, R.** (1976). Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 441(1).

- Luo, S., Liao, C., Peng, J., Tao, S., Zhang, T., Dai, Y., Ding, Y., & Ma, Y.** (2023). Resistance and virulence gene analysis and molecular typing of *Escherichia coli* from duck farms in Zhanjiang, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*.
- Lutkenhaus, J. F.** (1977). Role of a Major Outer Membrane Protein in *Escherichia coli*. İçinde *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (C. 131, Sayı 2).
- Ma, Q., & Wood, T. K.** (2009). OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environmental Microbiology*, *11*(10), 2735-2746.
- Ma, Y., Rajkumar, M., & Freitas, H.** (2009). Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, *166*(2-3).
- Macomber, L., & Hausinger, R. P.** (2011). Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. İçinde *Metallomics* (C. 3, Sayı 11, ss. 1153-1162).
- Mari, S. A., Köster, S., Bippes, C. A., Yildiz, Ö., Kühlbrandt, W., & Muller, D. J.** (2010). PH-Induced Conformational Change of the β -Barrel-Forming Protein OmpG Reconstituted into Native *E. coli* Lipids. *Journal of Molecular Biology*, *396*(3), 610-616.
- Marlovits, T. C., Haase, W., Herrmann, C., Aller, S. G., & Unger, V. M.** (2002). *The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria.*
- Maruthamuthu, M. kannan, Selvamani, V., Nadarajan, S. P., Yun, H., Oh, Y.-K., Eom, G. T., & Hong, S. H.** (2018). Manganese and cobalt recovery by surface display of metal binding peptide on various loops of OmpC in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *45*(1), 31-41.
- Mejare, M., Ljung, S., & Bülow, L.** (1998). Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Engineering*, *11*(6).
- Monteiro, R., Chafsey, I., Caccia, N., Ageorges, V., Leroy, S., Viala, D., Hébraud, M., Livrelli, V., Pizza, M., Pezzicoli, A., & Desvaux, M.** (2023). Specific Proteomic Identification of Collagen-Binding Proteins in *Escherichia coli* O157:H7: Characterisation of OmpA as a Potent Vaccine Antigen. *Cells*, *12*(12), 1634.
- Naturwissenschaften, der, & Große, W.** (2011). *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades.*
- Navarro, C., Wu, L. -F, & Mandrand-Berthelot, M. -A.** (1993). The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Molecular Microbiology*, *9*(6).
- Nikaido, H.** (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 593-656.
- Nikaido, H., & Vaara, M.** (1985). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. İçinde *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*.

- Orme, R., Douglas, C. W. I., Rimmer, S., & Webb, M.** (2006). Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *PROTEOMICS*, 6(15), 4269-4277.
- Osborn, M. J., & Wu, H. C. P.** (1980). PROTEINS OF THE OUTER MEMBRANE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA. İçinde *Ann. Rev. Microbial* (C. 34).
- Osman, D., Cooke, A., Young, T. R., Deery, E., Robinson, N. J., & Warren, M. J.** (2021). The requirement for cobalt in vitamin B12: A paradigm for protein metalation. İçinde *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (C. 1868, Sayı 1). Elsevier B.V.
- Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E., & O'Halloran, T. V.** (2001). Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry*, 40(35), 10417-10423.
- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M.** (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893-903.
- Patzer, S. I., & Hantke, K.** (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1199-1210.
- Pavlova, A., Hwang, H., Lundquist, K., Balusek, C., & Gumbart, J. C.** (2016). Living on the edge: Simulations of bacterial outer-membrane proteins. *Biochimica et Biophysica-Acta-Biomembranes*, 1858(7), 1753-1759.
- Pazirandeh, M., Wells, B. M., & Ryan, R. L.** (1998). Development of bacterium-based heavy metal biosorbents: Enhanced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10).
- Pina, K., Navarro, C., Mcwalter, L., Boxer, D. H., Price, N. C., Kelly, S. M., Mandrand-Berthelot, M.-A., & Wu, L.-F.** (1995). Purification and Characterization of the Periplasmic Nickel-Binding Protein NikA of *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry*, 227(3).
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., & Dozois, C. M.** (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: Correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. İçinde *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (C. 3, Sayı DEC).
- Prajapati, J. D., Kleinekathöfer, U., & Winterhalter, M.** (2021). How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics. İçinde *Chemical Reviews* (C. 121, Sayı 9, ss. 5158-5192). American Chemical Society.
- Ramamoorthy, S., & Kushner, D. J.** (1975). *Binding of Mercuric and Other Heavy Metal Ions by Microbial Growth Media*.

- Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., & O'Neill, A. J.** (2014). Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(4), 1037-1046.
- Ranquet, C., Ollagnier-de-Choudens, S., Loiseau, L., Barras, F., & Fontecave, M.** (2007). Cobalt stress in *Escherichia coli*: The effect on the iron-sulfur proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30442-30451.
- Ravikumar, S., Ganesh, I., Yoo, I. K., & Hong, S. H.** (2012). Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria. *Process Biochemistry*, 47(5), 758-765.
- Ravikumar, S., Yoo, I. K., Lee, S. Y., & Hong, S. H.** (2011). Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(7-8), 1674-1681.
- Rensing, C., & Grass, G.** (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *Içinde FEMS Microbiology Reviews* (C. 27, Sayı 2-3, ss. 197-213). Elsevier.
- Rodrigue, A., Effantin, G., & Mandrand-Berthelot, M. A.** (2005). Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2912-2916.
- Samsudin, F., Ortiz-Suarez, M. L., Piggot, T. J., Bond, P. J., & Khalid, S.** (2016). OmpA: A Flexible Clamp for Bacterial Cell Wall Attachment. *Structure*, 24(12), 2227-2235.
- Schmitt, C., Bafna, J. A., Schmid, B., Klingl, S., Baier, S., Hemmis, B., Wagner, R., Winterhalter, M., & Voll, L. M.** (2019). Manipulation of charge distribution in the arginine and glutamate clusters of the OmpG pore alters sugar specificity and ion selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(10).
- Sebbane, F., Mandrand-Berthelot, M. A., & Simonet, M.** (2002). Genes encoding specific nickel transport systems flank the chromosomal urease locus of pathogenic yersiniae. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5706-5713. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5706-5713.2002>
- Sigdel, T. K., Cilliers, R., Gursahaney, P. R., Thompson, P., Easton, J. A., & Crowder, M. W.** (2006). Probing the adaptive response of *Escherichia coli* to extracellular Zn(II). *BioMetals*, 19(5), 461-471.
- Speer, A., Rowland, J. L., Haeili, M., Niederweis, M., & Wolschendorf, F.** (2013). Porins increase copper susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 195(22), 5133-5140.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L., & Brown, N. L.** (2001). CueR (Ybb1) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular Microbiology*, 39(2), 502-512.

- Thorgersen, M. P., & Downs, D. M.** (2007). Cobalt targets multiple metabolic processes in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7774-7781.
- Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N., & Zehndert, A. J. B.** (1994). Translocation of Metal Phosphate via the Phosphate Inorganic Transport System of *Escherichia coli*? İçinde *Biochemistry* (C. 33).
- Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynié, L., Acosta-Gutiérrez, S., Naismith, J. H., Davin-Regli, A., Ceccarelli, M., van den Berg, B., Winterhalter, M., & Pagès, J. M.** (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. İçinde *Nature Reviews Microbiology* (C. 18, Sayı 3, ss. 164-176). Nature Research.
- Wang, S. C., Dias, A. V., Bloom, S. L., & Zamble, D. B.** (2004). Selectivity of Metal Binding and Metal-Induced Stability of *Escherichia coli* NikR. *Biochemistry*, 43(31), 10018-10028.
- Wang, S., You, C., Memon, F. Q., Zhang, G., Sun, Y., & Si, H.** (2021). BaeR participates in cephalosporins susceptibility by regulating the expression level of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry*, 169(1), 101-108.
- Wang, Y.** (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 396-401.
- Woolley, C. A., Sutton, J. M., & Wand, M. E.** (2022). Mutations in SilS and CusS/OmpC represent different routes to achieve high level silver ion tolerance in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology*, 22(1).
- Worden, C. R., Kovac, W. K., Dorn, L. A., & Sandrin, T. R.** (2009). Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12 (MG1655). *FEMS Microbiology Letters*, 293(1), 58-64.
- Wu, H., Wei, Z., Shi, D., Li, H., Li, X., Yang, D., Zhou, S., Peng, X., Yang, Z., Yin, J., Chen, T., Li, J., & Jin, M.** (2023). Simulated Gastric Acid Promotes the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes across Bacteria in the Gastrointestinal Tract at Elevated pH Levels. *Microbiology Spectrum*, 11(3).
- Xu, Y., Tan, L., Li, Q., Zheng, X., & Liu, W.** (2022). Sublethal concentrations of heavy metals Cu^{2+} and Zn^{2+} can induce the emergence of bacterial multidrug resistance. *Environmental Technology and Innovation*, 27.
- Xu, Z., Wang, P., Wang, H., Yu, Z. H., Au-Yeung, H. Y., Hirayama, T., Sun, H., & Yan, A.** (2019). Zinc excess increases cellular demand for iron and decreases tolerance to copper in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(45), 16978-16991.
- Yasuyuki, M., Kunihiro, K., Kurissery, S., Kanavillil, N., Sato, Y., & Kikuchi, Y.** (2010). Antibacterial properties of nine pure metals: A laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biofouling*, 26(7), 851-858.

- Yatsunyk, L. A., Easton, J. A., Kim, L. R., Sugarbaker, S. A., Bennett, B., Breece, R. M., Vorontsov, I. I., Tierney, D. L., Crowder, M. W., & Rosenzweig, A. C.** (2008). Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(2), 271-288.
- Yildiz, Ö., Vinothkumar, K. R., Goswami, P., & Kühlbrandt, W.** (2006). Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. *EMBO Journal*, 25(15).
- Yoon, S. H., Han, M. J., Lee, S. Y., Jeong, K. J., & Yoo, J. S.** (2003). Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(7), 753-767.
- Zakharian, E., & Reusch, R. N.** (2005). Kinetics of folding of *Escherichia coli* OmpA from narrow to large pore conformation in a planar bilayer. *Biochemistry*, 44(17), 6701-6707.
- Zeer-Wanklyn, C. J., & Zamble, D. B.** (2017). Microbial nickel: cellular uptake and delivery to enzyme centers. İçinde *Current Opinion in Chemical Biology* (C. 37, ss. 80-88). Elsevier Ltd.
- Zeth, K., & Thein, M.** (2010). Porins in prokaryotes and eukaryotes: Common themes and variations. İçinde *Biochemical Journal* (C. 431, Sayı 1).
- Zhang, Y., Gu, A. Z., Cen, T., Li, X., He, M., Li, D., & Chen, J.** (2018). Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environmental Pollution*, 237, 74-82.